HAL
open science

Étude de la bioactivité de plantes médicinales de La Réunion dans le contexte de perturbations métaboliques

Éloïse Checkouri

To cite this version:

Éloïse Checkouri. Étude de la bioactivité de plantes médicinales de La Réunion dans le contexte de perturbations métaboliques. Médecine humaine et pathologie. Université de la Réunion, 2021. Français. NNT : 2021LARE0002 . tel-03274364

HAL Id: tel-03274364

https://theses.hal.science/tel-03274364

Submitted on 30 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

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Réunion

École Doctorale Sciences Technologies et Santé – Discipline Biologie Médicale, Santé

Unité de Recherche

INSERM UMR1188 Diabète athérothrombose thérapies Réunion Océan Indien

Étude de la bioactivité de plantes médicinales de La Réunion dans le contexte de perturbations métaboliques

Présentée et soutenue publiquement le mercredi 27 Janvier 2021
par Eloïse CHECKOURI

Jury

Dr. Cécile VINDIS	*Rapporteur*
Dr. Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA	*Rapporteur*
Pr. Anne BIALECKI	*Présidente*
Dr. Sandrine DELBOSC	*Examinatrice*
Dr. Chaker EL KALAMOUNI	*Examinateur*
Dr. Olivier MEILHAC	*Directeur de thèse*

Encadrants

Mr. Franck REIGNIER	*Référent Entreprise HABEMUS PAPAM*
Dr. Christine ROBERT-DA SILVA	*Encadrante de thèse*

A mes parents,

A mamie et à la mémoire de mes grands-parents

A toute ma famille,

Sito tangaz la vi i savir aou kom bato fine kit lo por,

Les ali ral aou an ti kanot

Ou va trouv in zour, lontan avan ou mor

Pou kosa, pou kisa, ou té doi briyé

Kan ou mazine out zansèt

Obli pa koman bana la trimé

Pou k-in zour somanké, pétèt

Tout zot zanfan i travay dann liv-kayé

Une pensée aux tisaneurs et à toutes les personnes qui ont œuvré pour que perdurent les traditions de l'Ile de La Réunion. A ceux, qui dans les siècles précédents, ont soigné les réunionnais depuis l'époque du peuplement de l'Ile, de l'esclavage, de l'engagisme et même après. A ceux qui ont connu la misère et la famine mais qui ont toujours donné de leur temps, de leur force et de leur savoir pour aider, soigner, soulager les maux de chacun. Aux tisaneurs actuels, qui sont un des piliers de notre culture.

Au travers de ces années de thèse, au-delà des plantes médicinales que j'ai étudiées, c'est un peu « vous » que j'ai appris à connaître. Ma plus grande chance a été de travailler sur un sujet mêlant notre histoire et peut être notre avenir.

Remerciements

Ce travail de thèse a été possible grâce à la collaboration de l'Entreprise HABEMUS PAPAM dirigée par Monsieur Alain ORRIOLS et du Laboratoire INSERM UMR 1188 DéTROI Diabète Athérothrombose Thérapie Réunion Océan Indien dirigé par le Dr. Olivier MEILHAC. Les travaux ont été menés grâce au soutien financier de l'ANRT, Agence Nationale de la Recherche et des Technologies.

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury pour avoir accordé de leur temps à l'évaluation de mes travaux de thèse. Je remercie le président du jury, le Dr. Cécile VINDIS et le Dr. Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA rapporteurs de mon manuscrit de thèse ; le Pr. Anne BIALECKI présidente du jury de thèse, le Dr. Sandrine DELBOSC et le Dr. Chaker EL KALAMOUNI, examinateurs de mes travaux.

Je remercie chaleureusement le Dr. Christine ROBERT-DA SILVA, et le Dr. Olivier MEILHAC respectivement Co-encadrante et Directeur de ma thèse. Je vous remercie pour votre patience et pour toute l'aide que vous m'avez apportée durant ces trois années. Merci de m'avoir permis d'aller au bout de mes questions scientifiques et de m'avoir conseillée. Merci d'avoir été respectueux, disponibles et à l'écoute. Merci de m'avoir accordé du temps, autant pour m'enseigner les méthodes d'extraction et de marquage des LDL, d'extraction d'ARN que pour la relecture de mon manuscrit. Enfin, merci de m'avoir donné la chance de travailler dans de très bonnes conditions au sein du Laboratoire.

Je tiens à remercier toute l'équipe du Laboratoire DéTROI pour les moments que nous avons passés ensemble. Je remercie notamment Cynthia, Philippe, Manu, Nicolas, Steeve, Jean-Loup, Matthieu, Joël et Pierre.

Je remercie chaleureusement le Dr. Claude MARODON et Monsieur Alain ORRIOLS pour leur confiance et leur soutien. C'est grâce à vous que j'ai pu découvrir le monde de la recherche et que j'ai pu profiter de ce partenariat entre l'Entreprise HABEMUS PAPAM et le Laboratoire DéTROI.

Je remercie Monsieur REIGNIER, Directeur de l'Entreprise HABEMUS PAPAM et Référent Entreprise dans le cadre de ma thèse. Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance et votre soutien. Merci de m'avoir permis de prendre part à la vie de l'Entreprise HABEMUS PAPAM. J'ai apprécié ces journées en entreprise rythmées par le bruit des machines dans cette grande usine embaumant l'*Ayapana*. Même si les problématiques de la recherche sont bien éloignées de celles que peut rencontrer un Général des FAZOI, votre intérêt et vos questions sur mes résultats scientifiques ont été des sources de motivation pour avancer et poursuivre mes efforts.

Je remercie l'équipe d'HABEMUS PAPAM pour leur accueil et les moments que nous avons passés ensemble. Merci à Isabelle, Sabine, Daniel, Sylvain, Guillaume et Nicolas.

Je remercie aussi les membres de mon Comité de Suivi de Thèse pour leur soutien, leurs conseils avisés qui m'ont permis de progresser, de rebondir et de m'épanouir dans mon travail : Dr. Marjolaine ROCHE, Pr. Gilles LAMBERT et Dr. Claude MARODON.

La thèse a été pour moi l'occasion de faire la rencontre de personnes formidables. Merci à Sarah, Chloé, Marie, Batoul, Sandhya, Angélique Gajahi, Giovédie, Jennifer B.V, Laura, Latufa, Jade, Daed, Jen CKC, Soukaina,

Tatiana, Bryan, Zarouki, Ali, Kevin, Valentin, Brice, Mathias, Clément, Anthony, Sébastien Tanaka, Axel, Jason, Jonathan Turpin, Juliano, Mr Begue, Téva et Julien. Je n'oublierai jamais les moments que nous avons passés ensemble que ce soit dans l'enthousiasme d'une manip qui a marché ou dans le dépit d'une expérimentation dans laquelle j'ai pu oublier de placer un réactif … ou encore lors de nos merveilleuses sorties. Je remercie aussi la petite équipe du MT180, Aroul, Jade, Ophélie, Maareva, Hasina, Youssouf, Sophien, Ali, Jonathan, Maxime. Je vous souhaite à tous le meilleur dans votre vie professionnelle et personnelle. Je remercie également les membres du CYROI, Fanny, Seb, Vincent, Imade et la « team des vieilles pies ».

Un grand merci à Céline et Wildriss. Je suis heureuse d'avoir rencontré un duo brillant et inspirant comme le vôtre. Merci de m'avoir montré à quelle point la science est belle quand elle est libre d'évoluer, de révoquer nos certitudes, de faire osciller notre moral tout en confortant notre désir de vouloir la comprendre. Je vous souhaite un avenir plein de réussites et de belles différences.

Merci à mes amies qui malgré la distance ont toujours su être présentes et à l'écoute. Je pense à Axia, Nesrine, et Manila mais aussi à Anne So, Xmax, Emilie, Amandine, Adeline et Aurélie.

Merci à Jano qui m'a transmis cette passion dévorante pour la musique … et la self défense ! Merci à notre petit groupe de self de Saint Denis, Christine, Sabine, Annie, Manuelle. Merci à Cédric avec qui nous avons appris nos toutes premières clés. Un grand merci à la team « Pèzàtèr », Delphine, Nora, Christine, Sophie, Alexia, Monsieur Jean-Marc, Morgan, Jean-Louis, Arnaud, Cédric, Damien, Camille, Quentin. Merci pour tout ce que vous faites pour la cause des femmes, pour les bons moments passés sur les tatamis et pour tout ce que vous m'avez appris (les techniques secrètes et même les techniques provenant de la Mongolie !). Merci aux membres de l'association SELFWAY. Nos entraînements dans la bonne humeur et le partage ont été de réelles bouffées d'oxygène pendant mes années de thèse. A bientôt sur les tatamis !

Merci à mes proches, tatie Lisette, tatie Marie-Louise, Jeannine, Nadia, Sylvaine, Jean-Marie, Eric Naminzo (pou lo fonnkèr), tonton Doudou, Eric Duberville, J.H.S, merci pour tout. Merci à la famille de Stéphane, merci pour les moments de bonheur que nous passons ensemble, nos discussions, nos rires. Je vous souhaite le meilleur de ce que l'on peut avoir dans la vie.

Stéphane, ma moitié, paraît-il que les chercheurs qui ont le plus de chance sont ceux dont les découvertes bouleverseront le reste de leur existence. Merci d'avoir été ma plus grande découverte … qui plus est scientifique ! Trêve de plaisanterie, Stéphane, je te remercie pour ta patience, ton soutien, ta présence, tes encouragements, et toute cette personnalité et ces actions qui font que tu es une personne extraordinaire. Merci de faire partie de ma vie.

Ma chère famille, taties, tontons, cousines et cousins ; mes proches, merci d'avoir été présents depuis mes premiers pas jusqu'à maintenant. Merci d'avoir aussi été ma source d'inspiration et de motivation pour réussir et donner le meilleur de moi-même.

Mes chers parents, rien de tout cela n'aurait été possible sans vous. Je vous dédie ce travail, résultat de ces trois années d'acharnement, d'efforts, d'échecs et de petites victoires en gardant bien en mémoire que tout ce que j'ai fait n'égalera jamais tous les sacrifices que vous avez fait pour moi.

Maman, papa, merci pour tout.

POLE RECHERCHE

Écoles **D**octorales

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

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

Fait à Saint Denis, le 10 Décembre 2020

Signature :

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

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

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de tels droits.
En conséquence, chaque utilisateur doit :
- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux
Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.
L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».
L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (…) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.
Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage…) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur…) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.
Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.

Table des matières

RESUME 9
ABSTRACT 10
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES 11
LISTE DES ABREVIATIONS 12
LISTE DES FIGURES 13
LISTE DES TABLEAUX 13

INTRODUCTION GENERALE 14

PARTIE 1 : CONTEXTE DU TRAVAIL DE THESE 16
1. Contexte épidémiologique des maladies cardiovasculaires 16
2. La population de l'Ile de La Réunion exposée aux risques d'apparition des maladies cardiovasculaires 21
3. L'utilisation des Plantes Médicinales : de la tradition à l'industrialisation 28
4. Les polyphénols, principes actifs de plantes médicinales : une opportunité dans la lutte contre les maladies cardiovasculaires 47
PARTIE 2 : L'INTERET DE L'UTILISATION DES PLANTES MEDICINALES DANS LE CONTEXTE D'ATHEROSCLEROSE 71
5. L'athérosclérose 71
5.1. Définition et généralités 71
5.2. Rappels sur le métabolisme des lipides 73
5.3. De la perturbation métabolique à l'athérosclérose 77
5.4. Les différents stades de l'athérosclérose 84
6. L'intérêt de l'utilisation des plantes médicinales dans le contexte de perturbations métaboliques associées à l'apparition de maladies cardiovasculaires 92
6.1. Les propriétés antioxydantes 93
6.2. Les propriétés « anti-inflammatoires » 97
6.3. L'impact sur le métabolisme des lipoprotéines des macrophages 99

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE 103

DEMARCHE EXPERIMENTALE 105

EXPERIMENTATIONS ASSOCIEES A L'ARTICLE 1 105
EXPERIMENTATIONS ASSOCIEES A L'ARTICLE 2 109

ARTICLE 1 113

OBJECTIFS DE L'ETUDE 113
DISCUSSION ET PERSPECTIVES 145

ARTICLE DE REVUE 150

OBJECTIFS 150

ARTICLE 2 153

OBJECTIFS 185
DISCUSSION ET PERSPECTIVES 199

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES DES TRAVAUX DE THESE 203

REFERENCES 216

Résumé

Les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité à l'échelle mondiale. A l'origine de la majorité de ces maladies cardiovasculaires : l'athérosclérose. Cette pathologie est favorisée par différents facteurs de risques dont beaucoup sont en lien avec l'alimentation et l'hygiène de vie. Certaines régions comme l'Ile de La Réunion sont particulièrement exposées aux maladies cardiovasculaires en raison de la prévalence élevée de nombreux facteurs de risques. Un grand intérêt est notamment porté aux polyphénols présents dans les produits d'origine végétale, connus pour leur activité antioxydante et leur capacité à moduler les voies de signalisation cellulaire et le métabolisme.

La Réunion compte 22 plantes médicinales inscrites à la Pharmacopée Française qui pourraient potentiellement contenir des polyphénols. L'utilisation de tisanes traditionnelles à base de plantes médicinales pourrait donc être envisagée dans la prévention ou le traitement de l'athérosclérose. Cependant, il existe un manque de données scientifiques sur leur réelle bioactivité.

L'objectif de cette étude a été dans un premier temps de quantifier et de caractériser le contenu en polyphénols de huit plantes médicinales utilisées à La Réunion (préparées sous forme de tisanes ou d'extraits hydroacétoniques : *Hubertia ambavilla*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa*, *Aphloia theiformis*, *Hypericum lanceolatum*, *Pelargonium x graveolens*, *Syzygium cumini* et *Psiloxylon mauritianum*. L'activité antioxydante des différentes préparations de plantes médicinales a aussi été évaluée. Dans un second temps la bioactivité de décoctions de plantes a été évaluée sur un modèle cellulaire soumis à des conditions mimant l'athérosclérose. Nous avons mis en évidence la présence de polyphénols dans les préparations de plantes médicinales étudiées. Des expérimentations biochimiques et en *in vitro* ont montré que les tisanes à base de plantes médicinales ont exercé une activité antioxydante de manière dose-dépendante.

Nos travaux menés sur un modèle *in vitro* de macrophages ont montré les effets protecteurs des décoctions de plantes médicinales sur la cytotoxicité et la production de radicaux libres intracellulaires induites par des LDL oxydées, la captation des LDL oxydées et enfin sur l'activation de la voie NF-κB en présence de LPS d'*E. coli*.

Nos découvertes constituent une première avancée sur l'étude de la bioactivité tisanes utilisées à La Réunion. Nos résultats suggèrent qu'il existe un réel potentiel des plantes médicinales utilisées à La Réunion dans la prévention ou la régression de l'athérosclérose.

Mots-clés : Plantes médicinales, Ile de La Réunion, tisanes, bioactivité, polyphénols, antioxydant, athérosclérose

Abstract

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide. Atherosclerosis is the cause of the majority of these cardiovascular diseases. This pathology is promoted by several risk factors, many of which are related to diet and lifestyle. Certain regions such as Reunion Island are particularly exposed to cardiovascular diseases due to the high prevalence of multiple risk factors. In particular, there is a strong interest in the polyphenols present in plant-based products, which are known for their antioxidant activity and their ability to modulate cell signaling pathways and metabolism.

Reunion Island has 22 medicinal plants listed in the French Pharmacopoeia which could potentially contain polyphenols. The use of traditional herbal teas based on medicinal plants could therefore be considered in the prevention or treatment of atherosclerosis. However, there is a lack of scientific data on their effective bioactivity.

The objective of this study was first to quantify and characterize the polyphenol content of eight medicinal plants used in Reunion Island (prepared in the form of herbal teas or hydro-acetone extracts: *Hubertia ambavilla*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa*, *Aphloia theiformis*, *Hypericum lanceolatum*, *Pelargonium x graveolens*, *Syzygium cumini* and *Psiloxylon mauritianum*. The antioxidant activity of the various herbal preparations was also evaluated. Secondly, the bioactivity of plant decoctions was evaluated in a cellular model under conditions mimicking atherosclerosis. The presence of polyphenols in the medicinal plant preparations studied was demonstrated. Biochemical and *in vitro* experiments showed that herbal teas based on medicinal plants exerted antioxidant activity in a dose-dependent manner.

Our work carried out in an *in vitro* macrophage model showed the protective effects of medicinal plant decoctions on cytotoxicity and the production of intracellular free radicals induced by oxidized LDL, the uptake of oxidized LDL and finally on the activation of the NF-κB pathway in the presence of *E. coli* lipopolysaccharide.

Our discoveries constitute a first step forward in the study of the bioactivity of herbal teas used in Reunion Island. Our results suggest that there is a real potential for the medicinal plants used in Reunion in the prevention or regression of atherosclerosis.

Keywords: Medicinal plants, Reunion Island, herbal teas, bioactivity, polyphenols, antioxidant, atherosclerosis

Publications et communications scientifiques

Publications scientifiques

Article 1 : Evaluation of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Aqueous Extracts from Eight Medicinal Plants from Reunion Island: Protection against Oxidative Stress in Red Blood Cells and Preadipocytes (Soumission Août 2020 – Publication Octobre 2020)

Article de revue : Macrophages in atherosclerosis: first or second row players? (Soumission Décembre 2020)

Article 2 : Protective effects of medicinal plant decoctions on macrophages in the context of atherosclerosis (Soumission Décembre 2020- Publication Janvier 2021)

Communication scientifique

Présentation orale « Les procédés de préparation de tisanes à base de plantes médicinales par infusion ou décoction modulent leurs teneurs en polyphénols mais pas leurs propriétés antioxydantes » - 20 Novembre 2018 – Colloque International des Plantes Aromatiques et Médicinales (CIPAM)

Actions de vulgarisation scientifique

Participation au reportage « Les plantes médicinales de La Réunion, de la canopée aux labos de pointe » (Janvier 2019 – Diffusion sur France 24)

Participation au reportage « C'est pas le bout du monde » sur les plantes médicinales de la Réunion. (Décembre 2020 – Diffusion sur France 3)

Participation au concours « Ma Thèse en 180 secondes » (Mars 2020)

Présentation orale « L'utilisation des plantes médicinales de La Réunion dans le contexte diabète/obésité » - 10 Novembre 2019 – Manifestation Zerbaz en fèt

Présentation orale « L'utilisation traditionnelle des plantes médicinales à La Réunion dans le contexte de perturbation métaboliques » - 29 Avril 2020 – Animation d'une conférence en ligne sur invitation par l'Association « Les amis de l'Université ».

Liste des abréviations

3-OHBA acide 3-hydroxybenzoïque
3,4-DiOHPPr acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique
AAPH 2.2'-azobis-2-aminopropane dihydrochloride
ABCA1 ATP Binding Cassette A1
ABCG1 ATP Binding Cassette G1
ABTS 2,2'-azino-bis acid
ACAT Acyl-CoA Cholesterol Acyl Transferase
ADME Absorption, Distribution Métabolisme Excrétion
ALD Affections de Longue Durée
AMPK AMP-activated Protein Kinase
ANSM Agence Nationale de la Sécurité du Médicament
APLAMEDOM Association des Plantes Aromatiques et Médicinales de La Réunion
ATP Adénosine Triphosphate
AUC Aire sous la courbe
AVC Accident Vasculaire Cérébral
BAL 2,3-dimercaptopropanol (British Anti-Lewisite)
C/EBP C/Element Binding
CAT Catalase
CBG Cytosolic Beta glucosidase
CCL2 Chemokine ligand 2
CD36 Cluster de différenciation 36
CETP Cholesteryl ester transfer protein
CM Chylomicrons
DéTROI Diabète Athérothrombose Réunion Océan Indien
DGCCRF Direction générale de la Concurrence, de la Consommation et de la répression des fraudes
DOM Département d'Outre-Mer
DPPH 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
DREES Direction de la Recherche, des Études, de l'Évaluation et des Statistiques
EC Épicatéchine
ECG Épicatéchine Gallate
EGC Epigallocatéchine
EGG Épigallocatéchine Gallate
ERK Extracellular signal-regulated kinases
ESC European Society of Cardiology
ESS Endothelial Shear Stress
FABP Fatty Acid Binding Protein
FAS Fatty Acid Synthase
FRAP Ferric Reducing Antioxidant Power Assay
GSH Gluthation
HAT Hydrogen Atom Transfer
HDL High Density Lipoprotein
HFD High Fat Diet
HMG-CoA Hydroxy Methyl Glutaryl Coenzyme A
HO-1 Hème oxygénase
HPLC-MS High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
HUVEC Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM Intracellular Adhesion Molecule
IDH Indice de Développement Humain
IDL Intermediate Density Lipoprotein
IL-6 Interleukine 6
IMC Indice de Masse corporelle
iNOS Nitric Oxide Synthase
INPES Institut national de prévention et d'éducation pour la santé
JNK c-Jun N-terminal Kinase
LCAT Lécithine-Cholestérol Acytransférase
LDL Low Density Lipoprotein
LDLR LDL Receptor
LOX Lectin-type Oxidized LDL Receptor 1
LPS Lipopolysaccharide
LRP LDL-Receptor Related Protein
MAE Extraction Assistée par Micro-ondes
MAPK Mitogen-Activated Protein Kinases
MCP-1 Monocyte chemoattractant protein 1
MCV Maladies Cardiovasculaires
MG-CSF Macrophages/granulocyte colony-stimulating factor
MMP Métalloprotéinase
MPO Myélopéroxydase
MRP Multidrug Resistance Associated Protein
MTP Microsomal Transfer Protein
NADPH Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NF-κB Nuclear Factor kappa B
Nox NADPH Oxidase
OMS Organisation Mondiale de la Santé
ORAC Oxygen Radical Absorbance Capacity
ORS OI Observatoire Régional de la Santé Réunion Océan Indien
PAL Phénylalanine Ammonia Lyase
PAM Plantes Aromatiques et Médicinales
PCET Proton Coupled Electron Transfer
PGC1-α PPAR Gamma Coactivator 1-alpha
Phe Phénylalanine
PI3K Phosphoinositide 3-Kinase
PON Paraoxonase
PPAR Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
REDIA Réunion Diabète
RNS Reactive Nitrogen Species
ROS Reactive Oxygen Species
SEAP Secreted Alkaline Phosphatase
SET-PT Sequential Electron transfer – Proton Transfer
SGLT1 Intestinal Sodium-Dependent D-glucose co-transporter 1
SOD Superoxide Dismutase
SPLET Sequential Proton Loss-Electron Transfer
SRB-1 Scavenger Receptor class B type 1
SREBP Sterol regulatory element-binding protein
TBARS Thiobarbituric acid reactive species
TLR Toll-Like Receptors
TNF-α Tumor Necrosis Factor alpha
Trp Tryptophane
Tyr Tyrosine
UDP Uridine Diphosphate
UV Ultra-Violet
VCAM Vascular adhesion molecule
VLDL Very Low Density Lipoprotein

Liste des figures

Figure 1 : Répartition de la mortalité associée aux maladies cardiovasculaires à l'échelle mondiale 17
Figure 2 : Taux standardisés de personnes ayant reçu des soins pour des maladies cardiovasculaires parmi les bénéficiaires du régime général de santé, par région française, en 2014. 18
Figure 3 : Répartition des taux de mortalité par maladies cardiovasculaires selon la commune à La Réunion (2011-2013). 20
Figure 4 : Les plantes médicinales de La Réunion inscrites à la Pharmacopée Française.....28
Figure 5 : Modes d'utilisation des plantes médicinales de l'Ile de La Réunion.....34
Figure 6 : Diagramme de fabrication d'une préparation de plante médicinale à l'échelle industrielle.....40
Figure 7 : Les différentes méthodes d'extraction des principes actifs végétaux et leurs produits de transformation 42
Figure 8 : Processus de formulation d'un médicament à partir des plantes médicinales. 44
Figure 9 : Les différents types de principes actifs retrouvés dans la matière végétale.....47
Figure 10 : Les différentes familles de polyphénols et leurs composés.....50
Figure 11 : Évolution de la concentration plasmatique en hespérétine après consommation de différentes boissons 54
Figure 12 : Métabolisme des polyphénols issus de l'alimentation.....59
Figure 13 : Organisation des différents feuillets composant une artère et schématisation du processus d'athérosclérose. 71
Figure 14 : Le métabolisme des lipoprotéines.....76
Figure 15 : Observations par microscopie électronique de l'adhésion leucocytaire au niveau des stries lipidiques.....86
Figure 16 : Observation par microscopie électronique du cytoplasme d'une cellule spumeuse (foam cell) 88
Figure 17 : Éléments de la littérature relatifs au contenu en polyphénols des espèces *A. triplinervis, A theiformis, H. ambavilla, D. viscosa* et *P. mauritianum* 205
Figure 18 : Protocole utilisé pour l'expérimentation pilote.....208
Figure 19 : Évaluation des teneurs en cholestérol et triglycérides plasmatiques 209
Figure 20 : Les polyphénols majoritaires de la tisane de *P. mauritianum* et les métabolites détectés et quantifiés dans le plasma de souris ayant consommé la décoction de *P. mauritianum*.....211
Figure 21 : Métabolites secondaires de quercétine et kaempférol détectés et quantifiés dans le plasma de souris ayant consommé de la tisane de *P. mauritianum*. 212
Figure 22 : Molécules issues de plantes médicinales ayant fait l'objet de valorisations sous forme de brevets. 213
Figure 23 : Mes travaux de thèse en une image.....215

Liste des tableaux

Tableau 1 : Indice de développement humain et classement au rang mondial de différentes régions de France.....19
Tableau 2 : Répartition des décès par maladies cardiovasculaires selon les pathologies à La Réunion (2011-2013).....21
Tableau 3 : Comparaison des facteurs de risque d'apparition d'une maladie cardiovasculaire entre La Réunion et la France métropolitaine.....26
Tableau 4 : Exemples d'utilisation de plantes médicinales de La Réunion 31
Tableau 5 : Les principaux statuts applicables aux plantes et produits à base de plantes 37
Tableau 6 : Métabolites issus de la transformation de composés parents par le microbiote intestinal.....57
Tableau 7 : Classification des lipoprotéines.....74
Tableau 8 : Sources de production de radicaux libres et mécanismes antioxydants 79

Introduction générale

Les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité au monde. L'athérosclérose est à l'origine de la majorité des maladies cardiovasculaires et se caractérise par des dépôts d'origine lipidique associés à une fibrose et éventuellement une calcification menant à une rigidification de la paroi artérielle. Il existe différents facteurs de risque favorisant l'initiation et la progression de l'athérosclérose. A La Réunion, la prévalence de ces facteurs de risque comme le diabète, l'hypertension, l'obésité, la sédentarité ou le tabagisme est élevée et près d'un quart des décès est dû à des complications cardiovasculaires. Parmi les stratégies de prévention et de traitement de l'athérosclérose, l'approche nutritionnelle est particulièrement importante. Par ailleurs, une autre alternative se dessine dans ce contexte : l'utilisation de tisanes à base de plantes médicinales est plébiscitée à La Réunion. Cependant, le manque de documentation scientifique sur le mode de préparation et la bioactivité des tisanes rend leur utilisation hasardeuse. Pourtant, la bioactivité de ces plantes médicinales pourrait être associée à des composés bioactifs connus et largement documentés dans la littérature scientifique : les polyphénols.

L'enjeu de ce travail de thèse est d'abord d'apporter des informations nouvelles sur la composition en polyphénols des plantes médicinales de La Réunion préparées soit de manière traditionnelle sous forme de tisanes (infusions ou décoctions) soit sous forme d'extraits hydroacétoniques riches en polyphénols. A l'issue de cette première approche, la bioactivité d'un type de tisane sera évaluée sur un modèle cellulaire dans un contexte mimant certains aspects de l'athérosclérose. Pour ce projet, huit plantes médicinales utilisées à La Réunion ont été choisies : *Hubertia ambavilla*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa*, *Aphloia theiformis*, *Hypericum lanceolatum*, *Pelargonium x graveolens*, *Syzygium cumini*, *Psiloxylon mauritianum*.

Les arguments soutenant la pertinence de ce projet scientifique sont présentés en première partie. Il s'agit de comprendre pour quelles raisons cette étude s'axe sur l'athérosclérose et pourquoi l'utilisation des plantes médicinales de La Réunion (qui connaît actuellement un essor majeur favorisé par l'industrialisation) est une piste de recherche vers de nouvelles approches thérapeutiques. Une attention particulière est alors portée sur des composés reconnus pour leur bioactivité et pouvant être contenus dans ces plantes médicinales : les polyphénols.

Le raisonnement que nous avons apporté pour répondre à notre questionnement est dévoilé implicitement dans la seconde partie : Comment l'utilisation des plantes médicinales de La Réunion

pourrait présenter un intérêt dans la prévention ou le traitement de l'athérosclérose ? L'étiologie de l'athérosclérose est abordée de façon à :

- Mettre en avant des phénomènes (*par exemple : le stress oxydant ou la formation de cellules spumeuses*) sur lesquels nous avons évalué la bioactivité des tisanes à base de plantes médicinales.
- Mettre en évidence le choix des conditions expérimentales (*modèle cellulaire, conditions pour reproduire certains aspects de l'athérosclérose*)

Une argumentation est apportée sur l'intérêt d'utiliser les plantes médicinales de La Réunion dans ce contexte. Dans cette partie, les expérimentations effectuées par le Laboratoire DéTROI et d'autres équipes de recherche sur les plantes médicinales utilisées à L'Ile de La Réunion sont renseignées de façon à présenter les ressources scientifiques dont nous disposions pour mener à bien notre projet.

Des travaux plus poussés (études cliniques, expérimentations animales), menés sur des plantes médicinales non connues à La Réunion ou sur des polyphénols pouvant être potentiellement présents dans les plantes médicinales utilisées à La Réunion ont aussi été mentionnés de façon à étayer les arguments en faveur de l'utilisation de l'utilisation des plantes médicinales dans le contexte de l'athérosclérose.

Les travaux menés sur notre thématique sont présentés sous la forme de différents articles.

L'***article 1*** : « Evaluation of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Aqueous Extracts from Eight Medicinal Plants from Reunion Island: Protection against Oxidative Stress in Red Blood Cells and Preadipocytes » ayant pour objectif de déterminer l'impact des procédés de transformation sur la composition en polyphénols, la composition et l'activité antioxydante de huit plantes médicinales de La Réunion, est présenté et fait l'objet d'une discussion.

La ***revue*** : « Macrophages in atherosclerosis : first or second row players ? » apparaît ensuite. Dans ce travail, une discussion opposant deux points de vue sur l'implication des macrophages dans l'athérosclérose est mise en avant et apporte les arguments ayant conduit au choix du modèle cellulaire utilisé expérimentalement.

Enfin, l'***article 2*** : « Protective effects of medicinal plant decoctions on macrophages in the context of atherosclerosis » ayant pour objectif d'étudier les effets de tisanes à base de plantes médicinales de La Réunion sur un modèle *in vitro* mimant des aspects de l'athérosclérose est présenté et fait l'objet d'une discussion.

Une discussion générale et les perspectives apportées par ces travaux sont ensuite présentées. La conclusion de ce manuscrit met en avant les actions menées pour apporter des informations nouvelles à cette thématique et les possibles axes de recherche envisageables à l'issue de ces travaux.

Approche bibliographique

Partie 1 : Contexte du travail de thèse

1. Contexte épidémiologique des maladies cardiovasculaires

1.1. Les maladies cardiovasculaires à l'échelle mondiale

Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent la première cause de mortalité dans le monde et sont à l'origine de 31 % des décès dans la population mondiale soit 17,9 millions de décès par an. L'athérosclérose, à l'origine de la majorité des évènements cardiovasculaires mortels, se caractérise par la rigidification et l'obstruction progressives des artères en raison d'un dépôt d'origine lipidique constituant une plaque d'athérome. L'infarctus et les accidents vasculaires cérébraux, résultats du processus d'athérosclérose, arrivent en tête de liste et constituent près de 85 % des causes de mortalité cardiovasculaire.

Il existe une inégalité dans la répartition des maladies cardiovasculaires dans le monde. En effet, l'étude menée par Roth *et al.,* sur leur épidémiologie à l'échelle mondiale a révélé qu'il existait un lien entre certains indices socio-démographiques (revenu par habitant, niveau d'instruction et fécondité) et la mortalité associée à ces pathologies (Roth et al., 2017). Dans l'étude « PURE Study », l'équipe de Yusuf *et al.* a mis en évidence que les pays émergents, présentant un indice socio-démographique peu élevé, font partie des régions les plus concernées avec près de 75 % des décès associés aux maladies cardiovasculaires et que la dégradation des conditions de vie est associée à ces maladies (Yusuf et al., 2011).

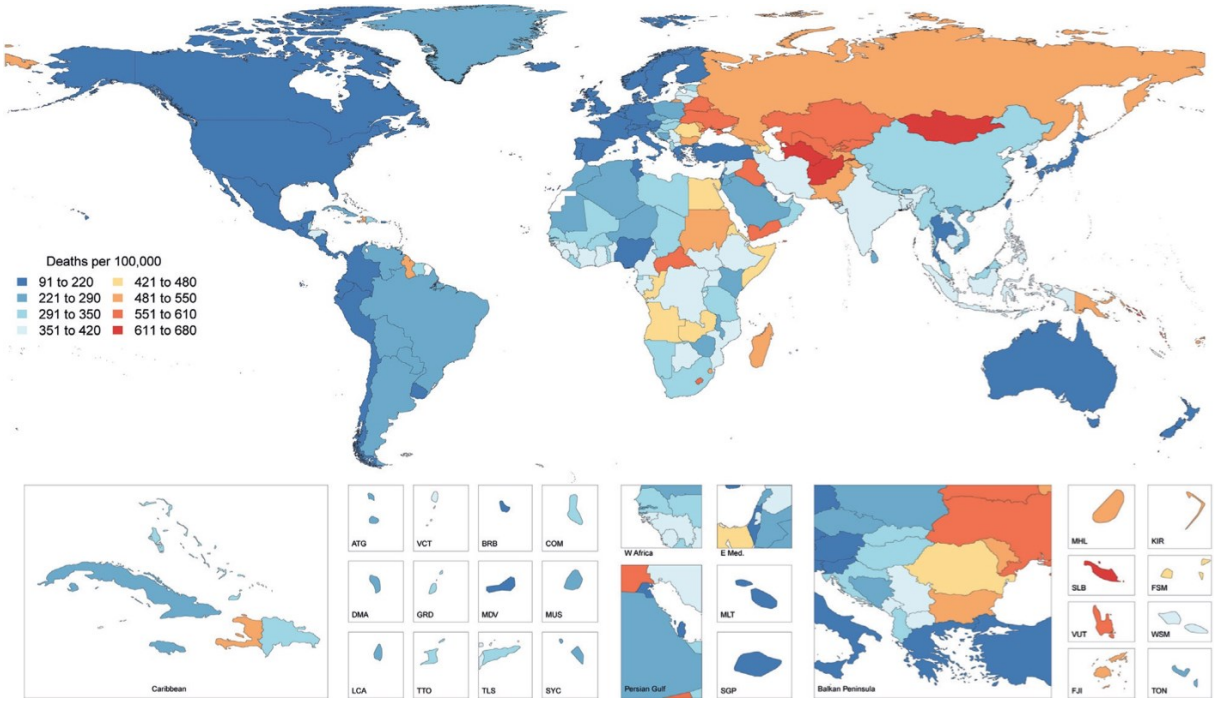


Figure 1 : Répartition de la mortalité associée aux maladies cardiovasculaires à l'échelle mondiale (Source : Roth et al. 2017)

La carte présentée en **Figure 1** met en évidence la répartition de la mortalité associée aux maladies cardiovasculaires en fonction de la zone géographique. Il est possible d'observer que dans des régions présentant une forte croissance de l'indice socio-démographique (revenu par habitant, niveau d'instruction et fécondité), le risque de mort par MCV est relativement bas : c'est le cas pour l'Europe Occidentale, le Canada, l'Australie et la Chine (Roth et al., 2017).

1.2. Les maladies cardiovasculaires à l'échelle nationale

Selon l'étude menée par de Peretti *et al.* parue dans les dossiers de la Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques (DREES) en Mars 2017, les maladies cardiovasculaires constituent la deuxième cause de mortalité (après le cancer) en France chez les hommes et la première cause de mortalité chez les femmes. En 2014, près de 139 000 décès dus aux MCV ont été recensés en France. Cette mortalité est d'autant plus exacerbée chez les hommes qu'elle présente trois fois plus de mortalité précoce (en dessous de 65 ans) que chez les femmes. Dans le bilan national établi par l'Observatoire Régional de la Santé Réunion Océan Indien (ORS OI), il est précisé qu'en France, les maladies cardiovasculaires sont non seulement les premières causes de demande d'hospitalisation en court séjour mais qu'elles

constituent aussi le premier motif d'admission en Affections de Longue Durée (ALD). Sur la période allant de 2012 à 2014, près de 430 000 admissions ont été recensées. Des statistiques plus récentes obtenues en 2017 ont mis en évidence l'importance des dépenses liées au traitement du risque vasculaire (hors pathologies) qui s'élevaient à 4,8 milliards d'euros (Lyon-Caen, 2019).

De la même façon qu'à l'échelle mondiale, la répartition des maladies cardiovasculaires sur le territoire Français reste inégale comme le montre la **Figure 2**, issue d'une étude reposant sur les montants remboursés par l'assurance maladie en France (Tuppin et al., 2016).

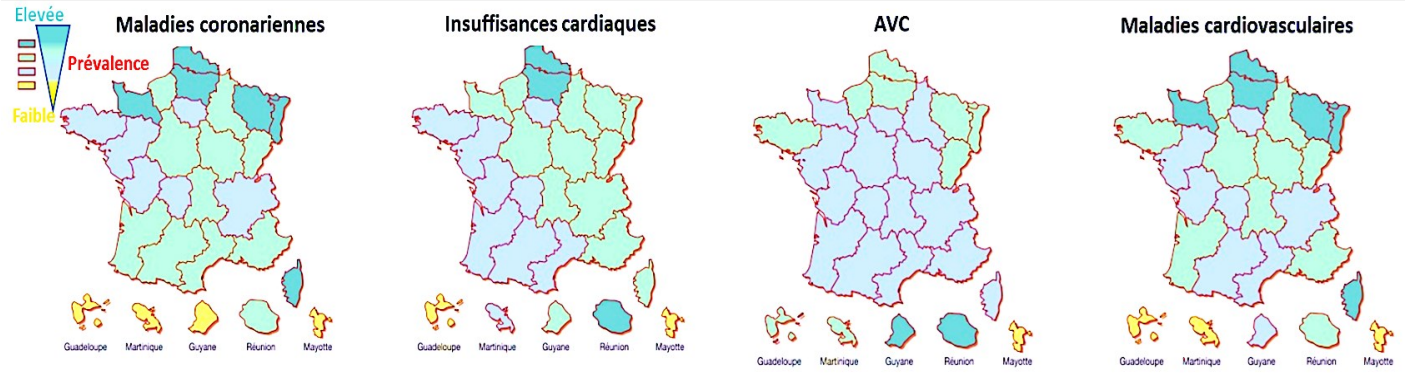


Figure 2 : Taux standardisés (âge et sexe) (%) de personnes ayant reçu des soins pour des maladies cardiovasculaires parmi les bénéficiaires du régime général de santé, par région française, en 2014. Inspiré par - Archives of Cardiovascular Disease (2016)

A la lecture de la **Figure 2**, il est possible de distinguer différentes tendances non seulement en termes de répartition des MCV mais aussi en termes de type d'expression clinique de l'athérosclérose. Par exemple, les régions du nord de la France et la région Corse sont celles qui présentent une prévalence plus élevée pour les maladies coronariennes contrairement à la tendance observée dans les Départements d'Outre-Mer (DOM), hors Ile de La Réunion.

Une première hypothèse pouvant être émise pour expliquer cette disparité dans la répartition de ces maladies est la suivante : certains facteurs environnementaux et comportementaux (associés notamment au mode de vie) pourraient avoir une influence *sur les facteurs de risques* d'apparition des maladies cardiovasculaires.

Un autre aspect important révélé au travers de cette carte est que les DOM ne présentent pas forcément les mêmes tendances entre eux. Il existe notamment une différence de niveaux de vie dans ces régions mesurée par l'Indicateur de Développement Humain (IDH, qui tient

compte du Produit Intérieur Brut par habitant, de l'espérance de vie à la naissance et du niveau d'éducation des jeunes de 17 ans et plus).

Le **Tableau 1** publié par l'Agence Française de Développement en 2010 (Doligé & Vergoz, 2014) montre les différences d'indicateur de développement humain entre différents départements d'Outre-Mer en comparaison avec la France métropolitaine.

Tableau 1 : Indice de développement humain et classement au rang mondial de différentes régions de France

Région	IDH	Classement au rang mondial
France métropolitaine	0,883	20
Guadeloupe	0,822	38
Martinique	0,814	39
IDH seuil des pays à niveau d'IDH très élevé	0,780	
La Réunion	0,774	54
Guyane	0,740	73
IDH Seuil des pays à niveau d'IDH élevé	0,697	
Mayotte (2005)	0,637	107

L'Ile de La Réunion, malgré son classement parmi les régions au niveau de développement élevé, affiche une forte prévalence pour toutes les pathologies citées (maladies coronariennes, insuffisances cardiaques et AVC).

1.3. Les maladies cardiovasculaires à l'échelle de La Réunion : Une situation alarmante

Selon l'étude de l'Observatoire Régional de la Santé Océan Indien (ORS OI), en 2014, près de 22 600 réunionnais étaient atteints d'une pathologie cardiovasculaire, ce qui représente 19 % de l'ensemble des patients inscrits en ALD. A La Réunion, près de 1100 décès dus aux MCV sont recensés chaque année, représentant plus d'un quart des décès. Le taux de mortalité observé dans cette région est 1,3 fois plus élevé qu'en France métropolitaine quel que soit le sexe (*Premiers résultats du Baromètre santé DOM 2014 - La Réunion*, 2014; *Tableau de Bord Des Outre-Mer*, 2018).

A l'Ile de La Réunion, la mortalité associée aux MCV reste inégalement répartie en fonction des communes comme présenté en **Figure 3**.

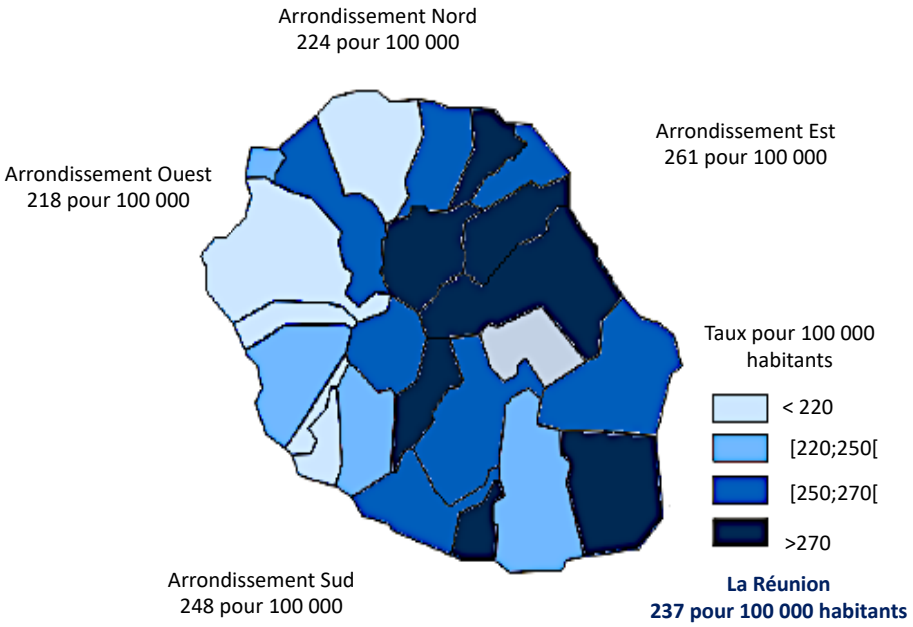


Figure 3 : Répartition des taux de mortalité par maladies cardiovasculaires selon la commune à La Réunion (2011-2013). Source Tableau de bord ORS OI

Sur la période de 2011 à 2013, l'Est et le Sud de l'île présentaient des taux de mortalité respectifs de 261 et 248 pour 100 000 habitants. Certaines communes rurales telles que l'Entre-Deux, Salazie, Bras-Panon et Ste Suzanne font partie des zones affichant des taux de mortalité plus élevés, supérieurs à 270 décès pour 100 000 habitants. Contrairement à ces régions, le Nord et l'Ouest de l'île présentent des taux de mortalité beaucoup moins élevés.

Le rapport émis par l'ORS OI montre une diminution de la mortalité par maladies cardiovasculaires de l'ordre de 40 % entre les périodes 2000-2002 et 2011-2013. Cependant les statistiques avancées par l'étude Inserm CépiDC montrent que les MCV restent une des causes prédominantes de la mortalité.

Avec une moyenne de 522, soit 23 % des décès sur la période 2011-2013, les MCV constituent la deuxième cause de mortalité chez l'Homme (la première cause étant les cancers). Chez les femmes le nombre de décès observé sur la même période était de 559 soit 30 % de l'ensemble des décès sur l'Ile et constituant la première cause de mortalité.

Comme le montre le **Tableau 2**, à la Réunion, les maladies vasculaires cérébrales et les cardiopathies ischémiques représentent à elles seules près de 57 % des causes de décès par maladie cardiovasculaire (*Premiers résultats du Baromètre santé DOM 2014 - La Réunion*, 2014).

Tableau 2 : Répartition des décès par maladies cardiovasculaires selon les pathologies à La Réunion (2011-2013) - Sources Tableau de bord ORS OI (2017) / Inserm, CépiDC, INPES

Pathologies	n	%
Maladies vasculaires cérébrales	324	30
Cardiopathies ischémiques	291	27
Insuffisance cardiaque	93	9
Maladies hypertensives	92	8
Autres	281	26
Ensemble	**1 081**	**100**

Bien que la mortalité associée aux maladies cardiovasculaires soit décroissante, les hommes sont davantage concernés par les décès prématurés (avant l'âge de 65 ans). Par exemple, en 2012 la part des décès prématurés chez l'homme était de 30 % tandis que celle des femmes étaient de 13 %. Cependant, le taux de mortalité régional reste supérieur à celui observé en France métropolitaine pour les deux sexes : chez les hommes les taux observés sont 1,5 fois supérieurs et chez les femmes les taux sont 2 fois supérieurs à la moyenne nationale.

2. La population de l'Ile de La Réunion exposée aux risques d'apparition des maladies cardiovasculaires

Différents paramètres peuvent être à l'origine du contexte épidémiologique observé à La Réunion. Plusieurs facteurs de risque ont un impact direct sur l'apparition des maladies cardiovasculaires. Certains, directement liés au comportement et au métabolisme sont modifiables, tandis que d'autres comme la génétique ou l'âge ne le sont pas. Dans le cadre de

la prévention et du traitement primaire des MCV, des actions sont menées sur les facteurs de risque modifiables .

Rappels sur les facteurs d'apparition de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires

Selon les Guidelines publiées par l'***European Society of Cardiology*** (ESC) en 2019, il existe différents types de composantes pouvant avoir un impact sur l'apparition de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires :

- ***Les facteurs comportementaux***
  - Tabagisme
  - Inactivité physique
  - Déséquilibre alimentaire
  - Alcoolisme
- ***Les facteurs métaboliques***
  - Hypertension artérielle
  - Hyperglycémie (Diabète)
  - Dyslipidémie (notamment l'hypercholestérolémie)
  - Surpoids
  - Obésité
  - Composition du microbiote
- ***Les autres facteurs***
  - Pauvreté
  - Age avancé
  - Genre
  - Prédisposition génétique
  - Facteurs psychologiques (stress)

Selon les chiffres de l'Enquête menée par l'Institut national de prévention et d'éducation pour la santé (INPES) sur 2094 individus âgés de 15 à 75 ans, la population réunionnaise serait fortement exposée à certains facteurs de risques de maladies cardiovasculaires (*Premiers résultats du Baromètre santé DOM 2014 - La Réunion*, 2014).

2.1. Le changement de régime alimentaire conduisant au déséquilibre nutritionnel

L'analyse du comportement alimentaire de la population réunionnaise a mis en évidence une consommation excessive de corps gras (huile, beurre et margarine) soit 31 % de plus qu'en France métropolitaine et une surconsommation de sucre (15 % de plus que la moyenne nationale) (Brasset et al., 2015). Cette étude a aussi montré que les ménages à revenus peu élevés présentaient les plus forts taux de consommation de matière grasse et de sucre. En 2014, le pourcentage de Réunionnais consommant des boissons sucrées au moins 4 fois par semaine était de 30 %, parmi eux 20 % en consommaient tous les jours (Ricquebourg, 2018).

Il a également été observé que la consommation de riz était dix fois supérieure à celle de la population métropolitaine. Concernant les fruits et légumes, la consommation observée chez les ménages réunionnais est respectivement 52 % et 6 % moins élevée qu'en France métropolitaine. Il faut savoir que le riz est à la base de l'alimentation réunionnaise et sa consommation remonte à l'époque de l'esclavage et de l'engagisme.

Dans l'article de L. Pourchez décrivant l'évolution des habitudes alimentaires à l'Ile de La Réunion, il est précisé que le passé colonial de l'île a eu une forte influence sur la tendance alimentaire, par exemple : favoriser les féculents au détriment des fruits. A cette tendance alimentaire s'est ensuite ajoutée l'influence de la société de consommation favorisant la substitution d'aliments « frais » par des aliments transformés, jugés plus modernes et plus pratiques. Cette modification du régime alimentaire traditionnel pourrait être à l'origine d'une nutrition inadaptée favorisant l'installation de perturbations métaboliques (Brasset et al., 2015; Pourchez, 2006).

2.2. La sédentarité

La sédentarité peut être évaluée selon quatre paramètres : les activités professionnelles, les déplacements hors du domicile, les activités dans le cadre de la vie domestique et celle dans le cadre des loisirs (sport).

Les analyses du Baromètre Santé auprès de la population, reposant sur un seul paramètre (la pratique d'une activité sportive) ont souligné que plus de 4 Réunionnais sur 10 pratiquent une

activité physique régulière (sport/loisirs). Bien que les ressources en équipements sportifs soient inférieures à la norme nationale (29 équipements pour 10 000 habitants contre 40 pour 10 000), la fréquence de la pratique d'une activité physique à La Réunion est supérieure à celle observée en métropole.

Sur l'étude menée, 10 % de la population étaient concernés par la sédentarité. En revanche, l'enquête menée en milieu scolaire et chez les moins de 18 ans a montré qu'il existait un phénomène de sédentarité (mesuré à partir du nombre d'heures passées devant la télévision) qui pourrait être à l'origine d'un surpoids et d'une absence de pratique d'une activité physique à l'âge adulte (Ricquebourg, 2018).

2.3. Les perturbations métaboliques

Les perturbations métaboliques comme le diabète, les dyslipidémies, le surpoids et l'obésité sont des facteurs favorisant l'apparition de maladies cardiovasculaires. En effet, ces pathologies sont associées à des taux anormaux de glucose (pour le diabète) et de lipides circulants (pour les dyslipidémies, le surpoids et l'obésité). De plus, elles s'accompagnent de phénomènes de stress oxydant et d'un état pro-inflammatoire chronique qui ont pour effet d'aggraver la maladie (Tune et al., 2017).

2.3.1. Le diabète

Le bilan de l'ORS OI de 2012, reposant sur les données de l'étude Réunion Diabète (REDIA), a montré que la prévalence du diabète traité pharmacologiquement à La Réunion atteignait les 9,8 %, soit plus du double de la prévalence observée à l'échelle nationale. Ce résultat alarmant, laissant présager un nombre de diabétiques (dépistés et non dépistés) encore plus élevé, a connu une évolution au cours des années puisqu'en 2015, l'enquête du SNIIRAM -DCIR a estimé que la prévalence du diabète à La Réunion était de 10,21 % (contre 5,4 % à l'échelle nationale) (Favier et al., 2005; Filipovic-Pierucci et al., 2016; Polton & Ricordeau, 2011).

2.3.2. Le surpoids et l'obésité

L'obésité et le surpoids sont des facteurs de risque d'apparition du diabète de type 2, d'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires. Il faut savoir que près de 38 % de la population réunionnaise est concernée par le surpoids (indice de masse corporelle IMC

supérieur à 25 km/m²) ; on y compte également 11 % d'obèses, ce qui représente plus d'un réunionnais sur 10 en situation d'obésité. Bien que les prévalences de l'obésité et du surpoids soient légèrement inférieures à ce qui est observé en métropole (respectivement 11 et 27 % vs 12 et 29 % à l'échelle nationale), on remarque une répartition différente de ces dernières. A La Réunion, les femmes sont plus concernées par l'obésité que les hommes (14 % vs 8 %). De plus, le surpoids et l'obésité maternelle affichent aussi des prévalences élevées. Le taux régional de recours hospitalier pour obésité et surpoids est beaucoup plus élevé à la Réunion, il dépasse le taux national de près de 1,5 fois (*Tableau de Bord Des Outre-Mer*, 2018).

Cependant, le rapport du Baromètre santé met en évidence qu'il existe une différence selon l'âge des individus : à La Réunion le taux d'obésité avant les 45 ans est plus élevé qu'en métropole (8 %). Le tableau de bord de l'ORS a également souligné une prévalence élevée d'obésité et de surpoids infantiles à La Réunion en 2017. La fréquence de l'obésité augmente avec l'âge chez les enfants : 6 % des enfants de 5 à 6 ans sont concernés par l'obésité. Cette prévalence atteint les 9 % pour les 15-25 ans ce qui représente 1 jeune sur 5. Là encore, l'obésité, le surpoids maternel, le diabète pendant la grossesse, associés à une alimentation non équilibrée et à une sédentarité pourraient être à l'origine de la forte prévalence observée à La Réunion (Ricquebourg, 2018; *Tableau de Bord Des Outre-Mer*, 2018).

2.3.3. Les dyslipidémies

Bien que les statistiques relatives aux dyslipidémies à La Réunion soient peu documentées, il existe quelques ressources apportées par les travaux du Laboratoire DéTROI sur la prévalence des dyslipidémies chez les patients atteints d'une maladie cardiovasculaire. L'étude du Dr Catan a été menée dans le cadre de la recherche de marqueurs d'athérothrombose carotidienne. Les statistiques d'une cohorte de 109 patients ayant subi une endartérectomie, ont mis en évidence la prévalence de la dyslipidémie (présente chez 87 % des patients) (Catan, 2018). D'autres études prospectives, comme celle menée par le Dr Couret, ont permis d'établir un lien entre les évènements cardiovasculaires (AVC ischémiques ou hémorragiques) et les dyslipidémies. Dans son étude menée sur 124 patients réunionnais présentant des symptômes d'AVC, l'antécédent "dyslipidémie" arrive en troisième position derrière l'hypertension artérielle et le diabète (Couret, 2018).

2.4. La Réunion, un département fortement exposé aux facteurs de risque

Malgré une faible sédentarité, des taux de surcharge pondérale, d'obésité et de tabagisme inférieurs à la moyenne nationale, La Réunion affiche des chiffres alarmants de prévalence du diabète et de l'obésité avant les 45 ans.

Parmi les facteurs de risque d'apparition des maladies cardiovasculaires présentés dans le **Tableau 3**, le diabète constitue le facteur de risque auquel la population de La Réunion est la plus exposée avec une prévalence 1,8 fois plus élevée qu'à l'échelle nationale. Le diabète de type 2 (qui concerne près de 1 réunionnais sur 10) est lui-même favorisé par le surpoids, l'obésité et le déséquilibre nutritionnel.

Tableau 3 : Comparaison des facteurs de risque d'apparition d'une maladie cardiovasculaire entre La Réunion et la France métropolitaine. Source : Tableau de bord sur les maladies cardiovasculaires à La Réunion (2017)

Facteurs de risque d'apparition d'une maladie cardiovasculaire	Réunion	Métropole
Fréquence du diabète traité pharmacologiquement en 2015	10,21 %	5,4 %
Fréquence de la surcharge pondérale en 2014 (population 15-75 ans)	38 %	41 %
Dont fréquence de l'obésité	11%	12%
Fréquence de l'obésité avant 45 ans	12 %	8%
Fréquence d'une activité physique moins d'une fois par semaine	12 %	22%
Fréquence du tabagisme quotidien en 2014 (population 15-75 ans)	25 %	28 %

Bien qu'il n'y ait que peu d'informations quant au nombre de patients atteints de dyslipidémie à La Réunion, les études auprès de patients atteints de maladies cardiovasculaires suggèrent une prévalence de la dyslipidémie chez ces patients. Cette hypothèse semble confortée par les statistiques portant sur l'obésité et le surpoids qui suggèrent aussi qu'une partie de la population réunionnaise pourrait être concernée par les dyslipidémies qui sont associées à ces pathologies (hypercholestérolémie et hypertriglycéridémie).

Bilan Les maladies cardiovasculaires : ce qu'il faut retenir

- La prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires constituent un enjeu mondial.
- A l'origine de la majorité de ces maladies cardiovasculaires, un processus d'obstruction et de durcissement des artères sous l'effet de dépôts d'origine lipidique : l'athérosclérose.

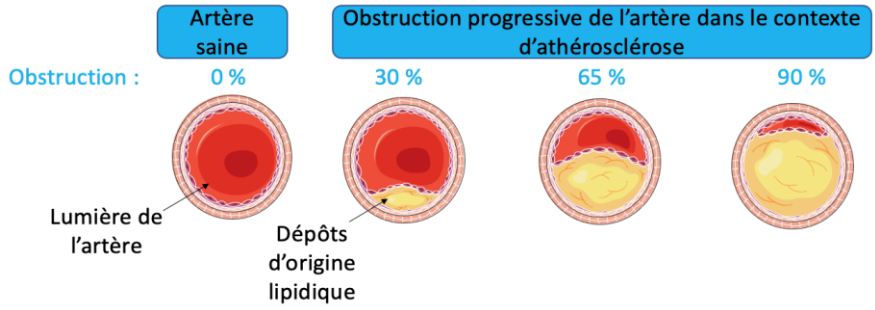


Illustration bilan 1 : Schématisation de l'obstruction d'une artère dans le contexte d'athérosclérose (Images SERVIER)

- La répartition mondiale des maladies cardiovasculaires est hétérogène, certains pays et régions présentent des prévalences plus élevées : c'est le cas du département français de l'Ile de La Réunion.

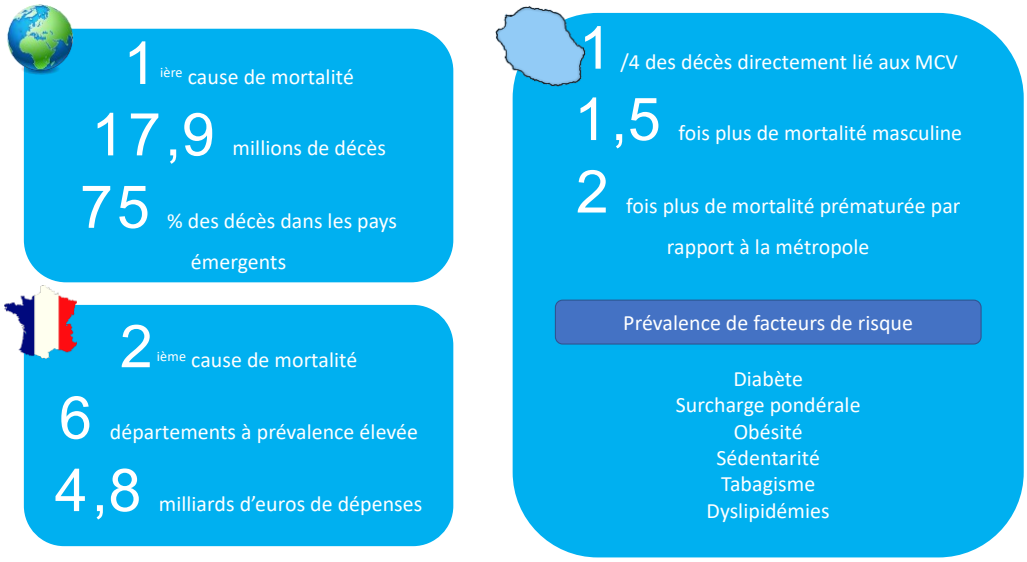


Illustration bilan 2 : Les maladies cardiovasculaires : ce qu'il faut retenir.

Dans ce contexte, l'utilisation de méthodes de prévention de l'athérosclérose comme l'amélioration de l'hygiène de vie et l'approche médicamenteuse est appropriée. A la Réunion, on notera que les facteurs de risques associés à une prévalence plus élevée sont associés à l'hygiène de vie (diabète, surcharge pondérale). L'approche nutritionnelle s'avère donc être intéressante dans ce contexte.

A La Réunion, l'utilisation traditionnelle de tisanes à base de plantes médicinales pourrait s'inscrire dans cette approche nutritionnelle.

3. L'utilisation des Plantes Médicinales : de la tradition à l'industrialisation

La Réunion fait partie des hotspots mondiaux de la biodiversité et compte 27 plantes médicinales enregistrées à la Pharmacopée Française. Ces dernières sont présentées en **Figure 4** et sont utilisées traditionnellement pour leurs propriétés antidiabétiques, hypolipémiantes, dépuratives ou encore antioxydantes.

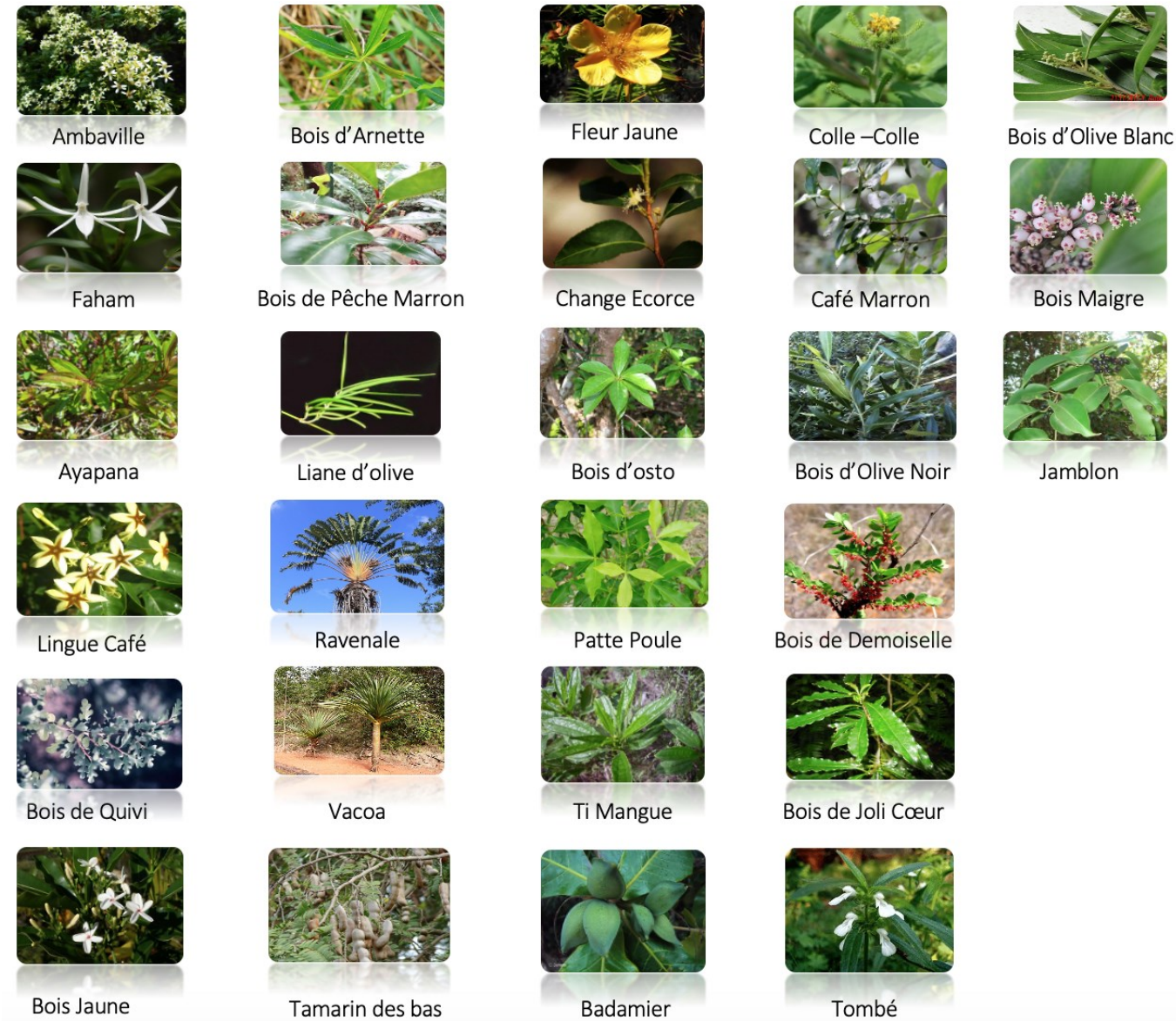


Figure 4 : Les plantes médicinales de La Réunion inscrites à la Pharmacopée Française

*(Sources: aplamedom.org ;*https://boutik-lontan.fr/guerit-vite-colle-colle-de-la-reunion/;https://www.researchgate.net/figure/Leucas-aspera-Willd-Link_fig4_301695265;https://pedagogie.ac-reunion.fr/svt/local/ressources-locales-enbiologie/palynologie/articlepalynotheque/news/detail/News/bois-dolive-blanc.html *; http://publish.plantnet-project.org/project/planttreerun/collection/collection1/synthese/details/PSJDE (Photographie d'Annaïg Perroud); http://www.mi-aime-a-ou.com/Ravenala_madagascariensis.php (Photographie du ravenale) ; Photographie du Vacoa par Eric Gaba, Wikipedia Commons user; Photographie du Tamarin par Forest & Kim Starr ; Photographie du Badamier par C. Delnatte.*

3.1. Origines des plantes médicinales de La Réunion

Les plantes médicinales de La Réunion ont différentes origines :

Les plantes indigènes sont des espèces qui ont été importées naturellement à La Réunion (sans intervention de l'Homme). Il est possible de retrouver des espèces dites « indigènes de La Réunion » dans d'autres zones des Mascareignes, par exemple à l'Ile Maurice (située à 224 km de La Réunion). Selon les travaux de Lavergne, il existe différents « apports » permettant le peuplement végétal d'une région.

- Les apports via les courants marins auraient par exemple favorisé l'implantation des genres *Terminalia*, *Sophora* (ex : Le Faux Benjoin, *Terminalia bentzoe*, Le Petit Tamarin des Hauts, *Sophora denudata*) à l'origine de nouvelles espèces spécifiques à La Réunion.
- Les apports éoliens sont issus des déplacements des semences, fruits et spores via les alizés et les cyclones. Ils sont par exemple à l'origine de l'implantation des espèces du genre *Dodonaea* (ex : Le Bois d'Arnette, *Dodonaea viscosa*) sur l'Ile.
- Les apports par la faune, comme les oiseaux marins et oiseaux migrateurs parfois détournés de leur trajectoire par les cyclones et pouvant transporter des spores ou des graines (sur leurs plumes, leurs pattes ou dans leur tube digestif) (Lavergne, 1989).

Les plantes endémiques sont présentes uniquement sur une région déterminée. Les plantes endémiques insulaires tiennent leur origine d'une espèce indigène ayant évolué sous l'influence de son milieu (climat, compétition inter-espèces, abondance de substrat, stress) via un processus de spéciation pour aboutir à une nouvelle espèce (Hobohm, 2000; Prawiradilaga, 2017; Shapiro et al., 2016).

Les plantes exotiques : sont des espèces importées par l'Homme. Les différentes ethnies ayant participé au peuplement de L'Ile auraient accentué la diversité végétale en permettant l'implantation d'espèces provenant d'Amérique (comme l'*Ayapana triplinervis*), d'Afrique, d'Asie (*Litchi chinensis*) ou encore d'Europe (*Euphobia leucocephala*). Ces plantes ont par ailleurs été implantées par l'Homme pour des raisons médicinales, culinaires, culturelles, ou encore ornementales (Lavergne, 1989).

3.2. La connaissance des plantes médicinales

Les plantes médicinales ont constitué le principal remède aux différents maux de la population réunionnaise que ce soit à l'époque du peuplement de l'Ile, de la période de l'esclavage ou encore avant la départementalisation de l'Ile. Initialement, les connaissances relatives aux plantes médicinales étaient propres aux tradipraticiens de l'Ile appelés « tisaneurs ». La transmission de ces savoirs se faisait de générations en générations, au travers des livres et des médias (télévision, radio) (Boissière, 2019).

3.2.1. Les ouvrages

Des ouvrages tels que « Plantes médicinales de l'île de La Réunion » ou encore « Les plantes médicinales réunionnaises d'aujourd'hui » ont permis d'établir un recueil de témoignages et d'informations concernant l'utilisation traditionnelle des plantes médicinales à La Réunion (Lavergne, 2018; Smadja & Marodon, 2016).

Les utilisations (partie de la plante, mode de préparation et pathologies concernées) diffèrent selon la région, le tradipraticien, la disponibilité de la plante et les traditions. Des exemples d'utilisation de plantes médicinales de la Réunion sont présentés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Exemples d'utilisation de plantes médicinales de La Réunion inspiré de l'ouvrage « Plantes médicinales de l'île de La Réunion » (Smadja & Marodon, 2016)

Nom vernaculaire	Nom scientifique	Famille	Partie de la plante / Mode d'utilisation	Pathologie
Change écorce	*Aphloia theiformis*	Aphloiaceae	Feuilles, écorces, racines Décoction, infusion	Problèmes digestifs ou urinaires, paludisme, rhumatismes
Ayapana	*Ayapana triplinervis*	Asteraceae	Feuilles Décoction, infusion, cataplasme	Vomissements, dysenterie, problèmes liés à la digestion. diabète, problème de foie, maladies de peau, fièvre, plaies et infections
Bois d'arnette	*Dodonaea viscosa*	Sapindaceae	Feuilles, écorces, graines, fleur Infusion, décoction, macération, cataplasme	Rhumatismes, problèmes de digestion coliques, détoxification, goutte, problèmes urinaires, inflammation, maladies de peau, hypercholestérolémie
Ambaville	*Hubertia ambavilla*	Asteraceae	Tiges feuillées et/ou sommités fleuries Infusion (usage interne) ou décoction (lavages externes)	Érythèmes fessiers, problèmes de peau, diabète, problèmes de circulation, d'ulcères, digestifs ou urinaires
Fleur Jaune	*Hypericum lanceolatum*	Hypericaceae	Fleurs, boutons floraux, sommités fleuries Infusion de fleurs fraîches ou séchées	Asthme, problèmes gastro-intestinaux, inflammation, problèmes urinaires (cystite, infection…), dysménorrhées, problèmes de circulation sanguine, dépression
Bois maigre	*Nuxia verticillata*	Stilbaceae	Feuilles, écorces Infusion, décoction des feuilles	Intoxications, maladies vénériennes, albuminurie, problèmes d'acide urique, néphrites, hypercholestérolémie
Bois de pêche marron	*Psiloxylon mauritianum*	Psiloxylaceae	Feuilles, écorces Décoction, infusion	Aménorrhée, dysenterie, hypercholestérolémie
Jamblon	*Syzygium cumini*	Myrtaceae	Feuilles, tiges, racines, poudre d'écorce et graines torréfiées Décoction, infusion	Diabète gras, diarrhée, dysenterie, maux de gorge, bronchite, dents et gencives fragilisées, problèmes digestifs ou rénaux, rhumatismes.

Des travaux comme ceux de Poullain *et al*., ont permis de préciser le potentiel de ces différentes plantes tout en explorant leur contenu en principes actifs (Poullain et al., 2004). Cependant, les connaissances sur les plantes médicinales sont majoritairement empiriques et à l'heure actuelle, les informations sur leur contenu en principes actifs et leurs impacts (aspects physiologiques et mécanistiques) sur la santé sont pauvres (Boissière, 2019).

3.2.2. Les études auprès de la population

Des ***études ethnopharmacologiques menées par des médecins*** sur des patients de l'Ile de La Réunion ont permis d'apporter davantage d'informations sur l'utilisation actuelle des plantes médicinales. Parmi ces études il est possible de citer celle du Docteur Dutertre, réalisée auprès de 10 cabinets médicaux sur un total de 300 patients (83% de femmes, 17% d'hommes) ou encore celle du Docteur Boissière réalisés sur un panel de 11 patients (7 femmes, 4 hommes) à différents endroits de l'Ile (Boissière, 2019; Dutertre, 2011).

Le concours « ***Zerbaz péi*** » a été initié en 2005 par l'Association des Plantes Aromatiques et Médicinales de La Réunion (APLAMEDOM). Il consiste à demander à des élèves de primaire, collèges et lycées de l'Ile de réaliser un herbier traditionnel présentant des plantes médicinales, leurs caractéristiques et leurs utilisations traditionnelles sans avoir recours à internet. Ces conditions permettent notamment aux élèves de recueillir des informations auprès de leurs parents, grands-parents et de mettre en évidence le savoir et les témoignages qui perdurent au sein des familles réunionnaises. Chaque herbier est ensuite analysé par un jury composé de tradipraticiens, médecins, pharmaciens, chimistes et anthropologues. Ce concours réalisé chaque année permet la transmission de savoirs intergénérationnels mais aussi d'apporter des informations nouvelles aux études d'anthropologie et d'ethnopharmacologie (APLAMEDOM, 2013).

3.2.3. Les médias

Certaines connaissances apportées par les tisaneurs font couramment l'objet de reportages et sont médiatisées à la télévision, à la radio ou encore sur internet. Il est possible de citer par exemple :

- Les conférences "Tizanes et Zerbaz péi" animées par Claude MARODON sur la radio réunion première (*Tizanes et Zerbaz péi*, 2016).
- L'émission télévisée "Zerbaz Péi" financée par le Département, mettant en avant les connaissances du tisaneur François TIBERE sur les plantes médicinales de La Réunion

comme par exemple sur le Change Ecorce ou encore l'Ambaville (*Zerbaz Péi - Exemple : Zanbavil*, 2015).

- Les rubriques "Kosalafé" diffusées à la fin du journal télévisé local, mettant en avant les témoignages et explications de tisaneurs tels que Raymond Lucas (*La Réunion, terre de tisaneurs*, 2020).
- Le reportage court "les plantes médicinales de La Réunion, de la canopée aux labos de pointe" diffusé en 2019 par les chaînes arte et France 24, mettant en avant les liens entre la valorisation traditionnelle des plantes médicinales par les tisaneurs (comme Frantz Ledoyen) et la valorisation de ces dernières à l'échelle des laboratoires (DéTROI) et startup (Pat'Zerbaz) locales (*Les Plantes Médicinales de La Réunion, de La Canopée Aux Labos de Pointe*, 2019).

3.2.4. Les manifestations organisées par les associations

A La Réunion l'Association des Plantes Aromatiques et Médicinales de La Réunion (APLAMEDOM) est un pilier de la préservation des connaissances sur les plantes médicinales et œuvre depuis 1999 pour l'inscription des plantes médicinales à la Pharmacopée Française. Cette association qui regroupe à la fois des tisaneurs, des chercheurs, pharmaciens, des producteurs de plantes médicinales et des passionnés de botanique a pour objectifs de promouvoir l'étude et la connaissance des plantes médicinales de La Réunion, de favoriser le développement des filières de production des plantes médicinales et d'agir pour la vulgarisation scientifique (animation de conférences, participation à des colloques internationaux, animation d'atelier grand public lors de manifestations) (*Aplamedom Réunion - Plantes aromatiques et Médicinales*, n.d.).

Les actions de vulgarisation scientifique menées localement par cette association sont nombreuses. L'APLAMEDOM s'investit notamment dans les évènements tels que la fête de la science, les journées du patrimoine et organise aussi des manifestations comme "Zerbaz en fet" (*Les manifestations - Aplamedom*, 2016).

3.3. Les fréquences d'utilisation et modes de préparation des plantes médicinales

L'étude du Docteur Dutertre menée en 2011 sur 300 patients à La Réunion, a mis en évidence que 87% des patients utilisaient une plante médicinale pour ses potentiels effets bénéfiques sur la santé (25% d'entre eux consommaient des plantes médicinales quotidiennement). Dans la

plupart des cas, l'utilisation des plantes médicinales par la population réunionnaise est associée à des pathologies « simples » que sont le syndrome grippal (48%), les troubles digestifs (24%) et la cicatrisation de plaies cutanées (8%). Il existe différentes méthodes de préparation des plantes médicinales comme les huiles essentielles, les extraits alcooliques, les baumes, les cataplasmes, macérâts, infusions ou encore les décoctions (Dutertre, 2011). La **Figure 5** présentée ci-dessous montre la répartition des différents modes d'utilisation des plantes médicinales à l'Ile de La Réunion.

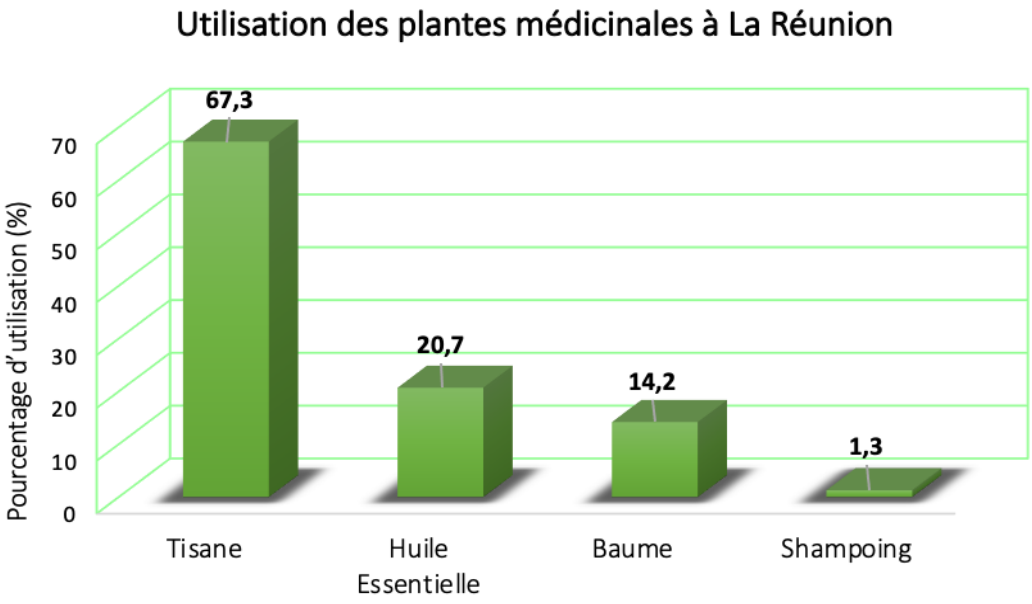


Figure 5 : Modes d'utilisation des plantes médicinales de l'Ile de La Réunion (Source : Dutertre 2011)

Parmi les formes d'utilisation des plantes médicinales, l'utilisation des tisanes est la plus courante (qu'elle soit issue de l'infusion, la décoction ou de la macération). Les plantes les plus couramment utilisées sont la citronnelle (*Cymbopogon citratus*), l'ayapana (*Ayapana triplinervis*) et la cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) (Dutertre, 2011).

Il existe trois formes de préparation de tisane :

- ***La macération*** : qui consiste à placer la matière végétale (feuilles ou écorces) dans un solvant (eau ou parfois alcool pour la préparation de grog) pour permettre une extraction des principes actifs de la plante par un procédé de diffusion passive.
- ***L'infusion*** : qui consiste à placer la matière végétale (feuilles, écorces ou broyat de feuilles) dans de l'eau bouillante sur une durée déterminée (allant jusqu'à 15 minutes). Le processus d'extraction des principes actifs est facilité par la chaleur qui permet la lyse des cellules végétales.

- ***La décoction*** : qui consiste à placer la matière végétale (feuilles, écorces ou broyat de feuilles) dans de l'eau à température ambiante et de chauffer le mélange sur une durée déterminée (allant de 30 min à quelques heures selon la plante considérée). Ce procédé de transformation est davantage utilisé pour l'extraction des principes actifs contenus dans les écorces et tissus lignifiés (qui nécessitent des températures et une durée de cuisson plus élevées pour permettre la lyse des cellules végétales).

3.4. Les points de distribution des plantes médicinales à La Réunion

Bien qu'il ait été décrit que les utilisateurs se procuraient majoritairement les plantes médicinales au niveau de leur jardin (28 %) et de leur famille (24 %), les marchés forains, les tisaneurs, les pharmacies et les sites internet constituent aussi des zones de distribution où il est possible de se procurer des plantes médicinales (Dutertre, 2011).

Au niveau des grandes et moyennes surfaces apparaissent peu à peu des produits transformés à base de plantes médicinales tels que les mélanges à infuser. L'Entreprise HABEMUS PAPAM, spécialisée dans la production de plantes médicinales à La Réunion, se place d'ailleurs parmi les premiers producteurs de plantes médicinales à l'échelle industrielle.

- **Une thèse sous contrat CIFRE : une opportunité de faire avancer la recherche sur des plantes médicinales couramment consommées à l'Ile de La Réunion**

L'entreprise **HABEMUS PAPAM** est une industrie spécialisée dans la transformation de fruits et dans la fabrication de préparations pour tisanes à base de plantes aromatiques et médicinales (PAM) de La Réunion. Cette société créée en 2014 exerce ses activités dans l'Est de l'île à La Plaine des Palmistes. Fortement sensible à la préservation et au respect des ressources naturelles, l'Entreprise HABEMUS PAPAM travaille en collaboration avec différents fournisseurs de plantes sur toute l'Ile afin d'éviter l'épuisement des ressources. L'entreprise propose principalement des produits issus de l'Agriculture Biologique. Afin de contribuer à la valorisation des ressources naturelles, le projet « Valorisation des Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales de La Réunion » a été lancé en vue de développer des solutions innovantes de valorisation.

C'est dans cette optique que l'Entreprise a été favorable à l'établissement d'un contrat CIFRE avec le Laboratoire DéTROI : l'objectif principal du projet étant d'acquérir des informations sur le potentiel préventif ou curatif de plantes médicinales traditionnellement utilisées à La Réunion dans un contexte de perturbations métaboliques (dyslipidémie, athérosclérose).

3.5. Les plantes médicinales : de la tradition à l'industrialisation

L'industrialisation de la production de plantes médicinales passe par le respect d'un certain nombre de directives et de procédures.

3.5.1. Aspects réglementaires

En Novembre 2008, la ***déclaration de Beijing*** a été signée lors d'un Congrès de l'Organisation Mondiale de la Santé. Cette déclaration avait pour but d'encourager les États à développer l'innovation et la recherche dans le domaine de la médecine traditionnelle et de favoriser les échanges entre les médecins et les tradipraticiens. Cette décision a été un premier pas vers l'autorisation d'utiliser les plantes médicinales à des fins thérapeutiques.

L'OMS a ensuite émis en 2014 un ***plan stratégique d'intégration de la médecine traditionnelle.*** L'objectif de ce plan pour la période 2014-2023 est d'apporter un soutien et un encadrement des pratiques de médecine traditionnelle (dont celles faisant intervenir l'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques). Cela passe notamment par le renforcement des connaissances relatives à ces médecines traditionnelles et complémentaires (recherche), le renforcement de la sécurité (au niveau des pratiques de médecine mais aussi des produits utilisés) et la promotion de l'auto-prise en charge sanitaire (*OMS | Stratégie de l'OMS Pour La Médecine Traditionnelle Pour 2014-2023*, 2013).

A l'échelle européenne, il n'existe pas de protocole d'évaluation de l'innocuité ou de l'efficacité pour les préparations à base de plantes médicinales. Cependant, il existe une ***Directive Européenne (2004/24/CE)*** permettant d'enregistrer les médicaments traditionnels à base de plantes médicinales. Cette directive a mis en place des procédures d'enregistrement, de traçabilité et de contrôle de la qualité (efficacité) pour ces produits ("Directive 2004/27/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004," 2009).

En France, il existe un ensemble de lois visant à promouvoir et à autoriser l'utilisation des plantes médicinales. Le **Tableau 5** représente les statuts applicables aux produits à base de plantes dont les plantes aromatiques et/ou médicinales. Certaines plantes sont reconnues sous le statut de médicaments et d'autres sont reconnues comme produits alimentaires (Labbé, 2018).

Tableau 5 : Les principaux statuts applicables aux plantes et produits à base de plantes (Source : J Labbé ; 2018)

Statut	Catégories de produits	Tutelles nationales	Surveillance	Cadre/Particularités
Médicaments	Plantes médicinales de la pharmacopée	Ministère santé / ANSM *(ANSES pour médicaments vétérinaires)*	Pharmacovigilance ANSM	Monopole officinal Dérogation pour 148 plantes (décret 2008-841)
	Préparation officinale ou magistrale			Monopole officinal Bonnes pratiques de préparation, formulaires et monographies (ex : mélanges pour tisanes)
	Médicament et médicament traditionnel à base de plantes			Monopole officinal Autorisation de mise sur le marché (AMM) par EMA (agence européenne du médicament) ou ANSM
Denrées alimentaires	Complément alimentaire	DGCCRF	Nutrivigilance DGCCRF/ANSES	Déclaration préalable (télé-portail DGCCRF) Plantes autorisées : liste de 541 plantes (arrêté 2014) + reconnaissances mutuelles entre Etats Possibilité d'allégations de santé, encadrées par règlement (CE) 1924/2006
	Plantes en vrac seules ou en mélanges	DGCCRF		Plantes autorisées : liste de 148 plantes hors monopole pharmaceutique (décret 2008-841)
Produits cosmétiques	Huiles essentielles, produits complexes à base d'huiles essentielles	Ministère santé /ANSM	Cosmétovigilance ANSM	Enregistrement européen
Dispositifs médicaux		Ministère santé /ANSM	Matériovigilance ANSM	Depuis 2017 nouvelle procédure d'enregistrement au niveau européen
Autres	Arômes alimentaires (dont huiles essentielles)	DGCCRF / ANSES		
	Parfums d'ambiance (dont huiles essentielles)			Réglementation REACH : pictogrammes de sécurité obligatoires

Par exemple, le ***Décret n°2008-841*** du 22 Août 2008 énonce les 148 plantes aromatiques et/ou médicinales autorisées à la vente sous tutelle de la « Direction générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des fraudes » (DGCCRF), (hors monopole pharmaceutique). Ce décret permet notamment la mise sur le marché de plantes médicinales sous forme de produits « de confort » (infusions « bien -être »)

Il faut savoir que la DGCCRF encadre aussi les modalités de commercialisation des plantes médicinales comme compléments alimentaires via l'application du règlement **(CE) 1924/2006** et de l'**Arrêté du 24 Juin 2014 -J.O du 17 Juillet 2014**. De manière générale, les produits encadrés par la DGCCRF ne peuvent pas disposer d'allégation thérapeutique (Labbé, 2018).

L'article **L5112-1 du Code de la Santé Publique**, définit les textes de la pharmacopée européenne, française et des Outre-Mer. L'alinéa « Un décret en Conseil d'État fixe les adaptations de la pharmacopée française nécessitées par les particularités des plantes

médicinales d'usage traditionnel dans les départements et collectivités d'outre-mer » s'associe à l'article 13 de la **Loi n° 2009-594 du 27 Mai 2009** visant au développement économique des Outre-mer (*Article L5112-1 - Code de La Santé Publique - Légifrance*, 2016).

L'***Agence Nationale de la Sécurité du Médicament*** et des produits de santé (ANSM) est à l'origine de l'intégration ou non de plantes médicinales à la ***Pharmacopée Française***. En Janvier 2020 ont été rééditées les listes de plantes médicinales inscrites à la pharmacopée :

- Liste A : les plantes médicinales utilisées traditionnellement en l'état ou sous forme de préparation dont les plantes pouvant avoir des effets bénéfiques sur la santé. - Regroupant plus de 400 plantes.
- Liste B : les plantes médicinales utilisées traditionnellement en l'état ou sous forme de préparation dont les effets indésirables potentiels sont supérieurs au bénéfice thérapeutique attendu. - Regroupant plus de 200 plantes.

Une monographie « Mélange pour tisanes pour préparations officinales » a été ajoutée à la Pharmacopée Française en Août 2013, cette dernière permet aux pharmaciens d'officine et herboristes de faire des mélanges de plantes pour tisanes (préparations officinales) sans prescription médicale. Dans le cadre de la vente en pharmacie, l'allégation thérapeutique peut être énoncée par le pharmacien mais ne doit pas être mentionnée sur l'emballage du produit (*ANSM : Agence Nationale de Sécurité Du Médicament et Des Produits de Santé*, 2017).

L'**Agence Européenne du Médicament** dispose d'un comité d'experts scientifiques européens (Committee on Herbal Medicinal Products) en charge de la validation de l'usage de plantes médicinales utilisées comme « médicaments d'usage traditionnel ». Ces plantes disposent d'une reconnaissance de leur possible efficacité dans une indication précise liée à une tradition d'utilisation en Europe (hors étude clinique). Dans ce cas, il est nécessaire que le remède ait été utilisé depuis de plus de 30 ans dont au moins 15 en Europe pour l'indication thérapeutique décrite (*Comment Un Médicament à Base de Plantes Est-Il Autorisé? - ANSM : Agence Nationale de Sécurité Du Médicament et Des Produits de Santé*, 2017).

A l'heure actuelle, 27 plantes aromatiques et médicinales de La Réunion sont inscrites à la Pharmacopée Française.

3.5.2. Aspects propres à l'industrialisation

L'industrialisation et la commercialisation de plantes médicinales impliquent le respect de différentes conventions et procédures :

3.5.2.1. La standardisation

Comme tout produit issu d'une transformation industrielle, les préparations de plantes médicinales sont standardisées et répondent aux mêmes critères de qualité. La standardisation des lots passe notamment par le respect de différents cahiers de charges. Par exemple, pour les producteurs, le respect du cahier des charges implique la mise en œuvre de toutes les mesures relatives à l'agriculture biologique. Ainsi, le cahier des charges prend en compte prend en compte à la fois la réglementation **CE n° 834/2007** (pour la production des plantes) mais aussi le règlement européen **n° 889/2008** (pour l'étiquetage et les contrôles des produits BIO).

3.5.2.2. La traçabilité

La traçabilité est une démarche utilisée en industrie (qu'elle soit agro-alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique) qui a pour objectif de garantir la sécurité de l'aliment. Cet ensemble de procédures effectuées « *de la fourche à la fourchette* » vise à détailler étape par étape les procédés de récolte/transformation impliqués dans la production d'un aliment ou d'un médicament. A chaque étape sont listés les « dangers » (chimiques, biologiques ou physiques) pouvant altérer la qualité du produit ou induire un risque pour le consommateur.

Dans le cadre de l'industrialisation de produits à base de plantes médicinales, la démarche de traçabilité est effectuée selon les conditions de la norme **ISO 22000** (décrivant les procédures de management de la sécurité de l'aliment), du règlement **CE 178/2002** et du règlement **CE 852/2004**.

3.5.2.3. Le procédé de fabrication des produits

Le procédé de transformation des plantes médicinales constitue un paramètre majeur dans le cadre de ce travail de thèse. Le procédé de transformation des plantes médicinales au sein de l'Entreprise HABEMUS PAPAM est présenté en **Figure 6**.

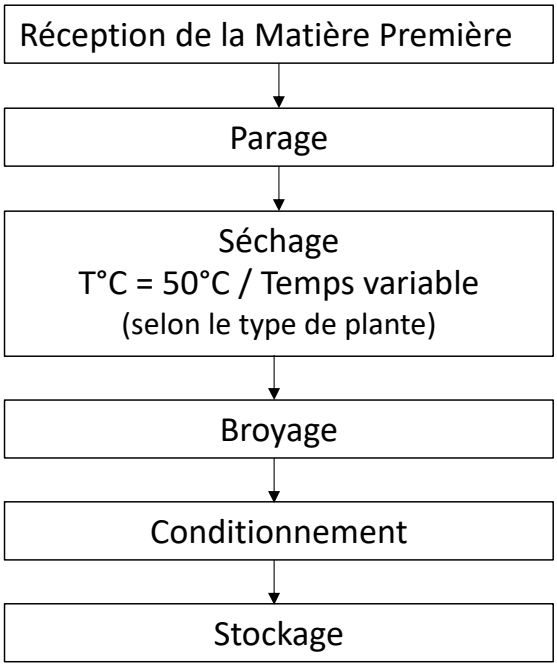


Figure 6 : Diagramme de fabrication d'une préparation de plante médicinale à l'échelle industrielle

1) Les lots de plantes (cultivées selon le cahier des charges fourni par l'Entreprise HABEMUS PAPAM) sont livrés à l'usine par les fournisseurs. Chaque lot correspond aux feuilles/ branches/ fleurs récoltées le même jour, sur la même parcelle par le même fournisseur. *Démarche qualité/traçabilité : Respect du cahier des charges par le fournisseur respect des conditions de culture (Agriculture Biologique), de récolte et de transport.*

2) Le contrôle à la réception de la matière première est effectué dès son arrivée en usine. Une identification de la plante est alors effectuée par le pharmacien référent qui donne son accord pour la transformation de la matière première. Un échantillon témoin de la matière première est conservé au sec.

Démarche qualité/traçabilité : remplissage de la fiche de réception, contrôle de la qualité de la matière première à réception et identification de la matière première. (Bien que les parcelles de productions aient été contrôlées en amont, l'identification à la réception est obligatoire). Création d'un numéro de lot industriel et pesée dès réception.

3) Une étape de parage est effectuée par les ouvriers afin d'enlever les impuretés et les éventuels débris / feuilles mortes pouvant être présents dans les lots.

Démarche qualité/traçabilité : remplissage de la fiche de production, description du travail effectué.

4) Il s'ensuit alors des cycles de « séchage sous vide partiel » (85% de vide par rapport à la pression atmosphérique) à basse température dans un four à micro-ondes industriel. En moyenne le four réalise 4 cycles de « cuisson », dont la durée moyenne est de 40 minutes. Les barèmes de temps et températures dépendent de la plante utilisée. (Par exemple, certaines plantes présentant beaucoup d'huiles essentielles nécessitent des cycles de 190 minutes, car l'extraction de l'eau présente dans les feuilles y est limitée). Cette étape de séchage constitue en fait un procédé d'extraction sans solvant au four à micro-ondes facilité par vide partiel. *Démarche qualité/traçabilité : remplissage de la fiche de production. Cycles et barèmes temps/température décrits, et pesée.*

5) Le lot de plantes une fois séché est broyé sur un tamis de 5 mm. Le produit obtenu est de nature hétérogène (mélange de poudre et de flocons de moins de 5 mm).
Démarche qualité/traçabilité : évaluation de l'aspect du broyat.

6) Le conditionnement est alors effectué dans des sachets pyramidaux en tissu contenant en moyenne 4,5 grammes de préparation de plantes. Les sachets pyramidaux sont ensuite placés dans un emballage secondaire étiqueté avant d'être stockés et distribués dans les différents points de vente.
Démarche qualité/traçabilité : pesée des sachets individuels.

3.6. Stratégies de valorisation

Les travaux de recherche sur les principes actifs de plantes médicinales peuvent permettre à l'entreprise d'effectuer une demande auprès de l'Autorité Européenne de la Sécurité des Aliments (EFSA) pour obtenir une allégation nutritionnelle (mettant en avant la présence de nutriments d'intérêt). Au-delà de la préparation traditionnelle (sous forme de tisane) par le consommateur, il existe différents moyens de valoriser les principes actifs des plantes médicinales.

Il a été estimé que dans les pays développés, les médicaments à base de plantes constituent près de 25 % des médicaments disponibles sur le marché. Dans les pays en voie de développement, la contribution des médicaments à base de plantes est de l'ordre de 80 %. L'utilisation à visée thérapeutique va de la simple consommation directe du produit (sous forme de tisane, gélules, poudres à diluer) à l'extraction des principes actifs associée ou non à différentes étapes de transformation afin de les intégrer à des produits pharmaceutiques. La valorisation des phyto-

molécules peut aussi impliquer leur utilisation dans la formulation de produits cosmétiques ou alimentaires (Kumar & Tewari, 2018).

L'**extraction** des principes actifs constitue le mode de séparation des composés bioactifs de la matrice végétale. Traditionnellement, l'extraction se fait en utilisant des solvants présentant des affinités avec les composés bioactifs à extraire.

Il existe différents modes d'extractions applicables à la matière végétale, ils permettent l'obtention d'extraits secs, liquides ou solides. Comme le montre la **Figure 7**, les concentrés, les hydrolats et les eaux florales sont les premiers produits issus de l'extraction et de la distillation du végétal. Des étapes d'atomisation (déshydratation sous flux d'air à haute température) ou de formulation liquide ou solide permettent d'aboutir à la formation de produits plus élaborés comme les extraits issus d'atomisation, les extraits hydro-alcooliques, extraits aqueux, ou encore les concrètes et résines.

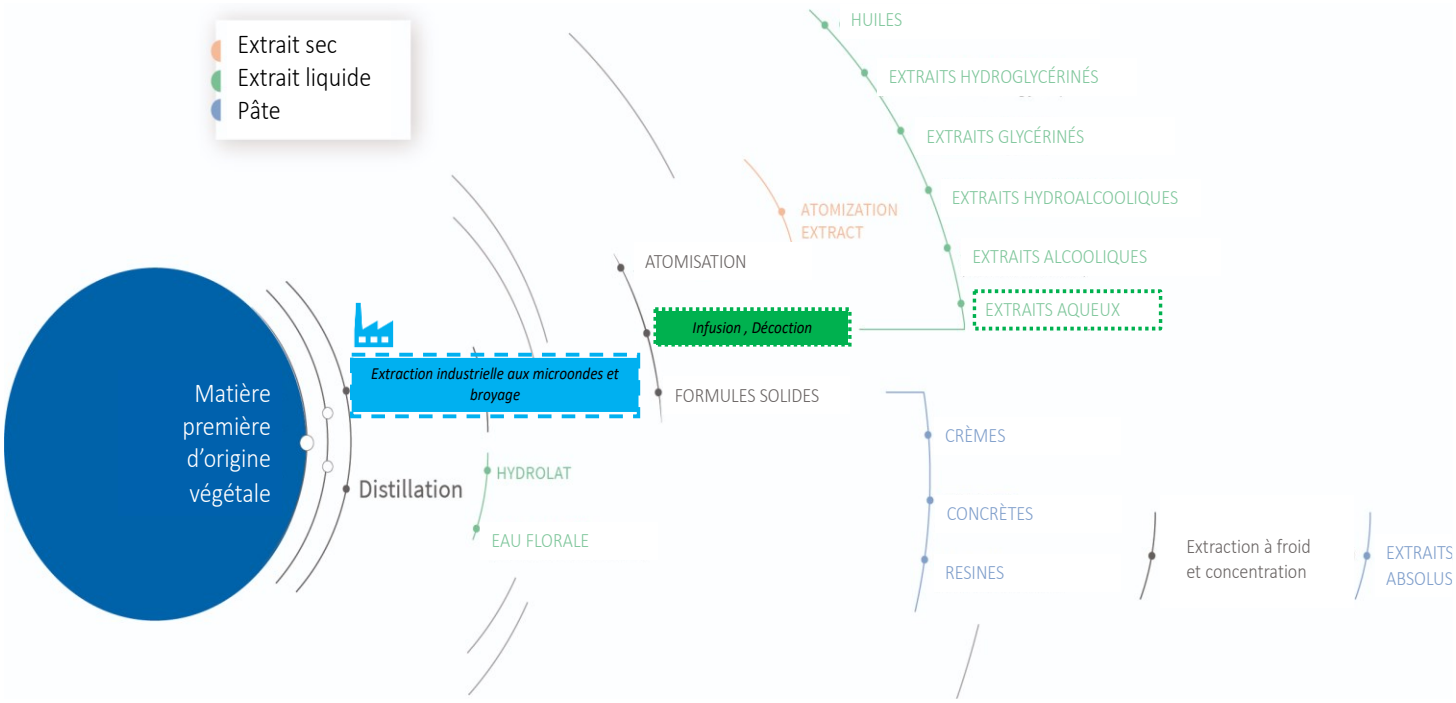


Figure 7 : Les différentes méthodes d'extraction des principes actifs végétaux et leurs produits de transformation – Traduit et adapté de http://www.berkem.com/en/expertise-en/plant-extraction

La stratégie de valorisation utilisée par l'entreprise HABEMUS PAPAM est représentée par les cadres bleu et vert. Les étapes d'extraction et de concentration sont effectuées industriellement.

La formulation liquide est effectuée par le consommateur via les procédés d'infusion ou de décoction. Ces transformations aboutissent à l'obtention d'un extrait aqueux (tisane).

Selon le livre « Extraction technologies for medicinal and aromatic plants », il est possible de distinguer les méthodes d'extraction adaptées aux plantes médicinales (macération, infusion, décoction, percolation, extraction alcoolique, sonication, extraction au fluide supercritique) de celles qui sont dédiées à la formulation d'extraits de plantes aromatiques (davantage axées sur l'extraction des huiles essentielles : hydrodistillation, enfleurage, macération) (Sukhdev Swami et al., 2008). D'autres méthodes comme l'extraction assistée par microondes ou les procédés d'extraction à contre-courant et d'entraînement à la vapeur sont aussi possibles. La méthode utilisée conditionnera le type d'utilisation du produit d'extraction (Gupta et al., 2012).

3.6.1. Le cas de l'extraction assistée par micro-ondes

La méthode d'extraction assistée par micro-ondes (MAE) est utilisée par l'Entreprise HABEMUS PAPAM dans son procédé industriel. En effet, cette méthode est rapide et se substitue aux étapes de séchage/distillation de la plante (qui nécessite plusieurs heures). Les travaux de Lucchesi *et al*., ont montré par exemple que l'extraction aux micro-ondes sans solvant était un procédé plus rapide que l'hydro-distillation traditionnelle avec le même rendement obtenu en 30 minutes contre 4,5 h pour l'hydro-distillation (Lucchesi et al., 2004). Elle permet d'engendrer de la chaleur via deux mécanismes se faisant simultanément : la rotation dipolaire et la conduction ionique (Veggi et al., 2012). En effet, l'agitation moléculaire engendrée par le champ électromagnétique du four microonde va permettre la « sortie » des molécules d'eau présentes dans la matrice végétale. Ce phénomène de déshydratation va aussi conduire à la rupture des vacuoles contenant les molécules aromatiques et les molécules bioactives. Les travaux menés par l'équipe de Proestos ont montré que l'utilisation des micro-ondes était adaptée à l'extraction des composés phénoliques (avec des rendements d'extraction allant de 89,9 % ± 2,6 % pour l'acide gallique à 104,3 % ± 11,2 % pour l'acide *p*-coumarique) (Proestos & Komaitis, 2007).

L'utilisation du procédé d'extraction aux micro-ondes et de broyage permet à l'Entreprise HABEMUS PAPAM de produire des « concentrés de plantes ». Ces derniers sont des éléments de base qui, une fois transformés, permettront la formulation de différents produits : poudres pour gélules, extraits hydro-alcooliques, huiles enrichies et concrètes.

3.6.2. De l'extrait au médicament

L'extraction de molécules bioactives est à la base de la conception de médicaments. Comme le présente la **Figure 8** ci-dessous, différentes étapes sont nécessaires à la mise en place d'un médicament. Les phases de recherche effectuées à l'échelle du Laboratoire DéTROI concernent majoritairement les phases d'identification et d'optimisation.

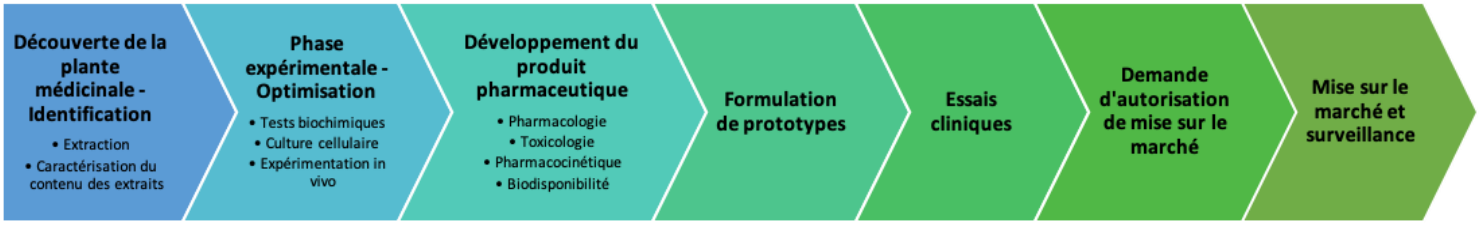


Figure 8 : Processus de formulation d'un médicament à partir des plantes médicinales. (Source : Balunas & Kinghorn, 2005)
Les étapes d'extraction et d'optimisation constituent la phase de « screening » du potentiel de la plante et des molécules bioactives qu'elle contient (3 à 4 ans). Il s'ensuit la phase développement du produit pharmaceutique (étude pré-clinique), cette phase permet d'évaluer l'efficacité du médicament et ses effets indésirables tout en étudiant le devenir des molécules bioactives dans l'organisme (2 ans). La formulation de prototypes permet d'adapter le mode d'administration du médicament si nécessaire, elle précède les premiers essais cliniques. Les essais cliniques (5 à 6 ans) se décomposent en différentes phases :1-Evaluation de la tolérance et pharmacocinétique ; 2 – Détermination de l'efficacité du médicament chez un patient malade ; 3- Évaluation de l'efficacité et de la tolérance dans les conditions normales d'emploi. Une demande d'autorisation de mise sur le marché est effectuée auprès de l'ANSM (1-2 ans) avant une mise sur le marché et une étape de surveillance post-commercialisation. (Ashburn & Thor, 2004)

L'extraction de molécules d'intérêt (par exemple les antioxydants) peut parfois être difficile en raison des interactions des molécules avec la matrice végétale et avoir un impact négatif sur la bioactivité finale. Ces dernières peuvent être soit synthétisées totalement par voie chimique, soit faire l'objet d'une hémi-synthèse.

La **synthèse chimique** permet à la fois d'obtenir un rendement de production d'une molécule d'intérêt de façon traçable et reproductible tout en préservant la ressource végétale dont elle est naturellement issue. Le cas de la galégine est un exemple de composé extrait naturellement des feuilles de *Galega officinalis* qui, par la suite, a servi de modèle pour la synthèse de la metformine, un antidiabétique oral utilisé dans la prise en charge du diabète de type 2 (Fabricant D S & Farnsworth N R, 2001).

L'**hémi-synthèse** est une alternative à l'extraction des molécules. Les travaux de Es-Safi ont montré que l'hémisynthèse de catéchines pouvait aboutir à une amélioration de l'activité antiradicalaire de la molécule (Es-Safi, 2012). Les travaux de Mei *et al*., ont permis la synthèse de l'icariine, un flavonoïde majoritairement présent dans les plantes du genre *Epimedium* à partir d'un autre composé : le kaempférol (Mei et al., 2015).

- **Un exemple de valorisation d'une molécule bioactive du Change Écorce *A theiformis* à l'échelle industrielle**

En 1995 a été déposée par l'Entreprise Yves Rocher, une demande de brevet relative à l'utilisation de la mangiférine ou ses dérivés pour une application en cosmétique. Cette demande a été acceptée et publiée en 2001 par l'Office Européen des brevets. La mangiférine est un composé très abondant dans les feuilles des végétaux du genre *Aphloia*. Ce composé encore connu sous le nom d'*«aphloïol »* est un C-glucoside de la tétrahydroxy-1,3,6,7 xanthone et est assimilé au groupe des polyphénols. Suite aux recherches effectuées sur le composé il a été démontré que la mangiférine et ses dérivés (comme l'iso-mangiférine) présentaient une forte photostabilité, des activités antiradicalaires intéressantes associées à des activités anti-hyaluronidases, anti-élastases, anti-tyrosinases et anti-collagénases. Ces propriétés sont protégées par le brevet. De plus, l'utilisation des extraits de feuilles des plantes de l'espèce *Aphloia*, l'**extraction** de la mangiférine et de ses composés à partir des végétaux cités dans la demande de brevet, la **synthèse** et l'**hémisynthèse** de la mangiférine et de ses composés à des fins d'élaboration de produits cosmétiques sont aussi protégés par ce brevet. (Josse et al., 2001)

Bilan Les plantes médicinales à La Réunion : ce qu'il faut retenir

- Les plantes médicinales sont traditionnellement utilisées à La Réunion depuis son peuplement.
- Bénéficiant d'un contexte juridique qui tend à leur être favorable, les produits à base de plantes médicinales peuvent être valorisés à différentes échelles industrielles (agroalimentaire, pharmaceutique)

27 plantes médicinales de La Réunion inscrites à la Pharmacopée Française

67,3 % d'utilisation traditionnelle sous forme de tisanes

2 tutelles garantes de l'utilisation des plantes médicinales : ANSM et DGCCRF

1 industrie à La Réunion spécialisée dans la production de préparations pour tisanes à base de plantes médicinales : **HABEMUS PAPAM**

Différents moyens de valorisation

Thèse CIFRE → Etude de la bioactivité

Recherche des molécules bioactives d'intérêt

Illustration bilan 3 : La valorisation des plantes médicinales : un secteur prometteur (Sources de images citées en Figure 4)

Les plantes médicinales traditionnellement utilisées à La Réunion pourraient certainement constituer une ressource de molécules bioactives intéressantes d'un point de vue thérapeutique. La connaissance des principes actifs pouvant être présents dans ces plantes médicinales est un enjeu majeur dans la mesure où certains d'entre eux, comme les polyphénols, sont connus pour être bioactifs.

Certains principes actifs présents dans les plantes médicinales sont largement décrits dans la littérature scientifique pour leur bioactivité notamment dans le contexte des perturbations métaboliques et des maladies cardiovasculaires.

4. Les polyphénols, principes actifs de plantes médicinales : une opportunité dans la lutte contre les maladies cardiovasculaires

De nos jours, la consommation de produits d'origine végétale est à la base des recommandations nutritionnelles de nombreux pays notamment en raison de leur abondance en fibres alimentaires mais aussi de leur faible apport calorique et de leur contenu en micronutriments comme les vitamines, les minéraux et les antioxydants. Bien que les recommandations nutritionnelles s'appliquent majoritairement aux fruits et légumes, il n'est pas exclu que les boissons à base de plantes médicinales constituent elles aussi une source importante de nutriments et de principes actifs. Ces principes actifs sont définis comme des métabolites secondaires synthétisés par les végétaux soumis aux conditions de stress (changement de climat, présence de prédateurs, carence en substrat…) et pouvant avoir des effets bénéfiques sur la santé (Alamgir, 2018).

En effet, des études menées sur les effets du thé vert (*Camelia sinensis*), de la menthe (*Mentha piperita*) ou encore du moringa (*Moringa oleifera*) mettent en avant l'intérêt que peut avoir l'utilisation des principes actifs de plantes médicinales dans le cadre de la prévention ou du traitement de maladies métaboliques (Figueroa Pérez et al., 2014; J. Lin et al., 2005; Sugahara et al., 2018).

Les principes actifs des végétaux sont des molécules bioactives pouvant intervenir dans la prévention des perturbations métaboliques. Parmi ces composés, présentés en **Figure 9**, trois types de composés majoritaires sont recensés : les polyphénols, les terpènes et stéroïdes et les alcaloïdes.

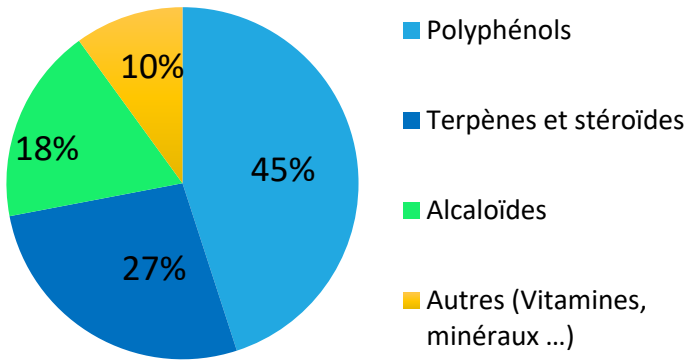


Figure 9 : Les différents types de principes actifs retrouvés dans la matière végétale (Source Alamgir, 2018)

Les polyphénols constituent près de la moitié des principes actifs présents dans les végétaux et sont très étudiés depuis les années 1990 pour leurs propriétés bénéfiques pour la santé (Tresserra-Rimbau et al., 2017).

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants de l'alimentation humaine. En moyenne 1 g de polyphénols est consommé chaque jour ; cela représente 10 fois les teneurs en vitamine C et 100 fois les teneurs en vitamine E et caroténoïdes consommées quotidiennement. Ces composés sont majoritairement retrouvés dans les fruits, légumes et boissons à base de végétaux, notamment les tisanes. Chimiquement, les polyphénols sont des molécules caractérisées par un ou plusieurs cycles aromatiques (encore appelés « noyaux phénoliques ») disposants d'un ou plusieurs groupements hydroxyles (encore appelés « extrémités réductrices ») (Pereira et al., 2009).

Leurs fonctions biologiques au sein des végétaux varient en fonction de leurs structures : les polyphénols comme les anthocyanes peuvent avoir des fonctions de protection contre les ultraviolets mais aussi un rôle de pigment afin d'attirer les pollinisateurs. D'autres polyphénols comme les tanins jouent un rôle de protection contre les parasites, herbivores et insectes par leur propriétés astringentes. Certains polyphénols peuvent aussi inhiber la croissance de microorganismes pathogènes, limiter la production de radicaux libres et diminuer le stress associé à la photosynthèse (Kondratyuk & Pezzuto, 2004).

4.1. Voies de synthèse des polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires de végétaux, produits par des voies de synthèse comme la voie des shikimates, la voie des phénylpropanoïdes ou encore la voie des acétates/mévalonates (Cheynier et al., 2013). Ces composés, contrairement aux métabolites primaires (acides aminés, lipides, acides nucléiques, sucres) ne sont pas essentiels à la survie de la plante (assimilation des nutriments, croissance, développement) mais constituent des molécules de structure, défense ou encore de pigmentation. Au niveau de leur biosynthèse, les métabolites primaires et secondaires ont en commun des intermédiaires et peuvent dériver des mêmes voies métaboliques (par exemple : les protéines et les phénols sont synthétisés à partir d'acides aminés issus d'une voie de synthèse de métabolites primaires) (Hopkins, 2003).

L'une des premières étapes de formation des métabolites secondaires d'une plante est la voie des shikimates (qui se partage entre le métabolisme primaire produisant les acides aminés et le métabolisme secondaire à l'origine des métabolites secondaires). Cette étape permet la synthèse

de l'acide shikimique à partir de phosphoénolpyruvate et d'érythrose-4-P (respectivement issus de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates), la formation précoce de composés nommés « acides hydroxybenzoïques » (comme l'acide quinine et l'acide gallique) et la synthèse de trois types d'acides aminés : phénylalanine (Phe), tyrosine (Tyr) et tryptophane (Trp). Parmi ces acides aminés, le tryptophane (Trp) sera consacré à la synthèse des protéines tandis que la phénylalanine (Phe) et la tyrosine (Tyr) seront utilisées pour celle des métabolites secondaires comme les lignines, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les phytoalexines (Herrmann, 1995).

La phénylalanine obtenue à l'issue de la voie des shikimates sera transformée par la PAL (Phenylalanine Ammonia Lyase) pour former l'acide cinnamique. La transformation de l'acide cinnamique (via l'enzyme Cinnamate-4-Hydrolase), ou celle de la tyrosine (via la Tyrosine Ammonia Lyase) vont aboutir à la formation de 4-coumaroyl-CoA, le précurseur de différents types de polyphénols tels que les phénylpropanoïdes (Urrutia et al., 2016; Vogt, 2010). Ces derniers seront stabilisés sous forme acétylée, glycosylée ou estérifiée mais pourront aussi être détectés sous forme libre « aglycone » (Cheynier et al., 2013; Scalbert & Williamson, 2000).

Une étude récemment menée sur des cellules de péricarpe de pomme (*Malus x domestica*), exposées à des rayons ultra-violet (UV-B), a montré que ce stress s'accompagne d'une accumulation des polyphénols (ce qui suggère une forte activation des voies de biosynthèse). De plus, la présence d'UV-B a provoqué la modulation de la voie de signalisation cellulaire UVR8 à l'origine de l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la synthèse des flavonoïdes (Henry-Kirk et al., 2018).

La synthèse de polyphénols dépend donc à la fois de facteurs intrinsèques à la plante, mais aussi de facteurs environnementaux.

Certains facteurs de stress extérieurs peuvent conduire à la formation de molécules bien spécifiques. Dans l'étude de Constabel *et al*., les tanins condensés sont spécifiquement et massivement produits suite à des lésions du tissu végétal : ce mécanisme implique notamment la surexpression de gènes permettant l'activation préférentielle d'une voie de synthèse des tanins. Les paramètres environnementaux déterminent non seulement les voies de biosynthèse utilisées mais aussi la structure et le type de polyphénols qui seront formés (Barbehenn & Peter Constabel, 2011; Weaver & Herrmann, 1997).

4.2. Une classification en fonction de leur structure

Il existe plus de 8000 polyphénols différents déjà identifiés et regroupés en fonction de leur structure dans différentes familles que sont : les flavonoïdes, les acides phénoliques, les curcuminoïdes, les stilbènes et les lignanes. Les flavonoïdes et les acides phénoliques constituent les plus grandes familles de polyphénols, ils représentent respectivement 60 % et 30 % des polyphénols retrouvés dans l'alimentation (L. Bravo, 2009; Garcia-Salas et al., 2010; Scalbert & Williamson, 2000, 2000). La **Figure 10** représente les différentes familles de polyphénols et leurs composés (Manach et al., 2004).

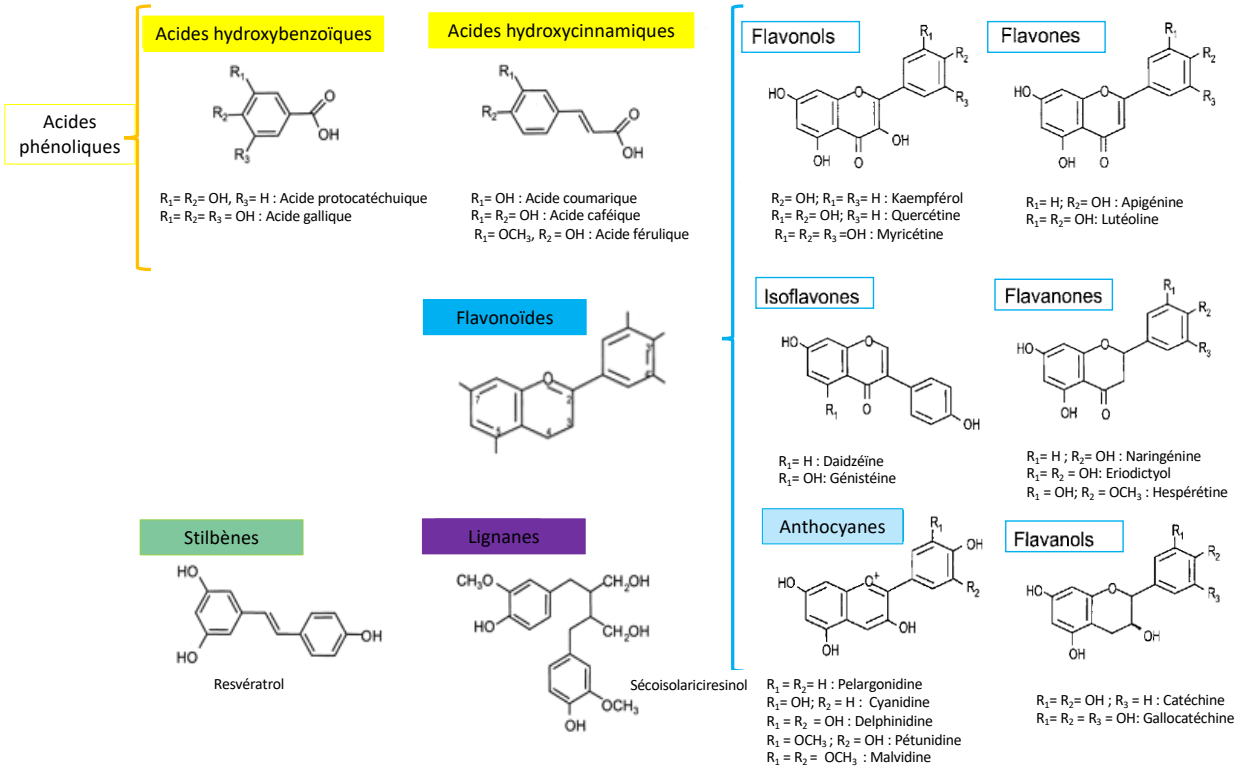


Figure 10 : Les différentes familles de polyphénols et leurs composés. Traduit et adapté de Manach et al. (2004)

La famille des acides phénoliques se divise en deux groupes majeurs : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques qui se distinguent selon leur abondance dans les végétaux et selon la forme sous laquelle ils sont retrouvés :

- Les ***acides hydroxybenzoïques*** sont les plus abondants et se présentent généralement sous la forme d'esters associés à une fonction acide carboxylique ou un résidu glucose. Ces composés, comme l'acide gallique et l'acide protocatéchique sont retrouvés dans les aliments comme le cassis (4 - 13 mg d'acide gallique /100 g de fruits frais), ou la framboise (6 - 10 mg d'acide protocatéchique / 100 g de fruit frais) mais aussi dans des plantes

médicinales comme le thé vert *Camellia sinensis* (4,5 g d'acide gallique / kg de plante sèche) (Manach et al., 2004).

- Les ***acides hydroxycinnamiques*** sont moins abondants dans l'alimentation et sont généralement retrouvés sous de forme de glycosides ou d'esters. On retrouve ces composés dans le café (70 – 350 mg d'acide chlorogénique par tasse) ou encore dans les fruits comme le kiwi (60 -100 mg d'acide caféique / 100 g de fruits frais). L'acide hydroxycinnamique le plus abondant est l'acide caféique : il représente 75 à 100 % du contenu en acide hydroxycinnamique de certains fruits et permet lorsqu'il est associé à l'acide quinique de former l'acide chlorogénique. Les infusions de feuilles de café *Coffea arabica* et *Coffea canephora* (traditionnellement utilisées en Amérique du Sud pour le traitement des migraines et de la toux) présentent même trois isomères différents de l'acide chlorogénique (Patay et al., 2016; Rodríguez-Gómez et al., 2018).

Les flavonoïdes constituent la plus vaste famille de polyphénols. Ils présentent dans leur structure deux cycles aromatiques associés à trois atomes de carbone formant un hétérocycle oxygéné. Cette famille se décompose en différents groupes qui parfois peuvent être retrouvés uniquement dans certains types d'aliments :

- Les ***isoflavones*** (daidzéine, glycitéine et la génistéine) sont spécifiques des produits dérivés du soja. Un litre de lait de soja contient par exemple 30 à 175 mg de glycitéine (Bowey et al., 2003; Manach et al., 2004).
- Les ***flavanones*** comme l'hespéridine et la naringénine, sont spécifiques des agrumes. Les teneurs en naringénine de l'orange (variété « sour orange ») *Citrus aurantium* peuvent atteindre les 693 mg / 100 g d'orange (E. Bravo et al., 2008; Nogata et al., 2006).
- Les ***flavanols*** regroupent à la fois des formes monomériques et des polymères. Les catéchines et l'épicatéchine sont des formes monomériques de flavanols que l'on retrouve dans le thé vert *Camellia sinensis* (Reygaert, 2018). Les proanthocyanidines (encore appelés « tanins condensés ») sont des polymères (dimères, ou trimères) de catéchine que l'on retrouve dans des fruits comme les pêches, poires ou kakis auxquels ils apportent de l'astringence. Leur présence dans les aliments est difficilement quantifiable en raison de la variabilité de leur poids moléculaire (dépendant de leur degré de polymérisation) (Manach et al., 2017; Sun et al., 2019).
- Les ***flavonols*** regroupent trois flavonoïdes majoritaires : la quercétine, le kaempférol et la myricétine. Ces composés sont majoritairement retrouvés sous forme glycosylée. L'oignon est un aliment riche en quercétine (35-120 mg / 100 g). Des plantes

médicinales comme *Hibiscus sabdariffa* (traditionnellement utilisée dans le traitement de l'hypertension et des dyslipidémies) et *Talinum triangulare* (utilisée traditionnellement au Nigéria dans le traitement de l'asthme) contiennent, elles aussi, de la quercétine et du kaempférol (Ikewuchi et al., 2017; Ojulari et al., 2019).

- Les ***flavones*** sont moins courants que les flavonols dans les fruits et légumes. Ils regroupent des formes glycosylées de lutéoline ou d'apigénine. Certains agrumes présentent des formes de flavones polyméthoxylées comme la tangerine, la nobiletine et la sinensetine qui ont la particularité d'être hydrophobes. La présence de flavones a aussi été décrite dans les plantes médicinales telles que *Dodonaea viscosa*. (Ojulari et al., 2019).

Certains polyphénols, comme la curcumine issue du *Curcuma longa,* ont fait l'objet d'études au Laboratoire DéTROI. Le rhizome du curcuma est traditionnellement utilisé à la fois comme épice, colorant alimentaire et comme plante médicinale (Tsuda, 2018). Les travaux menés par Septembre-Malaterre *et al.* ont permis l'identification de la curcumine et de deux de ses métabolites : la déméthoxycurcumine et la bisdeméthoxycurcumine dans des extraits de *Curcuma longa*. (Septembre-Malaterre et al., 2016).

D'autres travaux menés au Laboratoire ont eu pour objectif d'évaluer le contenu en polyphénols et la bioactivité de différentes plantes médicinales comme *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* et *Gouania mauritiana*. Ces plantes utilisées en médecine traditionnelle se sont révélées riches en acide chlorogénique, kaempférol, acide protocatéchique ou encore en quercétine. Ces études ont montré que des plantes médicinales comme *D. apetalum* étaient beaucoup plus riches en polyphénols (7 g d' équivalent acide gallique /100 g de matière sèche) que le thé vert *Camellia sinensis* (4,5 g d' équivalent acide gallique /100 g de matière sèche) (Marimoutou et al., 2015; Veeren et al., 2020).

A l'heure actuelle, un intérêt croissant est porté à l'étude des polyphénols contenus dans les plantes médicinales. En effet ils sont connus pour être bioactifs, métabolisés par l'organisme (biodisponibles) et pourraient être absorbés par simple consommation de tisane.

4.3. La biodisponibilité des polyphénols

La biodisponibilité est un paramètre essentiel pour qu'un composé puisse exercer une bioactivité. La biodisponibilité définit le potentiel d'un composé à être absorbé par l'organisme et à atteindre les tissus et organes cibles pour y exercer une bioactivité. Cette notion regroupe différents paramètres : la capacité à être absorbé, distribué, métabolisé et excrété (ADME) (Fan & de Lannoy, 2014).

4.3.1. L'absorption intestinale et le transport des polyphénols

L'absorption des polyphénols au niveau des cellules intestinales est un processus dynamique. Des travaux *in vitro* menés sur l'absorption des flavonoïdes ont montré que certains d'entre eux étaient absorbés au niveau de l'intestin grêle et pouvaient être pris en charge par des complexes protéiques tels que les « Intestinal Sodium-Dependent D-glucose co-transporter » (SGLT1) qui permettaient notamment leur accumulation au niveau apical (R. A. Walgren et al., 2000). A l'inverse, il existerait d'autres complexes protéiques tels que les « Multridrug Resistance Associated Protein » (par exemple MRP1 et MRP2 qui font partie de la famille des ATP-Binding Cassettes) qui joueraient un rôle dans le transport intracellulaire et l'efflux des flavonoïdes sous forme glycosylée, limitant leur absorption au niveau des cellules de l'intestin grêle (Richard A. Walgren et al., 2000).

Les polyphénols contenus dans l'aliment se retrouvent majoritairement sous forme estérifiée ou glycosylée, certains comme les tanins se retrouvent sous la forme de polymères. Afin de permettre leur absorption par l'organisme, une première réaction d'hydrolyse a lieu au niveau de l'intestin grâce à l'activité d'enzymes telles que la Lactase Phlorizine Hydrolase (LPH) ou encore la Cytosolic Beta-Glucosidase (CBG). Ces réactions d'hydrolyse permettent d'obtenir des formes aglycones et des glycosides qui seront plus facilement absorbables et qui entreront dans les cellules épithéliales par diffusion passive et atteindront les organes via la circulation sanguine (Manach et al., 2004).

Une étude chez l'Homme a justement confirmé que ce mécanisme de transformation en aglycones facilitait l'absorption des polyphénols. L'objectif de l'expérience était de déterminer si le retrait de résidus (tels que rhamnose ou rutinoside) pouvait améliorer la biodisponibilité des polyphénols. L'expérience a été effectuée sur 16 sujets sains qui ont été amenés à consommer :

- Du jus d'orange contenant naturellement de l'hespéridine (un flavonoïde abondant dans les agrumes mais faiblement biodisponible en raison de la présence d'un résidu rutinoside sur sa forme native) – « Low dose Hesperidin »
- Du jus d'orange traité avec une enzyme, l'hespéridinase, permettant de former le métabolite aglycone « hesperétine-7-glucoside »
- Du jus d'orange concentré en hespéridine (3 fois plus concentré que la norme) – « High dose Hesperidin »

L'analyse des plasmas à différents intervalles de temps après consommation des jus a montré le résultat suivant (**Figure 11**) : des cinétiques différentes sont observées selon la boisson consommée.

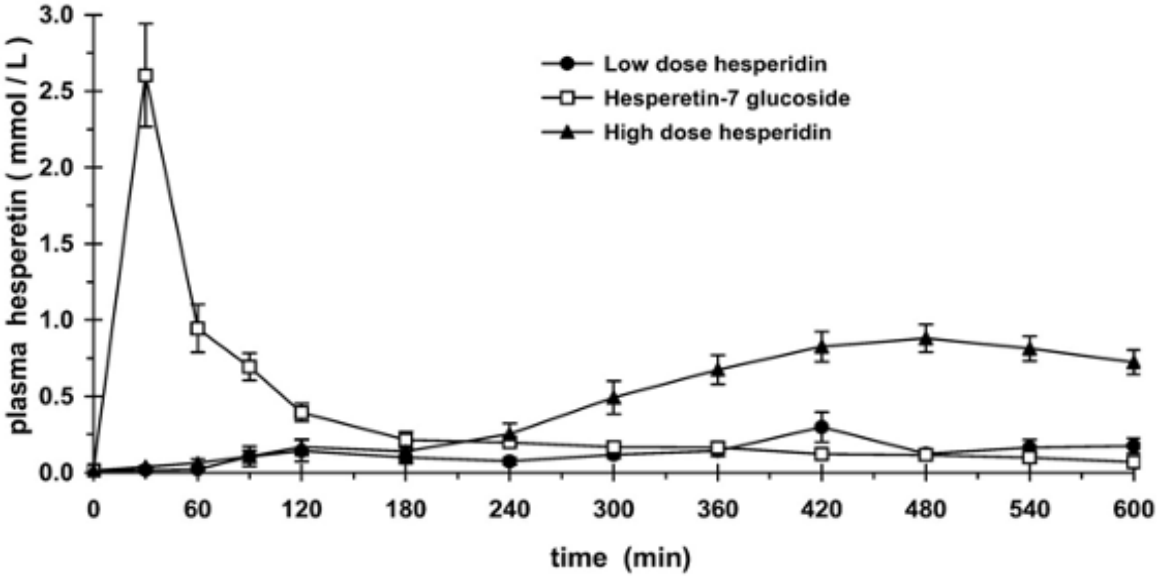


Figure 11 : Évolution de la concentration plasmatique en hespérétine après consommation de différentes boissons (Nielsen et al., 2016)

Chez les sujets ayant consommé le jus d'orange supplémenté en hespéridinase, le pic de concentration plasmatique en hespérétine était respectivement 4 fois et 1,5 fois plus élevée que chez les sujets ayant consommé le « Low dose hesperidin » et le « High dose hesperidin ». De plus, le temps nécessaire pour atteindre cette concentration maximale était significativement réduit par rapport aux sujets des autres groupes. Ce résultat montre l'intérêt des réactions de transformation des composés sous forme aglycone pour faciliter leur absorption. On notera qu'à la suite d'une consommation de « High dose hesperidin », une distribution plasmatique progressive est observable sur une durée de 10 heures (représentant la cinétique d'absorption d'un aliment riche en polyphénols). Au cours de cette étude, il a été démontré que ces réactions conditionnent à la fois les temps d'apparition et les concentrations de métabolites dans le

plasma mais également le site d'absorption des polyphénols (intestin grêle ou colon) (Nielsen et al., 2006).

En effet, les réactions enzymatiques ayant lieu au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle ne permettent pas l'absorption de tous les polyphénols contenus dans le bolus alimentaire. Certains polyphénols sous des formes glycosylées (présentant des résidus rhamnose, glucoside, glucuronide, sulfate, amide, ester ou encore les polymères d'ellagitanins et tanins condensés) doivent atteindre le côlon avant d'être hydrolysés et transformés par les enzymes du microbiote intestinal. Une fois ces étapes effectuées, ces polyphénols et leurs métabolites pourront eux aussi être métabolisés au niveau du foie, distribués au niveau des différents organes avant d'être excrétés (L. Bravo, 2009; González-Sarrías et al., 2017).

Rapportés à notre contexte d'étude (la consommation de tisanes à base de plantes médicinales), deux remarques peuvent être faites :

- La transformation préalable des composés en aglycones permet d'atteindre rapidement une concentration maximale de métabolites circulants. L'absorption rapide des métabolites pourrait présenter un intérêt dans le cas des tisanes traditionnellement consommées avant et après le repas (par exemple : pour la régulation de la glycémie) car il permettrait une mise à disposition rapide des métabolites à des concentrations élevées. Cependant, cela impliquerait que les métabolites contenus dans les tisanes soient présents sous formes aglycones.
- L'absence de transformation préalable en aglycones conduit à une distribution plasmatique continue et progressive des métabolites sur une durée plus longue. Ce phénomène est observé dans des conditions normales de consommation. Cette absorption progressive est liée à la transformation des composés par le microbiote intestinal et présenterait un avantage dans le cas des tisanes consommées quotidiennement dans le cas du traitement de maladies chroniques comme le diabète.

4.3.2. La transformation des polyphénols par le microbiote intestinal

Les polyphénols n'ayant pas été absorbés au niveau de l'intestin grêle, sont acheminés jusqu'au côlon où ils seront métabolisés par le microbiote intestinal (Williamson & Clifford, 2017).

Il existe trois grands types de réactions enzymatiques effectuées par le microbiote : les réactions d'hydrolyse, de clivage et de réduction. Ces modes de dégradation favorisent non

seulement l'absorption des polyphénols alimentaires mais permettent aussi de générer des « métabolites », plus petits en taille et présentant, selon leur structure, plus ou moins d'extrémités réductrices comparé aux composés parents (Espín et al., 2017).

Les ***acides phénoliques*** par exemple, sont généralement transformés par le microbiote intestinal via des réactions de clivage et de scission de leur cycle aromatique. Ils sont à l'origine de différents composés comme l'acide 3-(3-hydroxyphenyl)-propionique pouvant être issu de la transformation de l'acide chlorogénique, l'acide férulique, ou l'acide caféique (Rechner et al., 2004).

L'étude menée chez l'Homme, par l'équipe d'Alan Crozier a permis d'identifier par spectrométrie de masse HPLC-MS, les métabolites plasmatiques et urinaires de différents acides hydroxycinnamiques associés à la consommation de café. Il était alors possible de distinguer :

- Les métabolites ayant été directement absorbés au niveau de l'intestin grêle (présents dans le plasma une heure après consommation) : l'acide caféique 3-O-sulfate, l'acide férulique-4-O-sulfate et les 3- et 4- acide caffeoylquinique lactones.
- Les métabolites transformés par le microbiote intestinal (présents dans le plasma au bout de 4 h) : l'acide dihydroférulique, les acides dihydrocaféiques 3-O et 4-O sulfate. (Stalmach et al., 2009).

Parmi ***les flavonoïdes***, seuls 10% d'entre eux sont absorbés au niveau de l'intestin grêle, les 90% restants subissent au niveau du côlon des réactions de scission pouvant aussi libérer des acides phénoliques. La quercétine, par exemple, a été décrite comme pouvant être transformée par le microbiote en acide 3,4-dihydroxyphénylacétique, en acide 3-hydroxyphénylacétique, en acide hippurique ou en acide protocatéchique (Murota et al., 2018).

L'équipe du Pr Wenhua Ling a étudié le catabolisme des flavonoïdes quercétine, kaempférol (flavonols), apigénine, lutéoline (flavanones) et naringénine (flavanone) dans un modèle murin. A l'issue de l'analyse des métabolites retrouvés dans les urines et les fèces par HPLC-MS/MS, différentes hypothèses ont été émises quant aux mécanismes de transformation des polyphénols. De manière globale, on notera que le catabolisme des flavonoïdes peut aboutir aux mêmes types de métabolites et commence par une réaction de scission du cycle aromatique. Cependant, le type de réaction et le nombre de réactions pour y aboutir peut différer (c'est le cas pour la lutéoline dont le produit de scission, l'acide hydroxycaféique, doit être réduit pour permettre la formation d'acide 3-(4-hydroxyphénylpropionique))(W. Lin et al., 2016).

Les ***anthocyanes*** sont séparées de leurs chaînes glucidiques et subissent un clivage de leur hétérocycle pour former des dérivés phloroglucinol et des acides benzoïques (Tian et al., 2019). Les ***tanins ellagiques*** et l'acide ellagique sont métabolisés par le microbiote sous la forme d'urolithines. Une étude des métabolites microbiens issus de la transformation des polyphénols de la grenade chez l'Homme a montré que l'urolithine A était la forme la plus représentée (Nuñez-Sánchez et al., 2014).

Une étude menée sur la biodisponibilité des ***catéchines*** et des ***procyanidines*** présents dans le thé vert *Camellia sinensis*, a montré la présence de différents métabolites d'origine microbienne 6 h à 48 h après consommation. La consommation de l'infusion de thé vert, qui contenait 400 mg de catéchines (catéchines, épicatéchine gallate, épigallocatéchine et épigallocatéchine gallate) a permis la détection de l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque, l'acide 3-méthoxy-4-hydroxy-hippurique et de l'acide vanillique (acide 3-méthoxy-4-hydroxybenzoïque) (Pietta et al., 1998).

Les métabolites spécifiques à la transformation par le microbiote intestinal

Certains métabolites peuvent être spécifiques à une transformation par le microbiote intestinal. C'est le cas des métabolites présentés dans le **Tableau 6** :

Tableau 6 : Métabolites issus de la transformation de composés parents par le microbiote intestinal

Polyphénol parent	Métabolites
Mangiférine	Norathyriol
Acide Ellagique	Urolithines A et B
Quercétine	Isorhamnétine, acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique, acide 3-hydroxyphényl-propionique
Myricétine	Acide 3,5-dihydroxyphénylacétique
Catéchine	Acide 3',4'-dihydroxyphénylvalérique
Kaempférol	Acide 2-4-hydroxyphénylpropionique
Secoisolariciresinol (lignane)	Entérolactones, entérodiol
Isoflavones (génisteine, daidzéine)	Equol, *O*-desméthylangolensine.
Hespéridine	Hesperétine

Par ailleurs, la composition du microbiote intestinal aura elle aussi un effet sur les teneurs et le type de métabolites retrouvés dans la circulation sanguine (W. Lin et al., 2016).

Les interactions entre les polyphénols et le microbiote intestinal

Les interactions entre le microbiote intestinal et les polyphénols ne se limitent pas aux réactions de catabolisme précédemment citées. En effet, il a été démontré que la consommation régulière de produits riches en polyphénols aurait une action sur la composition du microbiote intestinal. Au-delà du fait que cet apport en polyphénols soit associé à un apport régulier en fibres (prébiotiques dont l'impact sur le microbiote intestinal est connu), des études ont montré spécifiquement l'impact des polyphénols sur la composition de la flore intestinale. Certains polyphénols favorisent la croissance de bactéries non pathogènes comme *Akkermensia muciniphila* qui a été décrite pour avoir des effets sur l'insulinorésistance et l'endotoxémie associées au syndrome métabolique.

(Patrice D. Cani & de Vos, 2017; Roopchand et al., 2015)

4.3.3. La transformation par les enzymes hépatiques

Les enzymes de détoxification du foie sont aussi à l'origine des transformations des polyphénols. Les réactions de méthylation, glucuronidation, oxydation et sulfatation par les enzymes des phases 1 et 2 hépatiques ont pour objectifs de faciliter l'excrétion des composés via les urines en augmentant leur solubilité. Concernant le métabolisme des flavonoïdes, il est effectué de façon prédominante par les enzymes de la phase 2. Les métabolites retrouvés majoritairement *in vivo* sont les formes glucuronides et sulfates sont produits respectivement via l'activité de l'UDP-Glucuronosyl transférase et les Phénol sulfotransférases (Scalbert & Williamson, 2000).

Une étude menée sur une culture primaire d'hépatocytes humains a montré l'importance des interactions entre le microbiote intestinal et les enzymes hépatiques. L'expérimentation a révélé que les hépatocytes incubés avec de l'extrait de thé vert après conversion par le microbiote intestinal (« converted green tea ») permettait une production significativement élevée d'acide 3-hydroxybenzoïque (3-OHBA), d'acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique (3,4-DiOHPPr), d'acide hippurique et d'acide férulique (Vetrani et al., 2016).

La **Figure 12** résume le métabolisme des polyphénols.

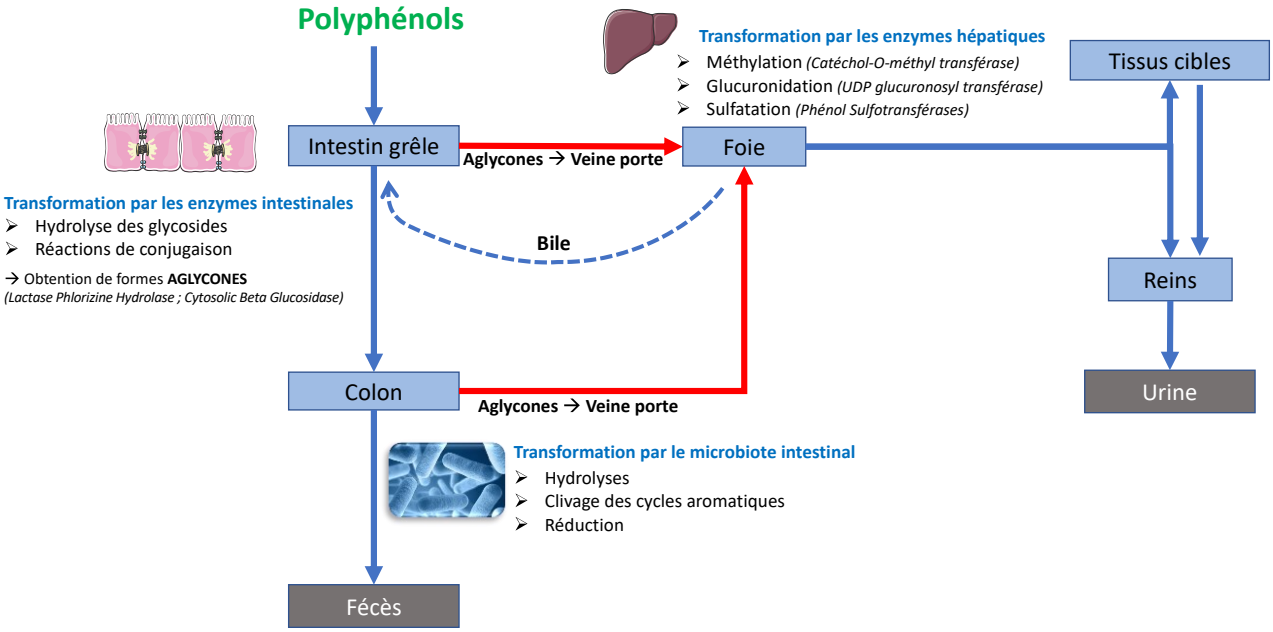


*Figure 12 : Métabolisme des polyphénols issus de l'alimentation. Adapté de Marin et al., 2015. Les polyphénols présents dans le bolus alimentaire sont sous forme glycosylée, une fois l'hydrolyse effectuée au niveau de l'intestin grêle et/ou du côlon, les aglycones seront **absorbés** et entreront dans la circulation sanguine. Ils seront **distribués** au foie par la veine porte. Ils seront alors **métabolisés** (méthylés, glucuronidés ou encore sulfatés) afin d'augmenter leur solubilité et faciliter leur excrétion. Ils seront distribués par la suite au niveau des tissus cibles puis **éliminés** via les urines.*

4.3.4. Variabilité des paramètres de pharmacocinétique des polyphénols et de leurs métabolites dans le plasma, les urines et les organes

Les polyphénols et leurs métabolites ont des temps de rétention dans l'organisme qui leur sont spécifiques. Il est possible d'étudier la biodisponibilité d'un composé au travers de plusieurs paramètres :

- La durée pour atteindre la concentration maximale dans le plasma (qui marque la fin de l'étape d'absorption et le début de l'étape de distribution)
- La durée pour atteindre la concentration maximale dans les urines (qui marque la fin de l'étape de métabolisme et l'étape d'excrétion)

L'étude menée par Xie *et al.* sur 6 adultes ayant pris une supplémentation de 500 mg de polyphénols de baie d'aronia a mis en évidence que les temps nécessaires à la mesure d'une concentration maximale d'un métabolite (t_{max}) sont différents selon que le métabolite se trouve dans le plasma ou l'urine. L'analyse métabolomique ciblée de ces deux types d'échantillons biologiques (plasma et urine) a permis de mettre en évidence des différences pour certains

composés : l'acide protocatéchique, par exemple, atteint une concentration maximale plasmatique à t_{max} =1 h ± 0,00 contre t_{max} = 4 h ± 0,52 pour atteindre une concentration maximale dans les urines. Une même observation est possible pour la cyanidine-3-O-glucoside (t_{max} plasma = 1,60 h ± 0,24 contre t_{max} urine = 6,00 h ± 3,35) et l'acide hippurique (t_{max} plasma = 5,33 h ± 0,67 contre t_{max} urine = 6,33 h ± 2,25). Ces différences de t_{max} plasmatiques et urinaires indiquent que les étapes de distribution, métabolisme et excrétion sont propres à chaque composé. D'autres composés, comme le métabolite acide 3-(4-hydroxyphenyl)-propionique, présentent cependant des t_{max} plasmatiques et urinaires très proches (t_{max} plasma t_{max} = 6,33 h ± 1,45 et t_{max} urine = 6,33 h ± 2,25). Ce résultat suggère que ce métabolite (3-4HDP) issu de la transformation par le microbiote intestinal n'est pas resté longtemps dans la circulation sanguine et a été rapidement excrété (Xie et al., 2016).

Bien que les métabolites retrouvés dans les urines aient d'abord été présents au niveau plasmatique, il existe une différence de répartition des métabolites dans le plasma et dans les urines.

Une étude menée sur 10 volontaires sains âgés de 18 à 35 ans ayant consommé une même quantité de jus de cranberry, *Vaccinium* subg. *Oxycoccus*, a montré que l'abondance des métabolites retrouvés (plus de 24 heures après consommation) n'était pas la même dans le plasma et les urines. En effet, les métabolites majoritairement retrouvés dans le plasma étaient les acides hippuriques (l'air sous la courbe, AUC, de 44,7 %) suivis des catéchols (22,4 %), des acides benzoïques (14,7 %) et des acides phénylacétiques (10 %) tandis que les urines contenaient des acides hippuriques (64 %), des acides phénylacétiques (14,5 %), des acides benzoïques (9,2 %) et des catéchols (4,7 %) (Feliciano et al., 2016). Cet autre résultat pourrait indiquer une utilisation ou une rétention (au niveau d'organes cibles) de certains composés qui seraient alors moins présents dans les urines.

Des études de pharmacocinétique ont, justement, porté sur la répartition des composés au niveau des organes. Celle de Sale *et al.,* par exemple, a évalué par HPLC-MS, la biodistribution des métabolites issus de la consommation de 240 mg/kg de resvératrol par des souris (0 à 120 min post-administration par voie intra-gastrique). Ces teneurs ont été mesurées dans le plasma, le foie, les reins, les poumons, le cœur, le cerveau, la muqueuse intestinale et le côlon. Les organes présentant les teneurs les plus élevées en métabolites étaient l'intestin grêle, le côlon, le foie et le cœur (avec des teneurs respectives de 36 960, 2869, 2150 et 2072 nmoles. mL^{-1}) (Sale et al., 2004).

4.3.5. Du transport des polyphénols à l'entrée dans la cellule cible

La circulation sanguine permet le transport des composés, qu'il s'agisse de polyphénols ou de leurs métabolites issus de la transformation par les enzymes intestinales, hépatiques ou par le microbiote intestinal (Clifford et al., 2013). Bien que la présence et la circulation de polyphénols au niveau du système lymphatique ait été décrite, la distribution des polyphénols aux cellules de l'organisme se fait majoritairement par le biais de la circulation sanguine (Nakamura et al., 2018).

- Les ***protéines plasmatiques*** comme l'albumine peuvent se lier aux polyphénols et permettre leur transport vers les cellules cibles (Latruffe et al., 2014). Les travaux de l'équipe de Sengupta ont mis en évidence la liaison de la quercétine à l'albumine humaine qui se traduisait par un changement drastique des profils de fluorescence (paramètres d'émission et d'excitation) (Sengupta & Sengupta, 2002, 2003).
- Les ***lipoprotéines*** sont aussi des éléments permettant le transport des polyphénols. En 1998, les travaux de l'équipe du Dr Gozzelino ont montré que le resvératrol se liait aux lipoprotéines de basse densité (LDL et VLDL) (Belguendouz et al., 1998).

L'étude menée par Burkon et Somoza *in vitro* a mis en évidence que plus de 90% de la forme libre de trans-resvératrol était liée aux lipoprotéines plasmatiques humaines via des liaisons non-covalentes (Burkon & Somoza, 2008).

Les polyphénols étant connus pour leurs effets cardio-protecteurs, une étude a été effectuée par l'équipe du Dr Joe Vinson sur 41 polyphénols différents afin d'étudier la capacité de ces derniers à se lier à l'albumine et aux LDL. L'affinité de chaque polyphénol pour l'albumine ou les LDL a été évaluée par des tests de fluorescence et par des séparations par HPLC. Les constantes de liaison de Stern-Volmer (K) obtenues ont mis en évidence que les liaisons des polyphénols étaient nettement plus fortes pour l'albumine que pour les LDL. Par exemple : pour la quercétine $K_{LDL} = 2{,}61.10^5 M^{-1}$contre $K_{BSA} = 6{,}96.10^5 M^{-1}$ et pour l'acide ellagique $K_{LDL} = 2{,}71.10^5 M^{-1}$ contre $K_{BSA} = 20.010^5 M^{-1}$. Cependant, les LDL présentent un nombre de liaisons (n) avec les polyphénols, significativement plus élevé que l'albumine. Cela s'expliquerait notamment par la présence d'apoB100 qui présente plus de sites favorables à la formation de liaisons (via les interactions électrostatiques et les forces de Van Der Waals). D'autres régions comme la surface de l'apo-B100 et des phospholipides pourraient aussi (faiblement) contribuer à l'affinité des polyphénols avec les LDL. Il a aussi été démontré que la présence de résidus O-

méthylés augmentait l'hydrophobicité des polyphénols et pourrait accentuer leur liaison aux LDL (Poloni et al., 2019).

L'étude menée par Hernàez *et al.,* a montré sur 47 sujets sains que la consommation d'huile d'olive riche en polyphénols modulait la taille et les fonctions des HDL et augmentait la présence des métabolites tels que le sulfate d'hydroxytyrosol, l'acide homovanillique et le glucuronate d'acide homovanillique à l'intérieur des HDL. Cela montre que les polyphénols peuvent aussi être transportées par les lipoprotéines de haute densité (Hernáez et al., 2014).

La vectorisation des polyphénols hydrophobes (curcumine, resvératrol) par des HDL de synthèse est un axe de recherche du Laboratoire DéTROI.

Cette propension des polyphénols à se lier aux lipoprotéines comme les LDL et HDL pourrait leur permettre d'atteindre les lésions athéromateuses pour y exercer leur bioactivité.

4.4. Bioactivité des polyphénols

Les polyphénols sont décrits dans la littérature pour leurs effets bénéfiques sur la santé notamment dans la prévention de la survenue du cancer, des maladies métaboliques ou encore cardiovasculaires (Baron-Menguy et al., 2007; Dai & Mumper, 2010; Santhakumar et al., 2018). Ces effets sont dus à différentes propriétés : leurs propriétés antioxydantes, leur capacité à interagir avec les enzymes (impliquées dans le métabolisme ou encore le maintien de l'équilibre redox) et leur impact sur les voies de signalisation cellulaire (régissant notamment l'expression des gènes) (Andriantsitohaina et al., 2012; Kondratyuk & Pezzuto, 2004; Luca et al., 2020).

4.4.1. L'activité antioxydante

Les radicaux libres tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS comme OH°, O2°), peuvent être à l'origine d'un déséquilibre redox et altérer les lipides, les protéines et l'ADN. Ce phénomène de stress oxydant, engendré par les radicaux libres, peut conduire à l'activation de voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'apparition de maladies métaboliques et cardiovasculaires (D'Archivio et al., 2012; Sies, 1997).

La présence d'extrémités réductrices au niveau de leurs noyaux phénoliques confère aux polyphénols des propriétés antioxydantes (Perron & Brumaghim, 2009).

Selon la littérature, les polyphénols (ArOH) peuvent exercer leur activité antioxydante sur des radicaux libres (R°) selon quatre mécanismes distincts que sont le transfert de proton (HAT) associé ou non au transfert d'un hydrogène (PCET), le transfert séquentiel d'électron et de proton (SET-PT), la réduction associée à un transfert d'électron (SPLET) et la formation d'adduits (K. Yoshida et al., 2017).

- HAT (H-atom transfer) et/ou PCET (proton-coupled electron transfer)
  $ArO - H + R° \rightarrow ArO° + R - H$
- SET-PT (sequential electron transfer-proton transfer)
  $ArO - H + R° \rightarrow ArOH°^{+} + R^{-} \rightarrow ArO° + R - H$
- SPLET (sequential proton loss-electron transfer)
  $ArO - H \rightarrow ArO^{-} + H^{+}$; $ArO^{-} + R° \rightarrow ArO° + R^{-}$; $R^{-} + H^{+} \rightarrow R - H$
- AF (adduct formation)
  $ArO - H + R° \rightarrow [ArOH - R]°$; $ArO° + R - H$ et autres produits d'oxydation

Les polyphénols sont considérés comme des antioxydants car ces composés ont la capacité de retarder l'oxydation engendrée par un radical libre tout en gardant leur stabilité (Rice-Evans et al., 1996).

Des travaux menés au Laboratoire DéTROI sur 26 polyphénols et 2 de leurs métabolites microbiens (acide 3,4-DiOHphénylacétique et acide hippurique) ont mis en évidence leur capacité antioxydante par les tests de réduction du radical libre DPPH et par le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Les catéchines (EGG, ECG, EC), la quercétine et l'acide gallique faisaient partie des composés phénoliques ayant les plus fortes activités antioxydantes (activités réductrices et activité anti-radicalaire « radical scavenging »). Par exemple, l'acide gallique et la quercétine à une concentration finale de 50 µM pouvaient réduire respectivement 69,84 ± 0,91 % et 60,15 ± 0,73 % du radical libre DPPH (Hatia et al., 2014).

L'étude de Pérez-Jiménez *et al.* a montré chez des sujets sains (n=14) que la consommation de 15 grammes de polyphénols associés à des fibres végétales (extraits de peau et pépins de raisins riches en tanins condensés) augmentait significativement la capacité du plasma à réduire des radicaux libres "ABTS" et "FRAP" (le maximum de la capacité antioxydante étant atteinte au bout de 8 heures après ingestion) (Jara Pérez-Jiménez et al., 2009). Ces résultats montrent l'intérêt de la présence des polyphénols et de leurs métabolites dans la circulation sanguine. Ainsi, les polyphénols circulants pourraient, par exemple, neutraliser les radicaux libres circulants, ou présents à la surface des cellules et des lipoprotéines.

Les travaux menés par Tedesco effectués sur les polyphénols contenus dans le vin rouge valident cette hypothèse. Lors de leur expérimentation, des globules rouges humains ont été pré-incubés pendant 1 heure en présence de vin rouge puis soumis pendant 5 heures à un stress oxydant mimé par l'ajout de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les résultats ont montré que le vin rouge le plus riche en polyphénols avait permis une inhibition de la lyse des globules rouges de l'ordre de 25%. Ces polyphénols majoritaires dans le vin rouge étaient : la catéchine (191,3 mg/L), l'acide gallique (95,0 mg/L) et l'épicatéchine (82,0 mg/L) (Tedesco et al., 2000).

L'étude de l'équipe de Kazuo Kondo en 2007 a mis en évidence que la consommation d'une poudre de cacao riche en polyphénols (catéchine et épicatéchine) a eu pour effet de ralentir l'oxydation des LDL plasmatiques. En effet, sur les 25 sujets sains testés, les 13 personnes ayant consommé la poudre de cacao (26 g/ jour) sur une durée de 12 semaines présentaient des LDL moins sensibles à l'oxydation que ceux qui n'avaient pas consommé de cacao. Ainsi, il a été observé que le temps de formation de diènes conjugués (Lag time) lorsque ces LDL étaient soumis à une oxydation par le 2,2'-azobis-(4-methoxy-2,4-diméthylvaleronitrile) était significativement plus élevé chez les sujets ayant consommé du cacao que chez les individus du groupe contrôle (Lag time Cacao = 62,8 ± 1,8 min contre Lag time control = 47,0 ± 2,3 min) (Baba et al., 2007).
L'activité antioxydante des polyphénols peut aussi, par exemple, participer à la réduction des phénomènes de stress oxydant (extra et/ou intracellulaire) ou encore de dysfonction endothéliale, ces actions expliqueraient en partie le rôle que peuvent jouer les polyphénols dans la prévention des maladies cardiovasculaires (Cheng et al., 2017; Croft, 2016).

Cependant, il a déjà été décrit dans la littérature que les produits d'oxydation des polyphénols, les semi-quinones et quinones pourraient être à l'origine d'un effet pro-oxydant (Nemeikaitė-Čėnienė et al., 2005). Selon B. Halliwell, les polyphénols pourraient avoir un rôle pro-oxydant dans le cas où ils seraient en contact avec des ions métalliques non absorbés au niveau du tractus intestinal (Halliwell, 2008).

De manière générale, la réduction des effets délétères des radicaux libres par les polyphénols se fait grâce aux propriétés réductrices conférées par leur structure mais aussi par leur capacité à moduler la production d'enzymes antioxydantes endogènes comme la SOD ou la catalase (Hua Zhang & Tsao, 2016).

4.4.2. La modulation des activités enzymatiques

La bioactivité des polyphénols s'exprime aussi par leur capacité à inhiber ou réduire l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme mais aussi de celles qui sont impliquées dans le dysfonctionnement vasculaire :

Influences sur l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique
Les polyphénols peuvent impacter le métabolisme des lipides et des glucides en intervenant sur l'activité enzymatique. Ce paramètre de bioactivité est particulièrement important dans le contexte des maladies métaboliques et plus particulièrement dans le cas des dyslipidémies.

La phlorizine de la pomme (un polyphénol – hétéroside de chalcone) a été décrite comme un potentiel agent hypolipémiant, diminuant à la fois les taux de triglycérides circulants et les taux de cholestérol hépatiques et plasmatiques et participant activement à l'excrétion fécale des stérols. Sur une période de 6 semaines, des hamsters *Mesocricetus auratus* (n=36 / 4 groupes de 9) ont été nourris avec un régime supplémenté ou non en phlorizine. Les résultats ont montré que cette supplémentation en phlorizine avait induit la diminution significative de l'activité de l'HMG-CoA-Réductase (hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase, enzyme impliquée dans la synthèse du cholestérol) de près de 30 % et celle de CETP plasmatique (cholesteryl ester transfer protein, participant au « remodelage » des lipoprotéines circulantes) de près de 23 %. Cette étude a été complétée par une expérimentation *in silico* qui a montré que l'inhibition de l'HMG-Co-R par la phlorizine pouvait s'expliquer par le fait qu'elle possédait les mêmes sites de fixation (« pocket 1HW9 ») sur l'HMG-CoA-Réductase (HMGCoA-R) que la statine « simvastatine » (L. Wang et al., 2019).

Les tests *in vitro* menés par l'équipe de Kohji Yamaki sur 15 polyphénols (10 flavonoïdes et 5 acides phénoliques) ont mis en évidence la capacité des polyphénols à inhiber l'activité de la lipase pancréatique. Les conséquences de cette inhibition à l'échelle physiologique se caractérisent par une diminution des taux de triglycérides circulants. Le principe du test d'inhibition consiste en le dosage du résidu 2,3-dimercaptopropanol (BAL) clivé par la lipase pancréatique. Des valeurs d'IC_{50} minimales ont été observées pour l'épigallocatéchine (EGC) – 237,3 ± 34,8 µM, l'épigallocatechin-3-gallate (EGCG), 391,2 ± 49,7 µM, l'acide gallique 387,2 ± 27,3 µM, et l'éthyl gallate (un dérivé de l'acide gallique) 4,5.103 ± 0,7 µM suggérant leur potentiel à inhiber l'enzyme (Rahim et al., 2015).

D'autres études *in silico* ont été menées sur les interactions entre les polyphénols de la peau de pomme et l'α-glucosidase (impliquée dans le métabolisme des glucides). La phlorizine a exercé une inhibition compétitive sur l'enzyme. L'acide tannique, l'épicatéchine quant à eux ont exercé des inhibitions de type mixte. L'hypothèse émise par les chercheurs a été que l'ensemble de ces polyphénols a pu inhiber l'activité enzymatique en changeant la conformation de l'enzyme (diminuant le nombre d'hélices α et β) (Gong et al., 2020).

Influences sur les activités enzymatiques dans le contexte d'athérosclérose

L'action inhibitrice des polyphénols peut être un élément important pour empêcher l'augmentation du stress oxydant associée au contexte d'athérosclérose. Les polyphénols peuvent par exemple diminuer l'activité enzymatique des NADPH oxydases (NOx) qui sont des enzymes pro-oxydantes connues pour favoriser une production anormalement élevée de radicaux libres ($^{\cdot}HO$, $O_2^{\cdot -}$) (Calabriso, Scoditti, et al., 2016).

La capacité des polyphénols comme le trans-resvératrol, le kaempférol et la quercétine à inhiber les métalloprotéinases matricielles (MMP2 et MMP9) a aussi été décrite dans la littérature. Par cette action, les polyphénols pourraient limiter le processus d'athérosclérose dans ses phases précoces (athérogénèse) et tardives (complications cliniques) (Calabriso, Massaro, et al., 2016).

4.4.3. L'impact sur les voies de signalisation cellulaire

L'action des polyphénols sur les voies de signalisation est l'un des paramètres qui explique la diversité de leurs actions à l'échelle biologique.

L'influence des polyphénols dans le fonctionnement des voies de signalisation du métabolisme énergétique

La bioactivité que peuvent exercer les polyphénols au niveau du métabolisme des lipides constitue un enjeu majeur dans la diminution de certains facteurs de risque de l'athérosclérose (dyslipidémies, obésité viscérale, diabète).

Par exemple, les extraits aqueux et éthanoliques de chayotte ou chouchou, *Sechium edule*, contenant de l'acide protocatéchique, du gallocatéchine gallate, de l'acide caféique, de la rutine, de la quercétine et de la naringénine ont été étudiés par l'équipe de Wang *et al*. Il a été démontré sur un modèle cellulaire d'hépatocyte HepG2, que ces extraits riches en polyphénols induisaient une diminution de l'accumulation des lipides dans ce modèle cellulaire. L'exploration mécanistique a alors montré l'impact des extraits riches en polyphénols sur la voie de l'AMPK (AMP-activating protein kinase) qui pourrait être à l'origine de la modulation de facteurs du

métabolisme lipidique hépatique : diminution de la production des enzymes comme l'acide gras synthase (FAS) et HMG-CoA réductase (HMGCoA-R), augmentation de l'expression de la carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) et diminution des facteurs de transcription Sterol regulatory element binding protein (SREBP) et Peroxisomes proliferators activated receptor α (PPARα) (Wu et al., 2014).

L'effet des polyphénols contenus dans la grenade *Punica granatum* (acide ellagique et punicalagine) sur la conversion du cholestérol en acide biliaire a été particulièrement étudié. Il s'est avéré que sur le modèle cellulaire hépatique humain L-02, la présence de ces polyphénols activait la voie de signalisation cellulaire PPARγ /ABCA1/CYP7A1 qui favorisait la transformation du cholestérol et son élimination sous forme d'acides biliaires (Lv et al., 2016).

Dans un modèle d'adipocytes murins, il a été montré que la quercétine pouvait moduler l'adipogenèse via les voies de signalisation ERK, JNK et p38MAPK et empêcher l'expression de facteurs de transcription permettant la différenciation adipocytaire (C/EBPβ ; PPARγ, C/EBPα, FABP). Il a aussi été dans un modèle de zébrafish, que la quercétine engendrait une diminution de l'accumulation des lipides (triglycérides) (Seo et al., 2015).

Dans un modèle *in vivo* favorisant l'apparition du diabète de type 2, il a été observé que la consommation d'acide corosolique par des souris C57BL/6 soumises à un régime riche en graisses avait pour effet d'atténuer l'augmentation de leur hypertriglycéridémie et hypercholestérolémie, d'augmenter leur sensibilité à l'insuline et leur tolérance au glucose. Selon les chercheurs, l'acide corosolique aurait activé la voie de signalisation de l'AMPK et aurait aussi modifié la phosphorylation (Ser/Thr) au niveau du récepteur IRS-1 rétablissant ainsi le fonctionnement de la voie de signalisation de l'insuline (PI3K/Akt) (J. Yang et al., 2016).

L'amélioration de la réponse au stress oxydant : un résultat de l'intervention des polyphénols sur les voies de signalisation cellulaire

Outre leur activité antioxydante exogène, les polyphénols ont la capacité de moduler l'équilibre redox en intervenant notamment au niveau de l'activité et de la production des enzymes pro- et antioxydantes.

Dans le contexte d'athérosclérose par exemple, il existe un stress oxydant vasculaire marqué. Ainsi, les cellules endothéliales connaissent, elles aussi, un déséquilibre redox caractérisé par la production massive de ROS par des complexes comme les NADPH oxydases (Nox), les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale et la nitric oxide synthase endothéliale

(uncoupled eNOS) lorsque cette dernière n'est pas fonctionnelle. Le maintien de l'équilibre redox et la neutralisation des radicaux libres sont assurés par des enzymes antioxydantes endogènes comme les superoxyde dismutases (SOD), la catalase (CAT), les glutathion peroxydases (GSH), ou encore les paraoxonases (PON)(Förstermann et al., 2017).

L'impact que peuvent avoir les polyphénols sur les enzymes pro-oxydantes a été testé dans un modèle *in vitro* de cellules endothéliales de cordon ombilical humain (HUVEC) utilisé par Carnevale *et al.* Cette étude a mis en évidence la capacité de l'épicatéchine et la catéchine à diminuer la production de NOx par les cellules HUVEC en présence de plaquettes provenant de patients atteints d'artériopathie périphérique (R. Carnevale et al., 2014). Les polyphénols sont aussi connus pour augmenter la production d'enzymes antioxydantes. Les travaux de Xue-Wen Li ont montré que la consommation d'extraits riches en polyphénols issus de la plante *Dendrobium loddigesii* par des souris obèses diabétiques db/db a eu pour effet d'augmenter les teneurs en GSH, CAT et SOD dans les tissus hépatiques et rénaux (dans le foie des souris ayant consommé l'extrait de plante, la teneur en catalase était de 70,35 ± 5,07 unité /mg protéine contre 47,21 ± 1,59 pour le groupe témoin) (Li et al., 2018). La modulation des teneurs en enzymes en présence des polyphénols montre que ces derniers sont à même d'impacter les voies de biosynthèse et de signalisation cellulaire. En effet, la synthèse des enzymes pro-oxydantes Nox est régie par la voie de signalisation NF-κB/Nox/MMP tandis que celle des enzymes Catalase, SOD, GPx est issue de l'activation de la voie p-Akt /mTOR/PGC1-α (Serino & Salazar, 2018). La modulation de l'état pro-inflammatoire par les polyphénols intervient sur la production de cytokines, de monoxyde d'azote et de chimiokines.

L'activation des voies de signalisation AMPK, MAPK, NF-κB et TLR2/4 peut être à l'origine de la sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. En modulant l'état inflammatoire, les polyphénols participent à la prévention de l'apparition de maladies métaboliques.

Les travaux menés au Laboratoire ont montré sur un modèle d'adipocytes murins 3T3-L1 que la curcumine issue de *Curcuma longa* inhibait la production des cytokines pro-inflammatoires Interleukine-6 (IL-6), de Tumor Necrosis Factor-alpha (TNFα) et de la chimiokine Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) (Septembre-Malaterre et al., 2016).

Une autre étude menée sur un modèle murin "ICR" (from Institute of Cancer Research) soumis à un régime riche en graisses (HFD) (n=30) a montré que les concentrations plasmatiques en cytokines étaient modulées selon que la quercétine ou la curcumine étaient apportés en complément du régime HFD. En effet, la supplémentation du régime en polyphénols a induit la

diminution des taux de MCP-1, TNF-α, IL-1β et une augmentation des taux d'IL-10. Le modèle *in vitro* d'adipocytes 3T3-L1 utilisé en parallèle de l'expérimentation animale a confirmé cette observation. De plus, il a été démontré une activité anti-inflammatoire des polyphénols sur le modèle de macrophages RAW 264.7 en réduisant notamment la sécrétion de monoxyde d'azote (NO) lorsque les cellules étaient soumises à un stress pro-inflammatoire induit par le TNFα (Seo et al., 2015).

L'intervention des polyphénols sur les voies de signalisation cellulaire directement associées au processus d'athérosclérose

La production de ***molécules d'adhésion***, Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM-1), Intercellular Adhesion Molecule (ICAM-1) par les cellules endothéliales est fortement influencée par l'état pro-inflammatoire (notamment la présence de TNFα) ; elle constitue un facteur d'initiation et d'aggravation de l'athérosclérose (Nizamutdinova et al., 2009). Les travaux de Calabriso *et al.,* ont montré que les extraits de polyphénols de vin rouge (contenant des acides hydroxycinnamiques, des flavonols et des stilbènes) et les standards de polyphénols (1-25µM) diminuaient l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine par ces cellules (Calabriso, Scoditti, et al., 2016).

Les effets antiathérogènes des polyphénols sont aussi associés à leur capacité à limiter ***l'activation des macrophages***. L'étude sur le modèle murin (n=20) mené par Aharoni *et al.* a montré que les acides gallique et ellagique, ainsi que la punicalagine contenus dans le jus de grenade étaient à l'origine d'un changement phénotypique des macrophages situés au niveau des lésions athéromateuses aortiques. En effet, la présence des polyphénols favorisait la conversion de macrophages M1 « pro-inflammatoires » en macrophages M2 « anti-inflammatoires » (Aharoni et al., 2015). Ce phénomène a aussi été décrit par l'équipe de Liu *et al.,* qui travaillait sur les effets d'un polyphénol nommé la « géraniine ». Ce dernier inhibait la polarisation des macrophages M1 en intervenant sur la voie SOCS1/NF-κB (X. Liu et al., 2016). D'autres travaux ont montré que les polyphénols pouvaient aussi inhiber le changement phénotypique des macrophages en intervenant sur d'autres voies de signalisation comme celle des Toll Like Receptors (TLR)/MAPK/NF-κB (Momtazi-Borojeni et al., 2019). Un autre aspect des effets des polyphénols sur les macrophages est aussi leur potentiel à limiter la ***transformation des macrophages en cellules spumeuses*** en diminuant l'expression des récepteurs LOX-1 et CD36 (T.-T. Zhang et al., 2017).

Bilan Les polyphénols : ce qu'il faut retenir

- Les polyphénols sont majoritairement contenus dans les produits d'origine végétale et ont été identifiés/ quantifiés dans de nombreuses plantes médicinales.
- Ce sont des composés biodisponibles pouvant être métabolisés par le microbiote intestinal et transportés par l'albumine ou encore les lipoprotéines.
- La bioactivité des polyphénols concerne aussi bien les actions antioxydantes et la protection vasculaire que la capacité à moduler le métabolisme, l'état inflammatoire, et l'équilibre du microbiote.

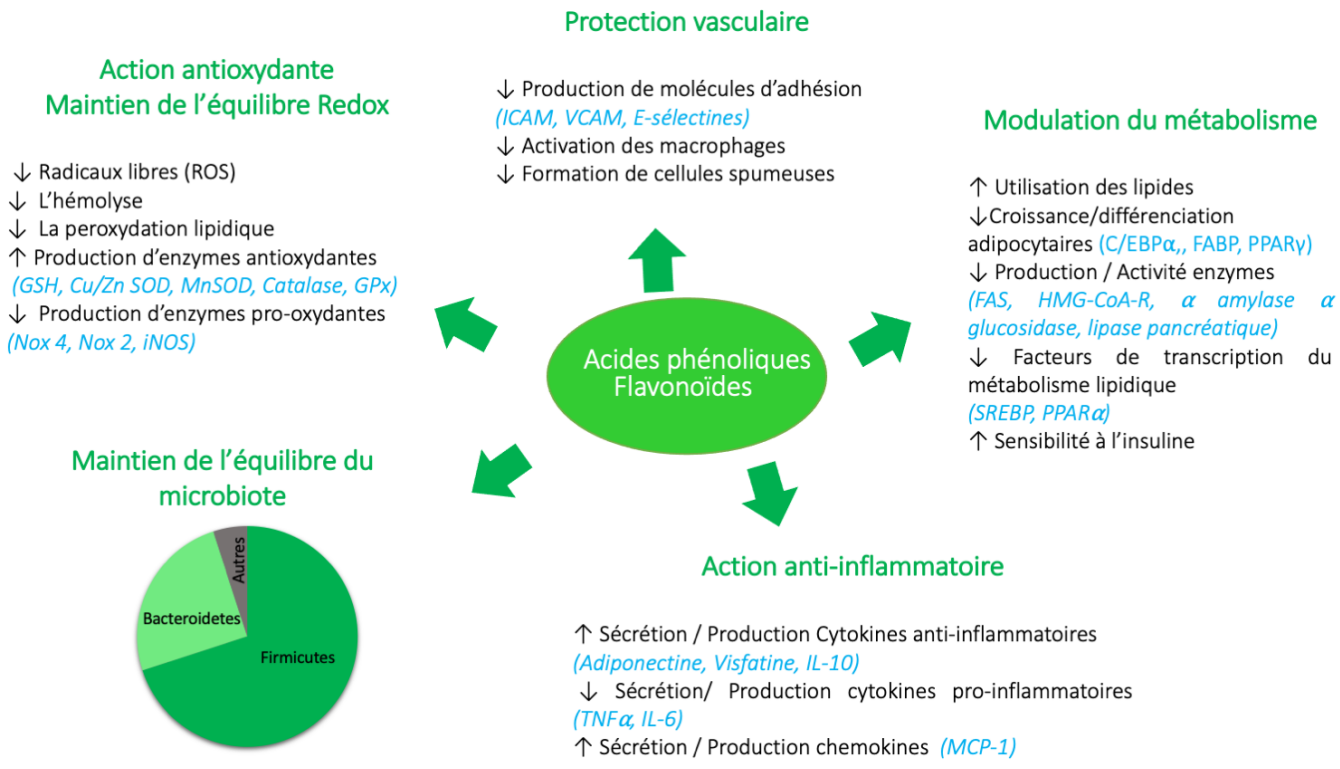


Illustration bilan 4 : Les polyphénols, des composés bioactifs

Les polyphénols présentent un intérêt dans la prévention et/ou le traitement des maladies cardiovasculaires. Ces composés pourraient être à l'origine de la bioactivité de nombreuses plantes médicinales.

L'exploration du contenu en polyphénols des plantes médicinales de La Réunion s'avère pertinente dans la mesure où ces composés sont décrits comme abondants dans les aliments d'origine végétale, biodisponibles et bioactifs.

Partie 2 : L'intérêt de l'utilisation des plantes médicinales dans le contexte d'athérosclérose

L'étude de la bioactivité des plantes médicinales et de leurs polyphénols dans le contexte d'athérosclérose implique une compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans cette pathologie. Dans cette partie seront présentés les principaux phénomènes associés à l'apparition et à l'aggravation de l'athérosclérose. Une attention particulière sera apportée à un type cellulaire impliqué dans cette pathologie : le macrophage.

5. L'athérosclérose

5.1. Définition et généralités

L'athérosclérose (présentée en **Figure 13**) est définie comme l'obstruction et le durcissement progressif des artères causés initialement par des dépôts d'origine lipidique formant ce que l'on appelle une "plaque d'athérome"(Lusis, 2000).

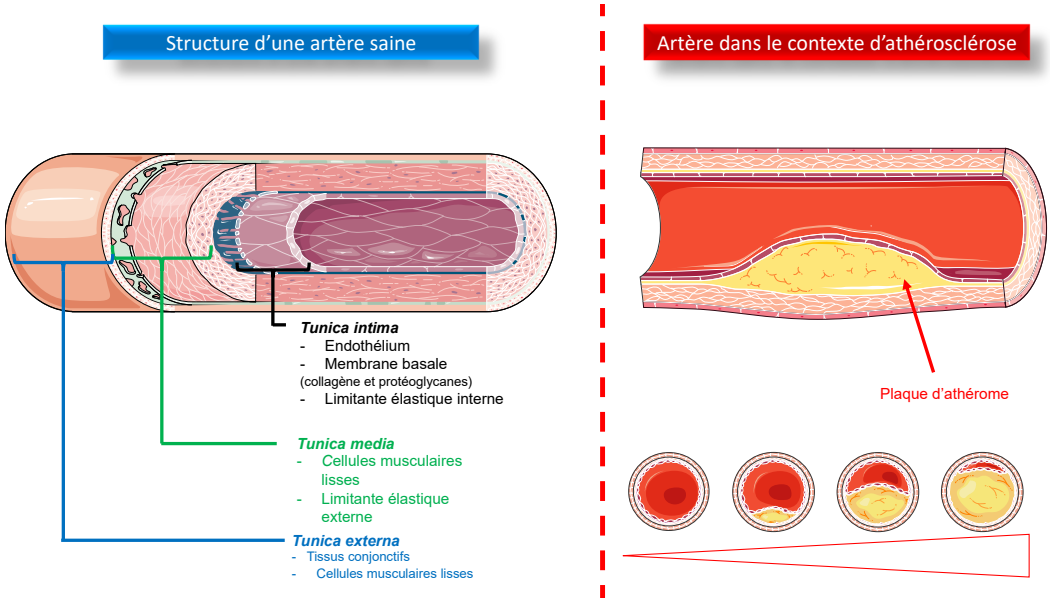


Figure 13 : Organisation des différents feuillets composant une artère et schématisation du processus d'athérosclérose. L'artère est composée de trois feuillets que sont l'adventice (tunica externa), la média et l'intima (de l'extérieur vers l'intérieur). Chaque feuillet rassemble différents types cellulaires qui leur confèrent leurs propriétés : soutien pour l'adventice (composée majoritairement de tissus conjonctifs, de fibroblastes et cellules musculaires lisses conférant un rôle de soutien pour la contention des artères de gros calibre), contractile pour la média (composé de cellules musculaires lisses à vocation contractile) et barrière pour l'intima (comportant des cellules endothéliales). L'intima est le feuillet le plus proche de la lumière artérielle, il est constitué d'une limitante élastique interne, de fibres de collagène et de protéoglycanes et d'une monocouche de cellules formant l'endothélium directement en contact avec le flux sanguin. Dans un contexte d'athérosclérose, un dépôt de lipides (constituant la plaque d'athérome) s'effectue entre l'endothélium et la média. L'expansion de la plaque d'athérome a pour conséquence l'obstruction de l'artère. (Image du groupe SERVIER complétée et modifiée avec les informations de (Lusis, 2000).

Ce processus associant à la fois un stress oxydant et un état inflammatoire chronique est à l'origine de nombreuses maladies cardiovasculaires comme les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques, l'Angor, l'infarctus du myocarde ou encore les artériopathies oblitérantes des membres inférieurs. L'athérosclérose est par ailleurs une maladie silencieuse ne présentant pas de symptôme avant la survenue d'un événement clinique (Gotlieb, 2005; Spitaleri et al., 1999).

Certaines techniques comme l'échographie permettent de mesurer l'épaisseur de l'intima ou la détection de plaques d'athérome. Le scanner (utilisation des rayons X) permet de détecter des zones où l'athérosclérose est à un stade avancé (présence de calcifications). Les méthodes d'angiographie (artériographie, phlébographie et coronarographie) constituent des examens invasifs permettant l'identification de sténose ou d'anévrisme et leur traitement (respectivement par dépôt de stent ou de microspires).

De manière générale, les dépôts lipidiques associés à des stades "précoces" de l'athérosclérose sont difficilement détectables via des méthodes non invasives. Cependant, l'étude de certains paramètres associés au métabolisme des lipides peut constituer une indication sur le risque d'athérosclérose.
A l'heure actuelle, il existe différentes stratégies de prévention et de traitement de l'athérosclérose :

- La modification de l'hygiène de vie (par exemple : amélioration de la nutrition)
- L'approche médicamenteuse (par exemple : les statines)
- Les approches interventionnelles (par exemple : l'angioplastie)

Les directives de la Société Européenne de Cardiologie (ESC) proposent différentes stratégies de prévention et de traitement via la modification de l'hygiène de vie. Premièrement, la consommation d'un régime équilibré pauvre en graisses saturées et riche en produits d'origine végétale est préconisée. Deuxièmement, l'utilisation de compléments alimentaires d'origine végétale est aussi conseillée, par exemple, les phytostérols, les fibres et les polyphénols issus du soja (Baigent et al., 2019).

Cette approche nutritionnelle, pourrait être utilisée pour limiter un risque majeur de l'athérosclérose : les taux de lipides circulants anormaux (dyslipidémies).

5.2. Rappels sur le métabolisme des lipides

Les lipides sont des molécules amphiphiles présentant une tête polaire hydrophile et un corps hydrophobe. Dans l'organisme, ces composés peuvent avoir différents rôles :

1) Réserve énergétique (en moyenne 1 g de lipides une fois métabolisé apporte 9 kcal)
2) Structurel (notamment en entrant dans la composition des membranes)
3) Fonctionnel (certains lipides sont à l'origine de composés impliqués dans la signalisation cellulaire)

Les lipides amphiphiles présents dans l'organisme sont les acides gras, les phospholipides et le cholestérol non estérifié. Les lipides strictement hydrophobes sont les triglycérides et le cholestérol estérifié. Ces formes hydrophobes sont destinées au stockage d'énergie au sein de la cellule. Les triglycérides et le cholestérol estérifié sont insolubles dans l'eau (et donc dans le plasma) et nécessitent l'utilisation de transporteurs nommés "lipoprotéines" leur permettant d'entrer dans la circulation lymphatique ou sanguine.

5.2.1. Les lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des particules possédant un cœur hydrophobe (pouvant contenir des triglycérides ou du cholestérol estérifié) entouré de lipides amphiphiles (phospholipides, cholestérol non estérifié) et de protéines nommées « apolipoprotéines ». Les apolipoprotéines (apo) ont différentes fonctions :

1) Éléments de structure
2) Ligands de leurs récepteurs spécifiques
3) Intervention dans la synthèse des lipoprotéines
4) Rôle de catalyseurs ou d'inhibiteurs d'enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines

(Feingold & Grunfeld, 2018)

5.2.2. La classification des lipoprotéines

Les lipoprotéines peuvent avoir des compositions en lipides et en apolipoprotéines différentes. Elles sont classées en fonction de leur densité hydratée (évaluée après ultracentrifugation) (Chapman et al., 1981).

Les différentes classes de lipoprotéines sont présentées dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Classification des lipoprotéines adapté de Feingold et Grunfeld, 2018

Lipoprotéine	Densité (g/ml)	Taille (nm)	Lipides majoritaires	Apolipoprotéines majoritaires
Chylomicrons	<0,930	75-1200	Triglycérides	apo B48, apo C, apo E
Chylomicrons remnants	0,930-1,006	30-80	Triglycérides, Cholestérol estérifié	apo B48, apo E
VLDL	0,930-1,006	30-80	Triglycérides	apo B100, apo E, apo C
IDL	1,006-1.019	25-35	Triglycérides, Cholestérol estérifié	apo B100, apo E , apo C
LDL	1,019-1,063	18-25	Cholestérol estérifié	apo B100
HDL	1,063-1,210	5-12	Cholestérol estérifié, Phospholipides	apo A1, apo C, apo E
Lp(a)	1,055-1,085	30	Cholestérol estérifié	apo B100, apo(a)

VLDL : Very Low Density Lipoprotein; IDL : Intermediate Density Lipoprotein ; LDL Low density Lipoprotein ; High Density lipoprotein.

De manière générale, 4 grandes classes de lipoprotéines sont étudiées. Trois types de lipoprotéines sont riches en lipides et présentent des apo B : chylomicrons, VLDL et LDL. Les chylomicrons et les VLDL transportent majoritairement des triglycérides tandis que les LDL transportent majoritairement le cholestérol estérifié. Un autre transporteur du cholestérol estérifié est la lipoprotéine HDL. Cette dernière présente une apolipoprotéine différente : l'apo A1.

5.2.3. Le métabolisme des lipoprotéines

L'apport de cholestérol et de triglycérides exogènes

Le cholestérol et les triglycérides apportés par l'alimentation sont absorbés au niveau intestinal. A l'intérieur des entérocytes, l'enzyme Microsomal Transfer Protein (MTP) permet la formation des chylomicrons en associant les lipides (triglycérides, cholestérol estérifié et phospholipides) à l'apolipoprotéine B48. Les chylomicrons (CM) sont ensuite sécrétés dans la lymphe avant d'atteindre la circulation sanguine. Sous l'action de la lipoprotéine lipase, les chylomicrons sont épurés en triglycérides (qui seront utilisés par les muscles ou stockés dans

le tissu adipeux) et deviennent des chylomicrons remnants (CM remnant) qui seront captés par le foie via le récepteur LDL-Receptor Related Protein (LRP) (Tso & Balint, 1986; VERGES, 2008).

Au niveau hépatique, les VLDL sont aussi assemblées par une MTP. Ces lipoprotéines riches en triglycérides et présentant une apo B100 peuvent s'enrichir en cholestérol et s'appauvrir en triglycérides sous l'action de la Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) ou subir des hydrolyses successives pour aboutir à la formation d'IDL et de LDL.

Le transport du cholestérol

Les LDL sont le produit final de la voie métabolique « VLDL-IDL-LDL » et constituent la forme préférentielle de transport du cholestérol dans l'organisme. Elles sont captées par les hépatocytes et les autres types cellulaires via le récepteur aux LDL (LDLR) (Joseph L. Goldstein & Brown, 2009).

Le transport inverse du cholestérol

L'efflux de cholestérol libre par les cellules fait intervenir la lipoprotéine HDL. Les HDL produites et sécrétées par le foie sont nommées "HDL natives" (HDL n), elles sont discoïdales et constituées de phospholipides et d'apo A1. Les HDL récupèrent le cholestérol des cellules via les transporteurs ATP-Binding Cassette A1 (ABCA1). Les HDL grossissent dans la circulation en chargeant leur cœur hydrophobe en cholestérol qui est progressivement estérifié par la Lecithin Cholesterol Acyl Transferase (LCAT). Ainsi, elles forment des HDL3 puis des HDL2. Ces lipoprotéines sont captées au niveau du foie par le récepteur Scavenger Receptor class B type 1 (SRB-1) c'est le "transport inverse du cholestérol" (présenté en vert sur la **Figure 14**) (Fielding & Fielding, 1995).

La **Figure 14** résume le métabolisme des lipoprotéines.

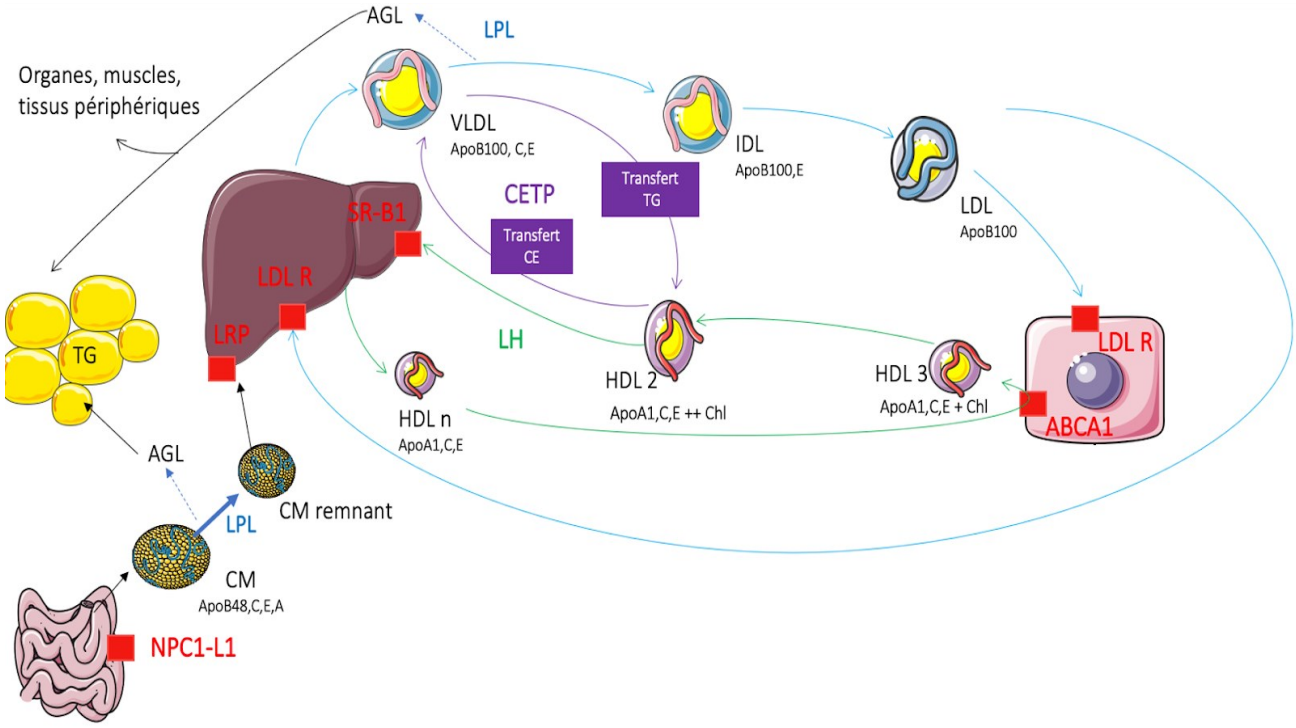


Figure 14 : Le métabolisme des lipoprotéines adapté de Vergès 2007 AGL Acide Gras Libre, CM Chylomicrons, HDL High Density Lipoprotein, IDL Intermediate Density Lipoprotein,LDL Low Density Lipoprotein, VLDL Very Low Density Lipoprotein, TG triglycerides, CETP Cholesterol Transfert Protein, LH Lipase Hépatique, LPL Lipoprotéine Lipase, ABCA1 ATP Binding Cassette A1, LDL R Récepteur aux LDL, NPC1-L1 Nieman Pick disease C1 Like 1, SR-B1 Scavenger Receptor Class B type 1

5.2.4. Les lipoprotéines dites “pro-athérogènes”

Les LDL, sont les lipoprotéines à apoB100 majoritairement retrouvées dans la circulation sanguine, elles sont impliquées dans le processus d’athérosclérose. Lorsque leur captation n’est pas effectuée correctement (par exemple : déficience du LDLR, cause de l’hypercholestérolémie familiale), les LDL, riches en esters de cholestérol, peuvent s’accumuler au niveau de l’espace sous-endothélial des artères et former une plaque d’athérome. Des études mendéliennes ont montré une corrélation positive entre les taux de LDL circulants et le risque d'événement cardiovasculaire (Ference et al., 2017; Joseph L. Goldstein & Brown, 1977). Une autre lipoprotéine, la Lp(a), joue aussi un rôle dans la survenue des maladies cardiovasculaires (Tsimikas, 2017).

Bien que le métabolisme des lipoprotéines soit un facteur impliqué dans la survenue de l’athérosclérose, il existe un certain nombre de facteurs de risques induisant son aggravation.

5.3. De la perturbation métabolique à l'athérosclérose

5.3.1. Les perturbations métaboliques : un ensemble de paramètres pro-athérogènes

Selon l'étude INTERHEART menée dans 52 pays, il existe des facteurs de risques favorisant la progression de l'athérosclérose et l'apparition des maladies cardiovasculaires : tabagisme, dyslipidémie, hypertension, diabète, obésité viscérale, sédentarité (Yusuf et al., 2011).

Parmi les facteurs de risques cités, nombre d'entre eux sont associés à des perturbations du métabolisme et engendrent un stress oxydant (production de radicaux libres) et une réponse pro-inflammatoire (sécrétion de cytokines, activation de voies de signalisation favorisant la mort cellulaire) exacerbée.

L'obésité viscérale et le diabète

Il existe un lien entre l'obésité viscérale et l'installation de l'insulinorésistance associée au diabète de type 2. Ces deux pathologies (obésité viscérale et hyperglycémie chronique) contribuent à l'aggravation du processus d'athérosclérose (Azul et al., 2020; Grattagliano et al., 2008).

Dans un contexte d'alimentation peu équilibrée et de sédentarité, une hyperplasie et une hypertrophie sont observables au niveau du tissu adipeux (notamment le tissu adipeux viscéral) (de Ferranti & Mozaffarian, 2008). L'apport excessif d'énergie par l'alimentation entraîne un fonctionnement excessif du métabolisme mitochondrial entraînant une surproduction de radicaux libres (ROS) majoritairement à l'origine du phénomène de stress oxydant. A ce phénomène s'ajoute aussi la production massive d'enzymes pro-oxydantes (Nox) (Bahceci et al., 2007). Le stress oxydant induit une réponse pro-inflammatoire cellulaire et stimule l'activation de voies de signalisation cellulaires comme la voie NF-κB à l'origine de la sécrétion de cytokines comme l'IL-6 (Hofmann et al., 1999). L'insulinorésistance et le diabète de type 2 conduisent à leur tour à la formation de radicaux libres (par les voies de glycation et de formation des produits avancés de glycation) par l'expression de gènes pro-inflammatoires.

Les dyslipidémies

L'accumulation progressive des lipoprotéines au niveau de l'intima des artères est le phénomène central du processus d'athérosclérose. En effet, le contenu en lipides de la plaque

d'athérome est réparti de la manière suivante : 52 % d'esters de cholestérol, 25 % de cholestérol sous forme libre, 14 % de phospholipides et 9 % de triglycérides (Felton C. V. et al., 1997).

Des concentrations plasmatiques élevées en cholestérol transporté par les LDL (LDL-c) sont fortement corrélées à un risque de développement de l'athérosclérose. Les dyslipidémies regroupent un ensemble de pathologies associées à des taux anormaux de lipides et lipoprotéines circulants. Selon le guide des recommandations de la Société Européenne de Cardiologie (ESC), des taux élevés de LDL et triglycérides et des taux réduits de HDL-c augmentent le risque d'athérosclérose et de maladies cardiovasculaires. Par ailleurs, la prévention de l'apparition de l'athérosclérose implique en premier lieu l'amélioration de l'hygiène de vie (alimentation équilibrée, pratique d'activité physique) ou l'utilisation de traitements médicamenteux hypolipémiants (statines, fibrates, inhibiteurs de PCSK9) afin d'améliorer le profil lipidique (Baigent et al., 2019).

Une étude menée en 2014 a montré l'intérêt d'utiliser des stratégies médicamenteuses visant à diminuer les taux de LDL (statines ou inhibiteurs de PCSK9) avant la survenue d'un événement cardiovasculaire. Cette stratégie visant à contrôler spécifiquement les dyslipidémies avait ralenti les dépôts lipidiques et avait aussi permis de faire régresser des plaques d'athérome avancées (Robinson & Gidding, 2014).

Il est important de retenir que les facteurs de risques d'apparition de l'athérosclérose sont à la fois des facteurs initiateurs et aggravants de la pathologie. Par exemple, l'obésité viscérale, le diabète et les dyslipidémies (hypercholestérolémies) peuvent jouer un rôle dans les différentes étapes de formation de la plaque d'athérome (formation de la strie lipidique par exemple).

L'initiation et la progression de l'athérosclérose est favorisée par deux phénomènes que sont le stress oxydant et la réaction pro-inflammatoire.

5.3.2. Les facteurs d'initiation et d'aggravation de l'athérosclérose à l'échelle cellulaire

5.3.2.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre la production de radicaux libres (espèces réactives à l'oxygène : ROS et espèces réactives à l'azote : RNS) et leur neutralisation par les défenses antioxydantes (Bonomini et al., 2008; Sies, 1997).

Les impacts du stress oxydant sur les cellules

Le stress oxydant endogène provient de trois grands facteurs que sont la libération de radicaux libres, l'activation de l'oxygène et la production/propagation des ROS (Crawford & Davies, 1994; Rahal et al., 2014; Sies, 1997). Un excès de radicaux libres (quelle que soit leur origine) peut conduire à des oxydations non spécifiques et irréversibles de molécules biologiques conduisant à des pertes de fonctions (Burton & Jauniaux, 2011).

Il existe un certain nombre de mécanismes développés par les cellules pour lutter contre le stress oxydant. Ces mécanismes de protection font majoritairement intervenir des enzymes. Il existe cependant des antioxydants pouvant être apportés par l'alimentation (comme les vitamines ou les polyphénols). Le **Tableau 8** présente les sources de production de radicaux libres de la cellule et les espèces antioxydantes impliquées dans l'équilibre réducteur/oxydant (redox).

Tableau 8 : Sources de production de radicaux libres et mécanismes antioxydants

Espèces pro-oxydantes		**Références**	**Espèces antioxydantes**		**Références**
Composé	**Mécanisme**	(Aon et al., 2012; Nguyen et al., 2015; Rahangdale et al., 2009; Singh & Jialal, 2006)	**Composé**	**Mécanisme**	(Vincent et al., 2007)
Chaine respiratoire mitochondriale	Production de l'ion superoxyde par les complexes I et III et production d'H_2O_2		Superoxydes dismutases (SOD) (cytosolic Cu/Zn SOD, mitochondrial MnSOD,extracellular EC SOD)	Conversion de l'ion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	
			Catalase	Réduction de l'H_2O_2 et le radical hydroxyle en H_2O, Neutralisation des lipides oxydés	
NADPH oxydases (Nox 2, Nox 4)	Production directe de H_2O_2 et d'$O_2^{\circ-}$		Paraoxonase-1 (PON-1)	Limitation de la peroxydation des lipides	
			Gluthation péroxydase (GPx)	Réduction du radical hydroxyle (°OH) en H_2O	
eNOS non couplée et iNOS	Production préférentielle de l'ion superoxyde au détriment du NO et de la L-citrulline lorsque de BH4 devient limitant		Antioxydants apportés par l'alimentation (vitamines A, E, C, Polyphénols)	Réduction et neutralisation directe des radicaux libres et/ou intervention sur les voies de signalisation	
Lipoxygénase / cyclooxygénase	Favorise la production de l'ion superoxyde	(Martín-Ventura et al., 2017)	Hème péroxydase	Conversion de H_2O_2 en H_2O	(Bandyopadhyay et al., 1999)
Myélopéroxydase	Production d'HOCl à partir du H_2O_2	(Vogiatzi et al., 2008)			

Impacts du stress oxydant sur les lipoprotéines

Les modifications des lipoprotéines de basse densité (LDL) par des molécules pro-oxydantes est considérée comme un facteur pro-athérogène. Ces modifications sont associées à des changements de structure, de vitesse de migration en l'électrophorèse ou de conformation de l'apoB (modification/altération) favorisant une captation non régulée des LDL oxydées (Esterbauer et al., 1992).

Il existe différents mécanismes aboutissant à l'oxydation des LDL :

- Les interactions avec des ions métalliques (fer, cuivre) (Morgan, 1995)
- Les interactions avec les enzymes comme la lipoxygénase (qui permet l'oxydation en milieu extracellulaire), la myéloperoxidase MPO (qui est produite par les leucocytes) (Carr Anitra C. et al., 2000; Harats Dror et al., 2000)
- Les interactions avec les radicaux libres (ROS, RNS ion peroxynitrite issu de l'oxydation du monoxyde d'azote par l'anion superoxyde) (Jessup et al., 1992)

Les LDL oxydées (oxLDL) sont caractérisées selon leur degré d'oxydation.

- Les « minimally modified LDL » (MMLDL) qui contiennent entre 3 et 12 nmol de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) / mg apoB. Elles ont une faible affinité avec les récepteurs scavenger des macrophages mais peuvent être toutefois être recyclées et détectées dans la circulation sanguine. Ces « minimally modified LDL » stimulent la production de molécules d'adhésion et de chimiokines.
- Les « extensively oxidized LDL » qui contiennent plus de 30 nmol de TBARS / mg d'apoB ne sont pas reconnues par le récepteur aux LDL et sont pris en charge par les macrophages via les récepteurs scavengers. Ces Extensively oxidized LDL sont à l'origine de la formation des cellules spumeuses (Levitan et al., 2010; H. Yoshida & Kisugi, 2010a).

5.3.2.2. Les marqueurs de l'état pro-inflammatoire

Dans notre cas, l'état dit "pro-inflammatoire" définit l'ensemble des marqueurs concourants à la signalisation d'un stress à l'échelle cellulaire, le déclenchement d'une réaction immunitaire et l'activation de facteurs favorisant la mort cellulaire (apoptose/nécrose). De manière plus globale, l'état pro-inflammatoire peut être défini comme une réaction de la cellule en réponse à un stress direct (stimulation de récepteurs comme le récepteur au TNF, conditions environnementales) ou sous l'influence d'autres cellules exposées à un stress.

Différents marqueurs de l'état pro-inflammatoire sont observables dans le contexte d'athérosclérose.

Les ***molécules d'adhésion*** sont des marqueurs d'activation cellulaire associée à l'athérosclérose. Une étude menée sur des patients (n=55) présentant des plaques d'athérome au niveau de la carotide et sur 23 sujets sains a mis en évidence une corrélation entre la présence d'ICAM-1 (r=0,36, p= 0,001) et VCAM-1 (r=0,34, p=0,002) et l'épaississement de l'intima au niveau de la carotide (Varona et al., 2019).

Les ***sélectines*** ont, elles aussi, été associées au risque cardiovasculaire. C'est le cas des P-sélectines qui ont fait l'objet de l'étude MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). Cette étude a été menée sur 1628 africains, 702 chinois, 2393 américains non-hispaniques et 1302 hispano-américains n'ayant pas eu d'évènement cardiovasculaire. Les résultats de l'étude ont suggéré que les P-sélectines sont un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires et sont associées aux stades avancés d'athérosclérose (calcifications au niveau des coronaires) (Bielinski et al., 2015).

Les ***chimiokines*** comme (Monocyte-Chemoattractant Protein 1) MCP-1 ont aussi été décrites comme des facteurs critiques de l'initiation et de la progression de l'athérosclérose. MCP-1 connue aussi sous le nom de CCL2 est sécrétée par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Son rôle est de favoriser le recrutement des monocytes et des macrophages au niveau de la région sous-endothéliale (Harrington, 2000).

En 1991, une expérience d'hybridation *in situ* menée sur des carotides humaines issues d'endartériectomies (n=14) a mis en évidence la présence d'ARNm de MCP-1 au niveau des lésions athéromateuses. Selon les analyses, 33% des cellules présentes à un stade avancé d'athérosclérose (thrombus) exprimaient l'ARNm de MCP-1 et 24 % de ces ARNm étaient présents à un stade intermédiaire (cœur nécrotico-lipidique) (Nelken et al., 1991)

Les ***cytokines*** sont des biomarqueurs de l'état inflammatoire qui ont un impact sur l'initiation et la progression de l'athérosclérose (Fatkhullina et al., 2016). Ces éléments sont sécrétés par différents types cellulaires que sont les cellules endothéliales, les monocytes, les macrophages ou encore les cellules musculaires lisses.

Les travaux sur la cohorte STANISLAS, regroupant 179 familles de sujets sains, ont montré qu'il existait un lien entre les concentrations en cytokines IL-6 et TNF-α et les facteurs de risque d'apparition de l'athérosclérose (ICAM-1 et sélectines). L'étude de cette cohorte a aussi démontré que les taux d'IL-6 étaient inversement corrélés aux taux d'apoA1 et d'HDL-c chez les femmes (Haddy, 2003).

Des modèles cellulaires et murins ont aussi montré que le TNF-α contribuait à la formation des lésions athéromateuses et favorisait l'infiltration des LDL en augmentant la perméabilité de l'endothélium (Brånén et al., 2004; Y. Zhang et al., 2014).

L'activation de la voie NF-κB

Le « Nuclear Factor kappa B » est une famille de facteurs de transcription impliquée dans la modulation des réactions immunitaires innées et/ou adaptatives (Sen & Baltimore, 1986). L'activation de ces facteurs de transcription induit l'expression de gènes "pro-inflammatoires" impliqués dans la production de cytokines, chémokines, de facteurs anti-apoptotiques, ou encore de molécules d'adhésion. Chez certains types cellulaires comme les cellules dendritiques, lymphocytes T et macrophages, l'activation de NF-κB conduit à des phénomènes de maturation, d'activation et de différenciation (T. Liu et al., 2017).

L'activation de NF-κB peut être induite par différents facteurs tels que les antigènes, les lipopolysaccharides, les cytokines pro-inflammatoires (TNF-α , IL-1) ou encore les espèces intermédiaires réactives de l'oxygène (ROI) (Oeckinghaus & Ghosh, 2009).

L'implication de l'activation de NF-κB dans le contexte d'athérosclérose a été montré dans les années 1990 sur modèle murin. Dans son étude, l'équipe de Liao *et al*., a soumis deux groupes de souris à un régime athérogène (15,75% graisses, 1,25% cholestérol, 0,5% sodium cholate). Le premier groupe (n=6) était constitué de souris C57BL/6 susceptibles de former des stries lipidiques en suivant le régime. Le second groupe était formé de souris C3H/HeJ (n=6) résistantes à la formation de stries lipidiques. Les résultats ont montré que les souris C57BL/6 présentaient une activation de NF-κB contrairement aux souris C3H/HeJ. L'absence d'activation de ces facteurs de transcription a été décrite comme une explication à la résistance des souris C3H/HeJ à l'initiation de l'athérosclérose (F. Liao & Andalibi, 1993).

Une étude récemment menée sur des artères coronaires (n=22) et des carotides (n=32) humaines issues d'une cohorte de patients morts d'un infarctus du myocarde, a mis en évidence l'activation de la voie NF-κB et la présence de cellules immunitaires dans les plaques d'athérosclérose avancée. L'analyse immunohistologique des artères coronaires a montré que sur des sténoses supérieures à 40 %, les patients atteints d'une maladie inflammatoire chronique (arthrite rhumatoïde, arthrite psoriasique, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) présentaient des niveaux significativement plus élevés du marqueur d'activation de NF-κB (NIK : NF-κB Inducing Kinase). Il a aussi été montré que ces patients présentant des sténoses avancées (>40%) présentaient des populations de cellules immunitaires (leucocytes, macrophages, mastocytes) supérieures à celles des patients ne présentant pas de maladie inflammatoire chronique. L'analyse des carotides a montré que les plaques d'athéromes instables surexprimaient les gènes des marqueurs de l'activation de la voie NF-κB tels que NIK, TRAF2 et IKKα (Maracle et al., 2018).

Le lipopolysaccharide (LPS) : un facteur pro-athérogène exacerbant la réaction pro-inflammatoire

Le phénomène d'endotoxémie est associé à la circulation massive de lipopolysaccharides (LPS) dans le sang. Ces endotoxines sont issues des parois des bactéries Gram négatives composant notamment le microbiote intestinal (Beutler & Rietschel, 2003; Hurwitz et al., 1975). Elles sont connues pour leur effet pro-inflammatoire via l'activation de la voie de signalisation des Toll Like Receptor 4 (TLR 4) et sont impliquées dans les complications métaboliques (P. D. Cani et al., 2008; Horseman et al., 2017; Luche et al., 2013).

Une étude menée sur le modèle de souris apoE -/- soumis à un régime riche en graisses et à des injections de LPS à faible dose (5 ng/kg) pendant 8 semaines a montré que le LPS était un facteur aggravant de l'athérosclérose. Les souris ayant reçu l'injection de LPS présentaient des dépôts de lipides et un cœur nécrotico-lipidique significativement plus étendus (+ 40 % de surface de dépôts lipidiques et + 10 % de surface pour le cœur nécrotique). De plus, l'injection de LPS a eu pour effet d'augmenter significativement les teneurs en cholestérol (libre et total) au niveau des dépôts, et les teneurs en cytokines (TNF-α, IL-6, IL-10 et MCP-1)(Geng et al., 2016).

En 2018, l'équipe du Docteur Violi a mis en évidence la présence de LPS provenant de la bactérie intestinale *Escherichia coli* au niveau de plaques d'athérome humaines. Pour cette

étude regroupant 15 sujets sains et 10 patients présentant une sténose de la carotide à plus de 70 %, des concentrations plus élevées en LPS sériques ont été détectées chez les patients que chez les sujets sains (79,0 ± 10,7 contre 43,5 ± 11,9 pg/ml). Aussi, le LPS d'*Escherichia coli* a été détecté au niveau des plaques d'athérome des patients. L'analyse des effets du LPS a aussi été effectuée sur un modèle *in vitro* de monocytes issus de sujets sains ou de patients présentant une sténose. Les résultats ont montré que pour les monocytes issus de sujets sains ou de patients, la présence de LPS à des concentrations allant de 20 à 80 pg/mL augmentait significativement l'oxydation des lipides (hydroperoxydes et diènes conjugués) (Roberto Carnevale et al., 2018).

5.4. Les différents stades de l'athérosclérose

5.4.1. Les lésions

En conditions basales, le flux sanguin se déplace de façon laminaire (parallèle au sens des artères) dans le système circulatoire. Dans les zones de bifurcation, il existe cependant un phénomène nommé « shear stress » (force de cisaillement) qui perturbe le déplacement du flux sanguin en engendrant des zones où la pression et la vitesse du flux sont modifiées (pression plus élevée et flux sanguin réduit et oscillant). On définit l'« endothelial shear stress » (ESS) comme une force tangentielle issue des réactions de frictions entre le flux sanguin et la surface des cellules endothéliales constituant l'artère. L'ESS est dépendant de la viscosité du sang et de la vitesse du flux sanguin. Plus l'ESS est bas, plus il est athérogène (Cecchi et al., 2011). Il est connu pour favoriser l'initiation de l'athérosclérose. Il peut contribuer aux différentes étapes de l'athérogénèse via la désorganisation des cellules endothéliales, l'expression de gènes favorisant le stress oxydant et l'inflammation, ou encore l'augmentation de l'accumulation et de la perméabilité de l'intima aux particules de LDL mais aussi via le remodelage vasculaire (Chatzizisis et al., 2007).

L'ESS participe à la dysfonction de l'endothélium en modifiant ses propriétés structurelles. Les cellules endothéliales des régions tubulaires des artères sont soumises à un flux laminaire uniforme, elles se caractérisent par une forme ellipsoïdale et une structure alignée dans le sens de circulation. En revanche, les cellules se trouvant au niveau des bifurcations du système circulatoire, soumises à un flux modifié, sont de forme polygonale sans orientation spécifique (Reidy & Bowyer, 1977). Ces cellules subissent des forces de cisaillement plus fortes qui favorisent une augmentation de la perméabilité aux LDL. Ces régions deviennent alors des zones préférentielles de formation de lésions artérielles (Lusis, 2000).

L'initiation du recrutement de cellules immunitaires

Dès les premiers stades de l'athérosclérose, les monocytes (précurseurs des macrophages) migrent au niveau des lésions artérielles sous l'influence des cytokines et de chimiokines sécrétées par l'endothélium activé (Moore et al., 2018; Reape & Groot, 1999). L'activation de l'endothélium est non seulement due aux conditions environnementales dont fait partie l'ESS mais aussi à la présence de cytokines ou de vésicules extracellulaires circulantes favorisant le stress oxydant et la sécrétion de molécules d'adhésion (Chatzizisis et al., 2007; Gaceb et al., 2014).

Une étude menée en 1993 sur une population française (n= 3 779 hommes de 29 à 52 ans) a montré qu'un nombre de monocytes élevé semblait être un facteur prédisposant au développement d'une maladie coronarienne (Olivares et al., 1993).

Il a été décrit que les premières lésions au niveau des artères sont présentes dès l'enfance. Il a même été observé que des lésions présentant des dépôts lipidiques étaient observables chez des fœtus dont les mères étaient hypercholestérolémiques (Palinski & Napoli, 1999).

5.4.2. Les stries graisseuses

L'accumulation et l'oxydation de lipoprotéines de faible densité

L'augmentation de la perméabilité de l'endothélium au niveau des lésions y favorise l'accumulation de LDL formant ce que l'on nomme « strie graisseuse » ou encore « strie lipidique ». Il en résulte alors une hyperplasie de l'intima (« diffuse intimal thickening ») (Joseph L. Goldstein & Brown, 1977; Virchow, 1860).

La rétention extracellulaire des lipoprotéines au niveau de l'épaississement de l'intima via des interactions entre leurs apolipoprotéines et les protéoglycanes a été mise en évidence dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Bondjers & Camejo', 1990; Yutaka Nakashima et al., 2007).

Par ailleurs, ces LDL oxydées ont été décrites comme des facteurs aggravant le phénomène de stress oxydant (notamment en diminuant l'expression d'eNOS) et augmentant la sécrétion de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1), chimiokines (MCP-1) et cytokines pro-

inflammatoires (IL-6) par les cellules endothéliales (Ait-Oufella et al., 2011; Y. Nakashima et al., 1998).

Le recrutement massif de cellules immunitaires et le phénomène de diapédèse

La présence de LDL oxydées au niveau de l'espace sous-endothélial contribue à l'exacerbation du stress oxydant et favorise davantage la production de cytokines et de molécules d'adhésion par l'endothélium et les cellules immunitaires déjà présentes au niveau de la strie lipidique.

L'étude menée par Masuda et Ross a montré chez les primates non humains (*Macaca nemestrina*) que les stries lipidiques présentaient un nombre important de cellules spumeuses contenant des lipides (macrophages ayant internalisé les LDL oxydées), de matrice extracellulaire et de cellules musculaires lisses. Aussi, leurs analyses histologiques des lésions aortiques ont permis l'observation de la structure des stries lipidiques mais aussi celle du phénomène de migration des cellules immunitaires à travers les jonctions serrées de l'endothélium (Masuda J & Ross R, 1990). Le phénomène d'infiltration des leucocytes est observable en **Figure 15** .

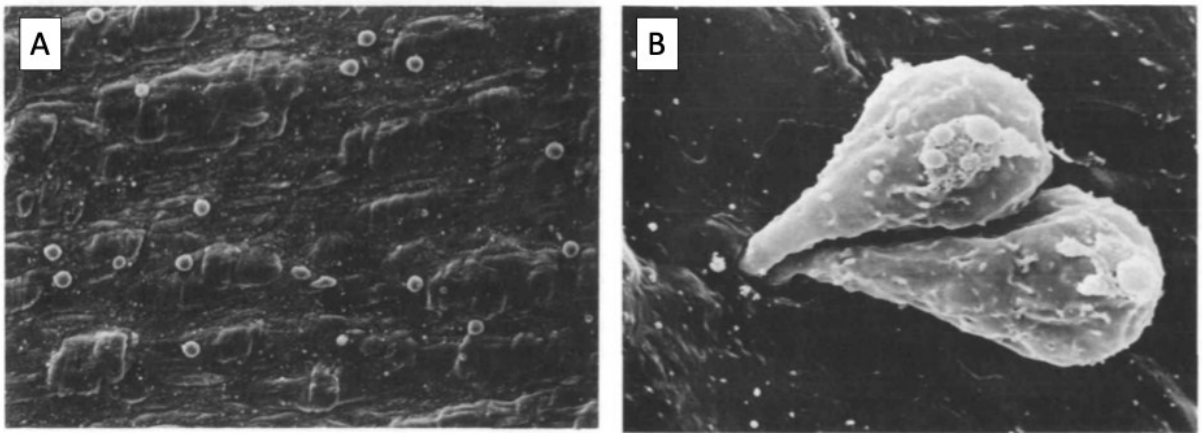


Figure 15 : Observations par microscopie électronique de l'adhésion leucocytaire au niveau des stries lipidiques de l'aorte thoracique de macaques ayant consommé un régime riche en cholestérol sur une durée de 6 mois. (A) Les irrégularités observées sont les stries lipidiques et les formes arrondies sont les leucocytess. (X 260) ; (B) Démonstration de l'entrée des leucocytes au travers des jonctions serrées de l'endothélium (X 4000) Source : Masuda ; 1990

Ce phénomène de diapédèse des leucocytes et des monocytes est favorisé par la production de molécules d'adhésion, ICAM-1, VCAM-1 et des sélectines par les cellules endothéliales (Y. Nakashima et al., 1998; Quehenberger, 2005). Une fois que les monocytes ont rejoint l'intima,

ils se différencient en en macrophages (majoritairement) selon les conditions micro-environnementales (présence de cytokines ou facteurs favorisant la formation de colonies MG-CSF) (Bobryshev, 2006).

Selon la nature des glycoprotéines exprimées au niveau de leurs membranes et les conditions environnementales (présence ou non de cytokines, facteurs de croissance ou molécules pro-oxydantes), les monocytes peuvent engendrer différents types de macrophages qui peuvent aussi bien aggraver l'athérosclérose que le faire régresser. Certains phénotypes de monocytes sont associés aux macrophages (dits de type "M1") dont les actions (sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α, formation de cellules spumeuses, nécrose) favorisant l'athérosclérose. D'autres sont associés à des macrophages (dits de type "M2") dont les actions favorisent la régression de l'athérosclérose (sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10; transport inverse du cholestérol) (Cappellari et al., 2017; Chistiakov et al., 2015).

La formation de cellules spumeuses

Dans les conditions d'homéostasie, en présence de LDL non oxydées, la captation des LDL par les cellules se fait principalement par le récepteur au LDL (LDLR). L'efflux du cholestérol (pour effectuer le transport inverse du cholestérol) est possible grâce aux transporteurs ABCA1, ABCG1 et SR-B1 (Aiello et al., 2002; M. Brown & Goldstein, 1986).

La captation des LDL modifiées par les macrophages (par des processus de pinocytose et phagocytose) se fait majoritairement par le biais de récepteurs « scavengers » et minoritairement par le récepteur aux LDL dans le cas où les LDL sont très peu oxydées. Le scavenger receptor A-1 (SRA-1), Cluster de différenciation 36 (CD36), (LOX1) (spécifique aux LDL oxydées) et (LRP1) sont des exemples de récepteurs scavengers. Contrairement à ce qui est observé au niveau du récepteur aux LDL, la captation de LDL oxydées par les récepteurs scavengers n'est pas régulée (Ben et al., 2015; M. Brown & Goldstein, 1986; J. L. Goldstein et al., 1979). Les endosomes, lysosomes et la lipase lysosomale peuvent transformer les esters de cholestérol contenus dans les LDL en cholestérol sous forme libre et en acides gras. Le cholestérol peut aussi être à nouveau estérifié et stocké dans le cytoplasme sous forme de gouttelettes lipidiques (M S Brown & Goldstein, 1983; Tangirala et al., 1993).

Cependant, les LDL oxydées ne sont que partiellement dégradées par les lysosomes et s'y accumulent (Hoppe et al., 1994; Li Wei et al., 1998; X. Xu et al., 2016). Ce phénomène réduit

la possibilité d'effectuer la "clairance de la plaque" des lipides par transport inverse du cholestérol. En effet, dans le contexte d'athérosclérose, il existe un déséquilibre entre l'expression des récepteurs scavengers (augmentée) et celle des transporteurs tels que ABCA1, et ABCG1 permettant la libération du cholestérol (diminuée) : l'accumulation de cholestérol issu des LDL oxydées est alors favorisée, le macrophage est alors défini comme une « cellule spumeuse » (présenté en **Figure 16**) (Michael S. Brown et al., 1980; Chistiakov et al., 2017a).

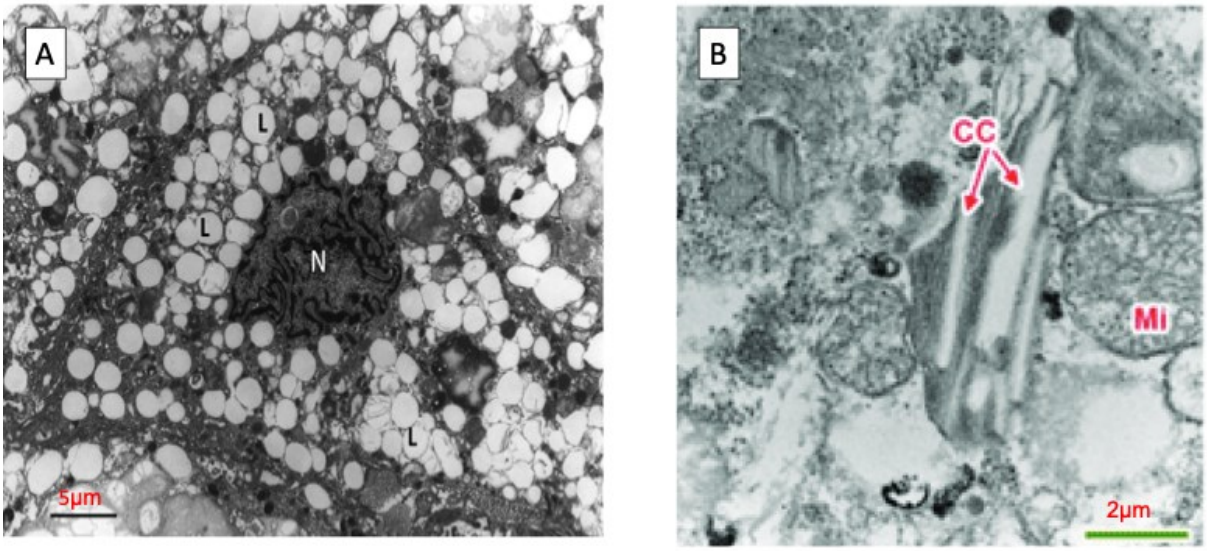


Figure 16 : Observation par microscopie électronique du cytoplasme d'une cellule spumeuse (foam cell) située au niveau d'une plaque d'athérome aortique (A). N : noyau ; L : gouttelette lipidique. Les cellules spumeuses contiennent de nombreuses gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme. (Chistiakov et al., 2016) (B) Observation d'une cellule spumeuse au niveau d'une plaque d'athérome de souris LDLR-/- après deux semaines de régime riche en graisses. CC : cristaux de cholestérol ; Mi : mitochondrie. Il est possible d'observer la présence de cristaux de cholestérol au niveau du cytoplasme des cellules spumeuses. Source : Baumer et al., 2019

La différenciation des macrophages

Sous l'effet du stress oxydant, des cytokines présentes dans leur environnement et l'exacerbation du métabolisme liée à la captation excessive des LDL, les macrophages effectuent un changement de phénotype (modification de l'expression des récepteurs, changement du type de cytokines sécrétées). L'activation des macrophages au niveau de la strie graisseuse va avoir pour conséquences de favoriser :

- La production de radicaux libres (stress oxydant)
- La sécrétion de cytokines comme IL-1, IL-6, IL-1β et TNF-α par les macrophages (Rosenfeld, 1996; Shapouri-Moghaddam et al., 2018).
- L'activation de la voie de signalisation cellulaire NF-κB et les phénomènes de mort cellulaire (apoptose/nécrose secondaire).

Cœur nécrotique et formation de la chape fibreuse

Au-delà de l'exacerbation de la réponse pro-inflammatoire, l'accumulation excessive de lipides oxydés dans les cellules spumeuses conduit à leur destruction via des mécanismes de nécrose et d'apoptose (Björkerud & Björkerud, 1996; Takahashi et al., 2002). Le déversement du contenu cellulaire et des débris issus des cellules spumeuses va constituer le cœur nécrotique (Tabas, 2005). En réponse à la présence de débris cellulaires, l'accentuation de la sécrétion de cytokines et du stress oxydant, les macrophages et les cellules musculaires lisses ayant migré au niveau de l'intima (en passant d'un phénotype contractile à sécrétoire) produisent massivement du collagène, de l'élastine et de la matrice extracellulaire pour constituer la chape fibreuse entourant le cœur nécrotique (Bennett et al., 2016).

Une étude suédoise s'est intéressée à la présence d'espèces réactives à l'oxygène ROS au niveau des aortes présentant des lésions athéromateuses. Leur découverte a été la suivante : les crosses aortiques de souris présentant un stade avancé d'athérosclérose présentaient des concentrations en ROS plus élevées. Les ROS intracellulaires (produits par les macrophages) étaient près de deux fois plus élevés que les teneurs en ROS extracellulaires (produits par les cellules musculaires lisses) (Ekstrand et al., 2015).

Les macrophages et les cellules musculaires lisses sont impliqués dans l'agrandissement du cœur nécrotique et la formation de la chape fibreuse. L'autophagie est un processus catalytique cellulaire qui permet de dégrader les protéines et les organelles *via* les lysosomes. Elle est stimulée par la présence de cytokines, du stress oxydant (ROS et lipides oxydés) et des facteurs de croissance et joue un rôle protecteur dans le contexte d'athérosclérose. Cela se fait notamment en améliorant la dégradation des esters de cholestérol, en supprimant la transformation des macrophages en cellules spumeuses, en prévenant la mort cellulaire et en modulant le changement phénotypique des cellules musculaires lisses (Grootaert et al., 2018; Ouimet et al., 2011; Vindis, 2015). Il a été montré dans un modèle murin qu'un processus d'autophagie défectueux favorise le stress oxydant, l'apoptose et rend défectueux l'efferocytose par les macrophages (X. Liao et al., 2012). D'autre part, un processus d'autophagie anormal favorise la mort des cellules musculaires lisses et fragilise la chape fibreuse (Moulis & Vindis, 2018; Nahapetyan et al., 2019).

Évolution de la plaque d'athérome

La plaque d'athérome en évoluant entraînera l'obstruction progressive de l'artère. Différents mécanismes seront alors observables au cours de son évolution :

- La calcification de la plaque en réponse à la réaction pro-inflammatoire favorisant la différenciation des cellules musculaires lisses en ostéoblastes (Boström et al., 1995; Shioi & Ikari, 2018).
- Les phénomènes d'hypoxie stimulant la formation de néovaisseaux (provenant des *vasa vasora* de l'adventice) et les phénomènes d'hémorragie intra-plaque (Chistiakov et al., 2017b).
- Les phénomènes de fragilisation de la plaque d'athérome par l'action de protéases comme les métalloprotéinases matricielles (MMP), l'élastase leucocytaire ou encore la plasmine (Galis et al., 1994; Johnson, 2017).
- La rupture de la plaque et l'agrégation plaquettaire permettent la formation d'un thrombus (Lusis, 2000).

Bilan Le processus d'athérosclérose : ce qu'il faut retenir

- L'athérosclérose est favorisée par des facteurs de risque (dyslipidémie, diabète, obésité)
- Le stress oxydant et « l'inflammation » (*ex : sécrétion accrue de TNF-α, activation de la voie NF-κB*) sont des facteurs aggravants de l'athérosclérose
- Le processus d'athérosclérose se décompose en plusieurs étapes allant des premières lésions aux phénomènes de complication de la plaque (néovascularisation, calcification, rupture)

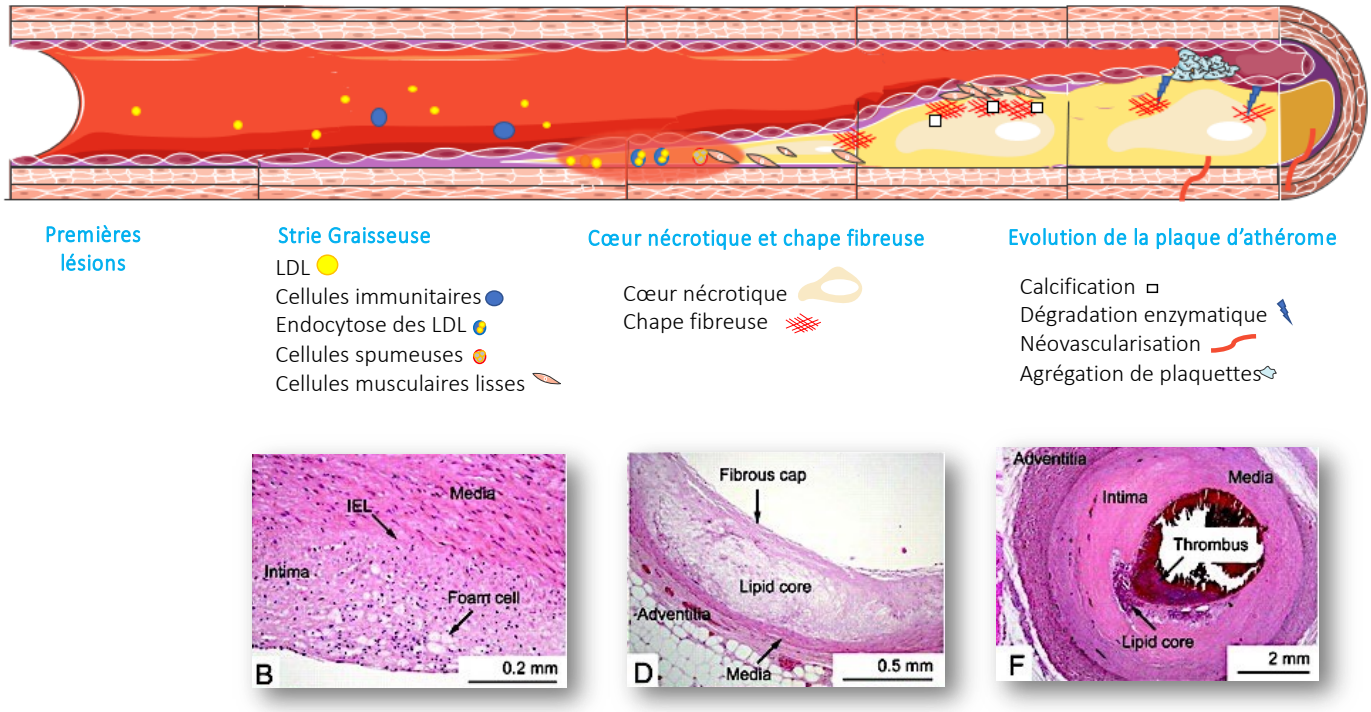


Illustration bilan 5 : Les étapes majeures du processus d'athérosclérose (Images SERVIER complétées et modifiées ; Søren Dalager. Stroke. Artery-Related Differences in Atherosclerosis Expression, Volume: 38, Issue: 10, Pages: 2698-2705, DOI: (10.1161/STROKEAHA.107.486480))

- Au cours du développement de l'athérosclérose, les macrophages jouent différents rôles. Décrits comme facteurs aggravants ou correctifs de la formation de la plaque d'athérome, les macrophages constitueraient un modèle d'étude pertinent dans la recherche de solution (préventive ou curative) au processus d'athérosclérose.

L'effet préventif et/ou curatif de principes actifs de plantes médicinales dans le contexte d'athérosclérose impliquent leur capacité à moduler ou inhiber certains facteurs d'aggravation de l'athérosclérose comme le stress oxydant, la sécrétion de cytokines, la formation de cellules spumeuses ou encore les processus de nécrose.

6. L'intérêt de l'utilisation des plantes médicinales dans le contexte de perturbations métaboliques associées à l'apparition de maladies cardiovasculaires

Il existe actuellement un manque d'informations sur la bioactivité des plantes médicinales de La Réunion. Cette situation est liée d'une part à l'endémicité des espèces (ressources rare, situation géographique éloignée rendant difficile l'acquisition de la matière première pour un laboratoire hors Ile de La Réunion) et au nombre limité d'études menées sur ces plantes (faible rayonnement à l'échelle internationale).

Cependant, la bioactivité de certaines plantes médicinales exotiques et indigènes utilisées dans d'autres régions et à l'Ile de La Réunion font l'objet d'études à l'échelle internationale. C'est le cas notamment du Jamblon (*Syzygium cumini*), du Bois d'Arnette (*Dodonaea viscosa*) et de l'Ayapana (*Ayapana triplinervis).* Dans d'autres cas, des espèces du même genre ont aussi été analysées, par exemple, les espèces du genre *Pelargonium*, ou encore *Hypericum*. Ainsi, différentes publications scientifiques mettent en évidence le potentiel préventif et/ou curatif des plantes médicinales dans le contexte d'athérosclérose.

Cette bioactivité des plantes médicinales peut s'expliquer d'une part via leur impact sur les facteurs de risque de l'athérosclérose (notamment les dyslipidémies) et d'autre part via leur capacité à limiter des phénomènes, qui, à l'échelle cellulaire, engendrent une aggravation de l'athérosclérose.

Des expérimentations *in vivo* sur certaines plantes médicinales consommées à La Réunion ont été réalisées par des laboratoires étrangers. Par exemple, les équipe de Veerapur *et al.,* Zou *et al.,* et Sharma *et al.,* ont montré sur des modèles murins (rats) soumis à un régime riche en graisses que la consommation régulière d'extrait aqueux de Bois d'Arnette (*Dodonaea viscosa*), de Jamblon (*Syzygium cumini*) ou d'extrait éthanolique de millepertuis (*Hypericum perforatum*) permettait d'améliorer le profil lipidique (triglycérides, cholestérol total, LDL et HDL-c) (S. Sharma et al., 2017; Veerapur et al., 2010; Zou et al., 2005).

Différentes études plus avancées, menées chez l'Homme ont mis en évidence les effets d'autres plantes médicinales comme l'Amla (*Emblica officinalis*), le thé vert (*Camellia sinensis*), le

tiwai (*Eleutherine Americana* Merr) sur la modulation du profil lipidique (Saragih et al., 2014; Upadya et al., 2019; Zheng et al., 2011).

A ce jour, la majorité des plantes médicinales utilisées à La Réunion n'ont pas fait l'objet d'étude clinique permettant d'évaluer leur capacité à moduler le profil lipidique de sujets sains ou dyslipidémiques.

A l'échelle cellulaire, les molécules bioactives issues des plantes médicinales (notamment les polyphénols) peuvent exercer des effets sur le stress oxydant, les mécanismes de l'état "pro-inflammatoire" (sécrétion de cytokines, activation de la voie NF-κB, processus d'apoptose/nécrose) et le métabolisme des lipoprotéines par les macrophages.

6.1. Les propriétés antioxydantes

Un excès de radicaux libres intracellulaires contribue au stress oxydant et à la détérioration des protéines, lipides et acides nucléiques (Burton & Jauniaux, 2011; Sies, 1997). La capacité des plantes médicinales à prévenir les phénomènes d'oxydation constitue donc un enjeu majeur dans la prévention et le ralentissement de l'athérosclérose.

6.1.1. La neutralisation des radicaux libres

La capacité antioxydante d'une préparation à base de plante médicinale peut être évaluée via sa capacité à réduire un radical libre.

Un projet mené par un laboratoire réunionnais en 2004 (Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments) a permis d'étudier la capacité antioxydante de 274 préparations (macérâts de feuilles ou de tiges dans du méthanol ou du dichlorométhane) obtenues à partir de 75 plantes (médicinales et non médicinales) de La Réunion. La capacité des extraits de plantes médicinales à réduire un radical libre (DPPH) et à limiter l'oxydation de B-carotène exposé aux ultraviolets a été évaluée. Parmi les extraits de plantes analysés, 73% d'entre eux ont réduit le radical libre DPPH et 32% ont exercé une activité antioxydante. Les extraits (méthanol et dichlorométhane) de feuilles de Change écorce (*Aphloia theiformis*), Bois d'Arnette (*Dodonaea viscosa*), Ambaville (*Hubertia ambavilla*), Fleur Jaune (*Hypericum*

lanceolatum) et de Bois de Pêche Marron (*Psiloxylon mauritianum*) ont exercé une activité antioxydante. Ces plantes médicinales sont traditionnellement utilisées par la population et sont inscrites à la Pharmacopée Française (Poullain et al., 2004).

A l'échelle internationale, les effets antioxydants du Bois d'Arnette (*Dodonaea viscosa*) et sa capacité à réduire les radicaux libres ont été confirmés par des équipes pakistanaises, iraniennes et allemandes (Mothana et al., 2010; Muhammad et al., 2016; Samavati & Manoochehrizade, 2013). D'autres études sur les graines de jamblon (*Syzygium cumini*) et sur l'Ayapana (*Ayapana triplinervis*) préparés sous forme d'extrait méthanolique avaient mis en évidence une capacité à réduire différents radicaux libres (Biswas et al., 2012; Priya et al., 2017).

6.1.2. La prévention de l'oxydation des LDL

L'oxydation des lipides est à l'origine d'un état pro-inflammatoire au niveau des stries lipidiques, favorisant le recrutement des cellules immunitaires et leur différenciation au niveau de l'intima de l'artère (Lusis, 2000; H. Yoshida & Kisugi, 2010b). L'oxydation des LDL fait donc partie des premiers facteurs aggravant le processus d'athérosclérose.

Dans son étude, l'équipe de Dos Santos s'est penchée sur les effets antioxydants que pouvaient exercer des infusions aqueuses de jamblon (*Syzygium cumini*) sur des LDL humaines soumises à un stress oxydant mimé par l'ajout de sulfate de cuivre $CuSO_4$.

Les résultats ont montré que l'oxydation des LDL par le sulfate de cuivre était réduite en présence des extraits aqueux de *S. cumini*. La présence des extraits aqueux de *S. cumini* a eu pour effet de diminuer les teneurs finales en diènes conjugués (produits primaires de l'oxydation des lipides). Ainsi, il a été démontré que les tisanes étudiées réduisaient significativement la vitesse d'oxydation des LDL et ce d'une manière dose-dépendante (dos Santos et al., 2018).

Ce résultat est intéressant dans la mesure où il montre que l'utilisation de l'extrait aqueux de *S. cumini* peut empêcher ou retarder l'initiation d'un enchaînement de réactions menant à la formation de malondialdéhyde. Les principes actifs de ces extraits (acide gallique, acide

chlorogénique, acide caféique, rutine, quercétine et kaempférol) ont été décrits par la littérature pour exercer des propriétés similaires (Dietrich-Muszalska & Olas, 2010).

De plus, le dosage du malondialdéhyde (produit final d'oxydation) après une co-incubation des LDL en présence du sulfate de cuivre et des extraits de *S. cumini* a mis en évidence que : les taux de produits finaux d'oxydation des LDL étaient significativement réduits en présence d'extraits à une concentration supérieure ou égale à 0,5 µg/mL.

Des résultats similaires ont été observés par l'équipe de Gugliucci, mettant en évidence les propriétés protectrices des infusions de l'Achyrocline (*Achyrocline satureoides*) sur des LDL humaines exposées pendant 16 heures à du sulfate de cuivre. Dans cette étude, les auteurs ont aussi montré que les extraits aqueux *d'Achyrocline satureoides* et du yerba mate (*Ilex paraguariensis*) pouvaient réduire le phénomène d'agrégation des LDL qui est observable lorsque ces dernières sont placées en co-incubation avec du sulfate de cuivre (Gugliucci & Menini, 2002).

L'effet protecteur des principes actifs de plantes médicinales sur l'oxydation des lipoprotéines est aussi observable *in vivo* notamment via la quantification des espèces réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS). Fuhrman *et al.,* a démontré que l'administration d'extrait éthanoliques de gingembre (*Zingiber officinale Roscoe*) à des souris dyslipidémiques apoE-/- permettait de réduire significativement la taille des lésions athérosclérotiques (44%). L'analyse histologique des lésions a par ailleurs montré que l'administration de l'extrait de gingembre dans l'eau de boisson avait réduit significativement la peroxydation lipidique (TBARS et peroxydes) et la captation des LDL oxydées par les macrophages (Fuhrman et al., 2000).

6.1.3. La prévention de la lyse de globules rouges

La prévention de la lyse des globules rouges induite par un stress oxydant est un enjeu majeur dans la prévention des perturbations métaboliques et des maladies cardiovasculaires. Au-delà du fait que le stress oxydant impacte directement les fonctions (capacité à fixer de l'oxygène) et la durée de vie des globules rouges, il peut aussi faciliter la propagation d'espèces pro-oxydantes au niveau de l'organisme. Dans le cas de l'athérosclérose, la lyse des globules rouges peut aussi intervenir dans les mécanismes de complication de la plaque d'athérome : aussi bien

au niveau de la formation du thrombus que dans l'accumulation au niveau de la chape fibreuse (fibromathérome) la détérioration des néo-vaisseaux et des sites d'hémorragie intra-plaque (Buttari et al., 2015; Delbosc et al., 2017; Mohanty et al., 2014).

Il a été décrit dans la littérature que des extraits de fruits ou de plantes peuvent avoir un effet protecteur sur des globules rouges soumis à un stress oxydant (Aman et al., 2013; Gangwar et al., 2014; Mariutti et al., 2014; Repon et al., 2013). En effet, cette action antioxydante peut s'expliquer par la présence de polyphénols comme la rutine, la quercétine, le kaempférol et la morine qui ont été décrits pour avoir inhibé (respectivement de 42,5 %, 40,5 %, 35,5 %, 26,9 %) la lyse de globules rouges induite par ajout du radical libre AAPH (Asgary et al., 2005).

Des travaux similaires ont également été effectués par le Laboratoire DéTROI sur 14 standards de polyphénols différents montrant l'effet protecteur de ces molécules sur la lyse des globules rouges (Hatia et al., 2014). D'autres études utilisant des sources de stress oxydant différentes telles que l'H_2O_2, ou encore l'HClO ont confirmé ces résultats (Suwalsky et al., 2015; Tedesco et al., 2000).

Le test de résistance des globules rouges à la lyse induite par un stimulus pro-oxydant est largement utilisé en dehors des études portant sur l'athérosclérose, mais il revêt une importance particulière dans le contexte de cette thèse.

6.1.4. La modulation de l'activité des enzymes impliquées dans la régulation du stress oxydant

En plus de leur capacité à réduire les radicaux libres, les principes actifs de plantes peuvent aussi moduler le stress oxydant en agissant sur des enzymes pro ou antioxydantes. Les effets d'extraits de plantes médicinales sur les enzymes comme la catalase, la superoxyde dismutase, les lipoxygénases ou encore les NADPH oxydases ont été décrits par exemple par différentes équipes de recherche (Chen et al., 2009; Khan, 2013; Lee et al., 2003).

Des expérimentations *in vivo* ont montré que l'administration d'une tisane à base de poudre de jamblon, *Syzygium cumini*, (très couramment consommée par la population réunionnaise) à des souris diabétiques restaurait l'activité des enzymes antioxydantes pancréatiques : la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (A. K. Sharma et al., 2012). Des travaux

effectués sur des rats diabétiques ayant reçu de l'huile essentielle de Géranium rosa, *Pelargonium graveolens* par gavage ont mis en évidence des résultats similaires (Boukhris et al., 2012).

A l'heure actuelle, les études portées sur les plantes médicinales (endémiques et indigènes) de la Réunion et leur capacité à moduler l'activité des enzymes de l'équilibre redox ont majoritairement été effectuées par le Laboratoire DéTROI.

Des travaux menés en 2020 par le Laboratoire ont permis de mettre en évidence la modulation des enzymes impliquées dans la régulation du stress oxydant par des extraits de plantes médicinales de La Réunion. En effet, les extraits de Bois d'osto (*Antirhea borbonica*), Bois d'Arnette (*Dodonaea viscosa*), Faux Benjoin (*Terminalia bentzoe*) et d'Ayapana (*Ayapana triplinervis*) ont non seulement diminué significativement la production de radicaux libres intracellulaires (induite par l'hyperglycémie) par les cellules endothéliales, mais ont aussi eu un impact sur l'expression des marqueurs redox. Les tests qPCR ont montré que la diminution de l'expression des gènes des superoxydes dismutases (Cu/Zn SOD ; MnSOD), de la catalase et de l'hème oxygénase -1 (HO-1) engendrée par l'hyperglycémie était moindre en présence des extraits. De plus, l'analyse menée sur la modulation de l'activité de ces enzymes par les extraits de plantes médicinales a montré que ces derniers stimulaient majoritairement l'activité des superoxydes dismutases. Ces résultats ont suggéré un effet protecteur des extraits de plantes dans des conditions de stress oxydant induit par l'hyperglycémie (Taïlé et al., 2020).

D'autres travaux sur le Bois de Gaulette (*Doratoxylon apetalum*) ont montré que l'extrait hydro-acétonique de cette plante réduisait significativement la production de radicaux libres intracellulaires par des cellules endothéliales humaines (EA.hy926) lorsqu'elles étaient soumises à un stress oxydant induit par l'ajout d'albumine bovine glyquée (Dobi et al., 2019).

6.2. Les propriétés « anti-inflammatoires »

La modulation de l'état « pro-inflammatoire » (caractérisé par l'activation de voies de signalisation cellulaire induisant une sécrétion anormalement élevée de cytokines soulignant la détresse cellulaire et des processus de mort cellulaire) par les plantes médicinales constitue un enjeu majeur dans le contexte de l'athérosclérose.

Une étude a été menée sur le Calea (*Calea urticifolia*), une plante médicinale riche en polyphénols, utilisée en Amérique du Sud pour ses propriétés anti-inflammatoires. L'analyse des effets de l'extrait aqueux de cette plante *in vitro* sur un modèle de macrophages murins RAW 264.7 a mis en évidence une capacité à réduire la production de monoxyde d'azote, la translocation du facteur NF-κB et la sécrétion de cytokines (atteignant un maximum de 88,3 ± 8,2 % pour l'inhibition de la sécrétion d'IL-6) (Torres-Rodríguez et al., 2016).

Les mécanismes d'action d'un traitement de médecine traditionnelle ("Danlou") regroupant différentes plantes médicinales chinoises (*Salvia miltiorrhiza*, *Ligusticum chuanxiong* Hort, *Trichosanthes kirilowii*, *Allium macrostemon* Bung, *Radix Paeoniae Rubra*, *Radix Puerariae*, *Rhizoma alismatis*, *Curcuma aromatic*, *Rhizoma Drynariae*, et *Astragalus membranaceus*) ont fait l'objet d'études *in vivo* et *in vitro*. Le modèle *in vivo* basé sur l'administration de l'extrait de Danlou à des souris dyslipidémiques apoE-/- soumises à un régime riche en graisses a mis en évidence la capacité de l'extrait à réduire l'expression d'ARNm de molécules/cytokines/chémokines associés à l'aggravation de l'athérosclérose (MCP-1, IL-18, IL-33, IL-1B et IL-10). Les travaux menés *in vitro* sur le modèle de macrophages murins RAW 264.7 ont permis la compréhension de ces résultats d'un point de vue mécanistique : Les effets de cet extrait riche en polyphénols (comme la puerarine, daidzéïne, ou l'acide gallique) étaient dus à l'inhibition de la voie NF-κB (Hao et al., 2019).

Le Laboratoire, DéTROI a étudié les effets d'extraits hydroacétoniques de Bois d'Osto (*Antirhea borbonica*), Bois de Gaulette (*Doratoxylon apetalum*) et de la Liane Montbrun (*Gouania mauritiana*) sur des préadipocytes murins 3T3-L1 exposés au TNF-α (5 ng/mL) ou au LPS d'*E. coli* (1µg/mL). Les résultats ont montré que la présence des extraits de plantes réduisait significativement la sécrétion de cytokines IL-6 et MCP-1 et l'expression de NF-κB induites par la présence de ces différents stress (Marimoutou et al., 2015). Ces résultats montrent l'intérêt que peuvent présenter les plantes médicinales utilisées à La Réunion dans la prévention ou le traitement de l'état pro-inflammatoire associé à l'athérosclérose.

6.3. L'impact sur le métabolisme des lipoprotéines des macrophages

Le métabolisme des lipoprotéines par les macrophages est à l'origine de la formation des stries lipidiques, de la présence de cellules spumeuses et de la formation du cœur nécrotico-lipidique. Cependant, un paramètre de ce métabolisme peut avoir des conséquences décisives sur la progression de l'athérosclérose : l'efflux du cholestérol par les macrophages.

L'impact des plantes médicinales sur la formation de stries lipidiques et la régression des plaques d'athérome a été évalué sur des modèles animaux présentant une dyslipidémie induite par un régime alimentaire riche en cholestérol. Par exemple, les études de Asgary *et al.,* et Quiles *et al.,* ont montré les effets de la poudre d'*Amirkabiria odorastissima* et des extraits de *Curcuma longa* sur des modèles de lapin de Nouvelle Zélande soumis à un régime hypercholestérolémiant. Les résultats ont montré que ces préparations de plantes médicinales ont eu pour effet de prévenir la formation des stries lipidiques. D'autres expérimentations sur l'extrait éthanolique d'*Artemisia aucheri* ont mis en évidence sa capacité à diminuer significativement la surface des stries lipidiques (Asgary et al., 2004; Quiles et al., 2002) .

La bioactivité des plantes médicinales sur le métabolisme des lipoprotéines par les macrophages peut s'expliquer par leur capacité à réduire l'apport de cholestérol dans la cellule et/ou l'amélioration de l'efflux de cholestérol par la cellule.

6.3.1. La capacité à moduler la captation des LDL

L'accumulation excessive de LDL oxydées par les macrophages entraîne leur transformation en cellule spumeuse et leur nécrose. L'impact de principes actifs ou d'extraits de plantes sur la captation des LDL par les macrophages a fait l'objet de différentes études.

Par exemple, des monocytes humains isolés et différenciés en macrophages ont été incubés avec des LDL modifiées (acétylées) en présence d'extraits éthanoliques de basilic (*Ocimum basilicum*). Une coloration au O Red Oil a été utilisée pour évaluer l'accumulation de lipides au niveau des cellules. Les résultats obtenus ont montré que la présence d'extraits réduisait significativement l'accumulation de lipides par les macrophages (E. Bravo et al., 2008).

L'impact de la curcumine issue d'une plante médicinale couramment utilisée en médecine traditionnelle à La Réunion (le *Curcuma longa*), a été évalué par différentes équipes de recherche. Il a été observé que ce composé réduisait significativement la taille des lésions athéromateuses des modèles *in vivo*, favorisait l'efflux de cholestérol par les macrophages et diminuait la transformation des macrophages en cellules spumeuses (X. Lin et al., 2015; Momtazi-Borojeni et al., 2019; Nimgulkar et al., 2015; J.-F. Zhao et al., 2012).

6.3.2. L'efflux de cholestérol

L'efflux de cholestérol est rendu possible par la présence de transporteurs du cholestérol (ABCA1, ABCG1) et la présence de HDL en nombre suffisant pour permettre le retour du cholestérol au niveau hépatique.

Il a été montré que l'administration de statines par période était associée à une régression de la plaque d'athérome. Les statines ont pour effet de diminuer les taux de cholestérol circulant. Cependant, le fait d'observer une régression de la plaque d'athérome lors de ce traitement montre qu'il existe un mécanisme de "clairance" qui est efficace lorsque l'apport en LDL est diminué (Robinson & Gidding, 2014). Ce résultat suggère que la clairance des lipides de la plaque d'athérome via l'efflux de cholestérol est une solution envisageable dans le traitement de l'athérosclérose.

La dysfonction de l'efflux de cholestérol par les macrophages et cellules spumeuses est corrélée au risque d'aggravation de l'athérosclérose depuis les années 1990 et pourrait constituer une cible thérapeutique (Barrett, 2020; Yancey & St Clair, 1992).

Compte tenu du rôle important des macrophages et des cellules spumeuses dans ce contexte, des chercheurs ont exploré l'impact que pouvaient avoir les plantes médicinales et les polyphénols sur leurs mécanismes d'efflux.

C'est le cas d'une équipe canadienne qui a travaillé sur l'extrait aqueux de marrube blanc (*Marrubium vulgare*). Leurs résultats ont mis en avant les propriétés de cet extrait à favoriser l'efflux de cholestérol sur le modèle de macrophages humains THP-1 (Berrougui et al., 2006). Des composés comme les polyphénols issus des baies de Camérisier (*Linocera caerulea*) ou

encore de peau de grenade (*Punica granatum*) ont aussi été décrits pour les mêmes effets sur le modèle de macrophage murin RAW 264.7 (S. Liu et al., 2019; S. Zhao et al., 2016).

Des principes actifs de plantes médicinales comme la curcumine, la quercétine ou encore la chrysine (flavonoïde) ont aussi été décrits pour augmenter l'expression du récepteur scavenger SRB-1 et du transporteur ABCA1 sur des modèles de macrophages murins (Chang et al., 2012; S. Wang et al., 2015a; Zhong et al., 2018).

A l'heure actuelle, aucune étude n'a été faite sur les actions que pourraient jouer les plantes médicinales de La Réunion sur la modulation du métabolisme des lipoprotéines par les macrophages.

Bilan L'intérêt de l'utilisation des plantes médicinales dans le contexte d'athérosclérose : ce qu'il faut retenir

- Les plantes médicinales peuvent exercer des effets préventifs ou curatifs de l'athérosclérose.
- Les principes actifs de plantes médicinales peuvent avoir un impact sur l'environnement intra-plaque (*ex : présence de produits d'oxydation, cytokines ou de LPS)* et sur les mécanismes de réponse des cellules exposées à cet environnement.

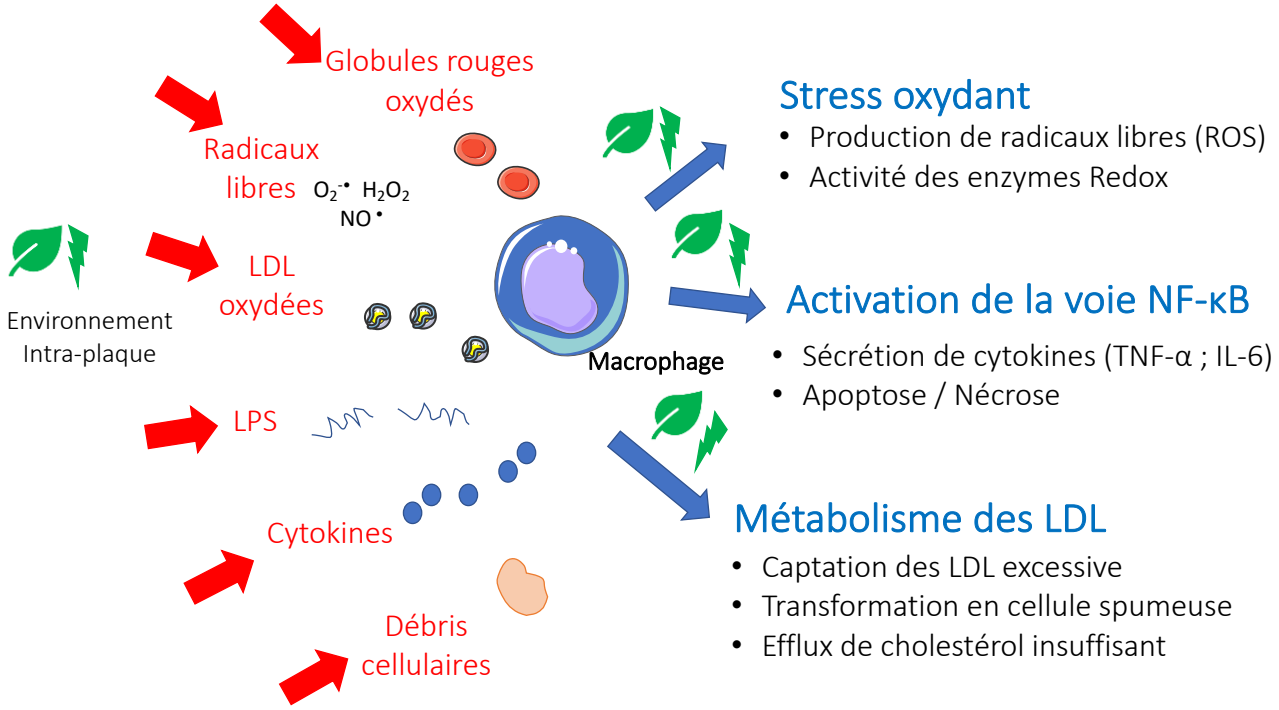


Illustration bilan 6 : Les différents éléments conduisant à l'aggravation de l'athérosclérose à l'échelle cellulaire (Images SERVIER complétées et modifiées)

- Les connaissances sur le mode d'action que peuvent avoir les tisanes à base de plantes médicinales utilisées à La Réunion dans le contexte d'athérosclérose restent limitées. Cependant, des éléments suggérant leur possible bioactivité dans ce contexte ont été apportés par la littérature.

A partir des notions issues de la littérature, il est possible d'étudier le potentiel des tisanes de plantes médicinales utilisées à La Réunion en focalisant les recherches sur des aspects allant de la caractérisation du contenu en polyphénols aux études de bioactivité in vitro et in vivo.

Objectifs du travail de thèse

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité au monde. L'athérosclérose est à l'origine de nombreuses maladies cardiovasculaires (AVC, Angor, Infarctus du myocarde). A l'Ile de La Réunion, la prévalence de facteurs de risques de l'athérosclérose est élevée (diabète, obésité, surpoids) et un décès sur quatre est dû aux maladies cardiovasculaires.

A l'heure actuelle, il existe des méthodes de prévention et de traitement de l'athérosclérose comme les mesures hygiéno-diététiques, approches pharmacologiques ou encore interventionnelles. Certaines approches nutritionnelles mettent en avant l'utilisation de polyphénols d'origine végétale connus pour leur bioactivité.

L'usage traditionnel des plantes médicinales concerne déjà près de deux tiers de la population mondiale. La Réunion fait partie des Hotspots mondiaux de la biodiversité. Elle compte 27 plantes médicinales utilisées traditionnellement et inscrites à la Pharmacopée Française. Cependant, il réside encore un manque d'informations concernant le contenu en principes actifs de ces plantes et leur bioactivité.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer la bioactivité de huit plantes médicinales utilisées et commercialisées à La Réunion dans un contexte de perturbations métaboliques et particulièrement celui de l'athérosclérose : *Hubertia ambavilla*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa*, *Aphloia theiformis*, *Hypericum lanceolatum*, *Pelargonium x graveolens*, *Syzygium cumini* et *Psiloxylon mauritianum*.

Dans un premier temps nous avons étudié l'impact de différents procédés de transformation (extrait hydro-acétonique, infusion, décoction) sur :

- Le contenu en polyphénols antioxydants (Quantification au réactif de Folin, Analyse en spectrométrie de masse)
- La capacité antioxydante (Test biochimique au DPPH, Tests *in vitro* d'inhibition de la lyse de globules rouges humains ou de production de ROS intracellulaires par des préadipocytes murins soumis à un stress oxydant)

L'approche méthodologique impliquant l'étude de la bioactivité d'extraits aqueux (infusions et décoctions) s'avère être innovante car la totalité des données recueillies sur les plantes médicinales utilisées à La Réunion et leur contenu reposent sur l'étude de préparations issues d'une extraction par solvant organique.

Dans un second temps, le modèle cellulaire et les paramètres de la bioactivité à évaluer ont été définis à la suite de recherches bibliographiques.

Dans un troisième temps, nous avons sélectionné un procédé de transformation utilisé traditionnellement et étudié son impact sur un modèle de macrophages murins dans un contexte mimant les phases précoces de l'athérosclérose. Les paramètres suivants ont été étudiés :

- Impact sur la cytotoxicité engendrée par la présence de LDL oxydées (Quantification au Rouge Neutre)
- Impact sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires (Utilisation de la sonde DCFH-DA)
- Impact sur l'activation de la voie pro-inflammatoire NF-κB (Quantification de la phosphatase alcaline sécrétée par des macrophages RAW Blue)
- Impact sur la captation de LDL oxydées (Marquage de LDL au Dil-C18, analyse par cytométrie en flux et observations en microscopie à fluorescence/confocale)

Démarche expérimentale

Expérimentations associées à l'article 1

Préparation des extraits hydroacétoniques riches en polyphénols et tisanes à base de plantes médicinales

Les plantes médicinales *H. ambavilla*, *A. triplinervis*, *D. viscosa*, *A. theiformis*, *H. lanceolatum*, *P. x graveolens*, *S. cumini* et *P. mauritianum* ont été préparées par l'Entreprise selon le procédé de transformation industriel : parage, déshydratation aux microondes, broyage et packaging sous forme de dosette. Les dosettes et les broyats de plantes ont ensuite été utilisés comme matériel de départ pour les expérimentations au Laboratoire.

Préparation des extraits riches en polyphénols

Les broyats de plantes ont été homogénéisés dans un mélange acétone/eau (30:70) à raison de 4 g de plantes pour 20 mL de solvant pendant 90 minutes à 4°C. La préparation a ensuite été centrifugée à 1372 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant riche en polyphénols a été récupéré et stocké à -80°C jusqu'à utilisation. Cette expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante.

Préparation des infusions et décoctions de plante médicinale

Les infusions ont été obtenues ont été préparées en incubant un sachet de préparation pour tisane (1 g de broyat de plante) dans 1 litre d'eau distillée bouillante pendant 15 minutes. Pour les décoctions, le sachet de préparation pour tisane a été placé dans 1 litre d'eau distillée à température ambiante puis porté à ébullition pendant 30 minutes. A la fin des différents temps d'incubation respectifs, les sachets de préparation pour tisane ont été enlevés et les solutions refroidies à température ambiante avant d'être stockés à -80°C.

Quantification et identification des polyphénols

Quantification des polyphénols par la méthode de dosage au réactif de Folin Ciocalteu

La quantification des polyphénols totaux a été effectuée par la méthode de dosage au réactif de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme étalon. Dans une plaque de titration de 96 puits, 25µl d'échantillon (extrait riche en polyphénols ou tisanes) ont été ajoutés à 125 µl de

réactif de Folin-Ciocalteu. Puis 100 µL de solution de $NaCO_3$ (75 g/L) ont été ajoutés. Après homogénéisation, la plaque a été mise à incuber pendant 5 minutes à 50°C puis refroidie à 4°C pendant 5 minutes. Une lecture de la densité optique à 760 nm a ensuite été faite à l'aide d'un spectrophotomètre Fluostar Omega. Les concentrations en polyphénols ont été exprimées en g équivalent d'acide gallique (GAE) / 1 g de plante pour les extraits riches en polyphénols et en mg GAE / L pour les tisanes.

Identification et quantification des polyphénols présents dans les préparations de plantes médicinales par spectrométrie de masse

L'identification des polyphénols contenus dans les préparations de plantes médicinales (extraits riches en polyphénols, infusions et décoctions) a été réalisée par la plateforme Polyphenols Biotech (210 Chemin de Leysotte / CS 50008 Villenave d'Ornon, Bordeaux, France). L'identification a été réalisée par analyse UPLC-ESI-MS (ultra-high-performance liquid chromatography analysis coupled to diode array detection and electrospray ionization-mass spectrometry) Les échantillons ont été dilués et filtrés sur PTFE (0,45 µm) et injectés dans un volume de 1 µL dans une colonne C18 Agilent ZORBAX RRHD SB-C18 (1,8 µm, 2,1 x 100 mm) pour la séparation. Le contenu de la colonne a été élué avec un gradient de 0,1% d'acide formique aqueux (A) et 0,1 % d'acide formique dilué dans de l'acétonitrile (B) à un débit de 0,3 mL/min, avec 1 % B entre 0-0,4 min, 1-10% B à 0,4-2 min, 10-35% B à 2-6 min, 35-50 % B à 6-7 min, 50-70% B à 7-8,8 min, 70-92% B à 8,8-10,8 min, 92-100% B à 10,8-12 min, 100-1% B à 12-15,2 min. La chromatographie a été réalisée à température ambiante et les longueurs d'onde de détection utilisées étaient de 280, 320 et 380 nm. Pour l'analyse en spectrométrie, la source d'ionisation par électrospray a été utilisée.

Évaluation de la capacité antioxydante

Test de réduction du radical libre DPPH

L'évaluation de la capacité des échantillons à réduire le radical libre DPPH a été effectuée via un test colorimétrique. La vitamine C à 100 µM a été utilisée comme témoin positif. Le mélange acétone/eau ou l'eau ont été utilisés comme contrôle négatif. 200µL d'une solution méthanolique de DPPH (0,25 mM) ont été ajoutés dans une plaque de titration 96 puits contenant 40 µl d'échantillon à tester. Après homogénéisation, la plaque a été incubée pendant 25 minutes à température ambiante. Le pourcentage de radicaux libres réduits par les

échantillons a été déterminé par lecture de la densité optique à 517 nm. La formule suivante a ensuite été utilisée pour déterminer la capacité antioxydante des échantillons :

$$Capacité\ antioxydante\ (\%) = \frac{D.O\ témoin\ négatif - D.O\ échantillon}{D.O\ témoin\ négatif} \times 100$$

Test d'inhibition de l'hémolyse de globules rouges humains

La capacité des extraits riches en polyphénols (ERP) et des tisanes (infusions et décoctions) à inhiber l'hémolyse de globules rouges humains soumis à un radical libre a été évaluée de la manière suivante :

Des globules rouges humains issus de 5 donneurs sains (groupe O+) de l'Établissement Français du Sang (EFS) ont été mis en suspension dans une solution saline (NaCl 0,15M ; pH 7). 140 µl d'échantillons à tester ont été déposés dans une plaque de titration 96 puits, 100 µL d'une solution de globules rouges diluée au 1/100 puis 40 µl d'une solution d'AAPH (50 mM) ont été ajoutés. Une cinétique a été réalisée à 450 nm pendant 18h à 37°C. Le temps de demi-hémolyse correspondant au temps nécessaire pour obtenir une lyse de 50% des globules rouges a ainsi été déterminé.

Culture cellulaire

Culture de préadipocytes murins 3T3-L1

Les préadipocytes murins 3T3-L1 provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC©) ont été mis en culture dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) contenant 4,5 g/L de glucose, 10% de sérum bovin fœtal (SBF) inactivé par la chaleur, 5mM de L-glutamine, 2µg/ml de streptomycine et 0,03 µg/ml de pénicilline. Les cellules ont été placées en incubation dans une étuve à 37°C en présence de 5% CO_2.

Évaluation de la viabilité cellulaire en présence de préparations de plantes

Evaluation de la libération de lactate déshydrogénase (marqueur de nécrose)

Les cellules ont été incubées pendant 24 h en présence ou non des échantillons à tester ou de Triton X-100 (1%). Après le traitement, les surnageants ont été collectés et la quantification de la lactate déshydrogénase a été effectuée à l'aide d'un kit enzymatique (LDH assay – Abcam). Ce dosage enzymatique repose sur l'évaluation de l'activité de la LDH en présence d'un substrat (LDH substrate) qui une fois transformé par l'enzyme donne un produit (rouge) détectable en spectrophotométrie à 450 nm.

Quantification des cellules viables avec la méthode au Rouge Neutre

La viabilité cellulaire a été évaluée en mesurant l'internalisation (lysosomale) du rouge neutre par les préadipocytes murins viables selon la méthode de Repetto *et al.,* (Repetto et al., 2008). Dans une plaque 96 puits, les cellules ont été co-incubées avec les échantillons pendant 24 h. Après élimination du milieu de culture et deux rinçages au PBS, les cellules ont été mises en présence de 100 µl de solution de rouge neutre (40 µg /ml) pendant 2 h. Après élimination du rouge neutre et rinçage au PBS, 100 µl d'une solution de décoloration (49,5% éthanol ; 49,5% eau distillée / 1% acide formique) a ensuite été ajoutée. Après 5 minutes d'homogénéisation, la densité optique a été lue à 540 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules viables par rapport au témoin (% contrôle).

Evaluation des effets de préparations de plante médicinale sur la production de radicaux libres intracellulaires (ROS) par des préadipocytes 3T3-L1 exposés au peroxyde d'hydrogène

La sonde 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA) a été utilisée pour mesurer les ROS intracellulaires. Après son entrée dans la cellule, le DCFH-DA est hydrolysé par une estérase intracellulaire. Le DCFH ainsi formé est oxydé par les ROS intracellulaires aboutissant à la production de DCF, dérivé fluorescent. La quantité de fluorescence est reliée à la quantité de ROS. Dans une plaque 96 puits, les cellules ont été ensuite placées en co-incubation avec les échantillons pendant 24h. Après un rinçage au PBS, les cellules ont été exposées pendant 45 min à la sonde DCFH-DA. Après élimination de la sonde par rinçage au PBS, les cellules ont été incubées avec ou sans H_2O_2 (200 µM). La fluorescence a été mesurée après 1h d'incubation ($\boldsymbol{\lambda}_{excitation}$=492 nm; $\boldsymbol{\lambda}_{émission}$=520 nm).

Analyses statistiques

Les données ont été exprimées comme la moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism. Les différences statistiques entre les différentes moyennes ont été déterminées à la suite d'une correction par le test de Bonferroni et ont été considérées comme significatives pour une p-value < 0,05.

Expérimentations associées à l'article 2

Préparation des LDL

Isolement des LDL

Les LDL ont été extraites d'un pool de plasma de 5 sujets sains provenant de l'Etablissement français du sang (EFS). La densité du plasma a été ajustée à une valeur de 1,063 par addition de KBr solide, en agitant doucement. Dans les tubes à centrifuger Beckman Ultra-ClearTM ont été déposées la solution aqueuse de KBr (d=1,063), puis la solution de plasma et enfin l'eau distillée. Les échantillons ont subi une ultracentrifugation à 252 000 g pendant 20 h, à 10°C. Les fractions jaunes de LDL ont été collectées avec une seringue de 10 mL et ont suivi un dessalage avec ajout de PBS et centrifugations successives (4000 g / 20 min) dans des centricons de 50 mL. La pureté des LDL a été évaluée après migration SDS-PAGE puis coloration au bleu de Coomassie et leur teneur en protéines a été évaluée à l'aide d'un kit de dosage des protéines (DC Assay). Les LDL ont été conservées à 4°C à l'obscurité et filtrées sur une membrane de 0,2 µm avant d'être utilisées en culture cellulaire.

Oxydation des LDL

Les LDL ont été diluées dans du PBS pour atteindre la concentration de 2 mg /ml puis mélangées à 5 µM final de $CuSO_4$ puis exposées pendant 2 h aux U.V. à température ambiante pour obtenir des LDL modérément oxydées. Le degré d'oxydation a été évalué en quantifiant les substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) selon la méthode d'Ohkawa *et al* (Ohkawa et al., 1979). Les échantillons ont atteint des concentrations de 18,07 ± 0,5 nmol TBARS /mg apo B. Les LDL oxydées ont été conservées à 4°C à l'obscurité et filtrées sur une membrane de 0,2 µm avant d'être utilisées en culture cellulaire.

Marquage des LDL

Les LDL ont d'abord été oxydées puis marquées avec la sonde fluorescente DilC18 selon la méthode de Xu *et al* (S. Xu et al., 2010). Les LDL ont été incubées en présence de DiC18 (0,1 mg/mL) pendant une nuit à 37 °C sous une légère agitation. L'excès de sonde non liée a été éliminé en ré-isolant les LDL par ultracentrifugation (dans une solution de KBr) à 252 000 g pendant 20 h à 10 °C. La couche de LDL oxydées marquées (Dil-ox-LDL) a été récupérée à la micropipette. L'élimination du KBr a été réalisée par des lavages successifs en présence de PBS dans des centricons de 1 mL. La teneur en protéines a été évaluée sur un échantillon qui a

suivi le même processus sans ajout de sonde fluorescente DilC18. Les Dil-ox-LDL stérilisées par filtration ont été rajoutées au milieu de culture cellulaire pour atteindre une concentration finale de 100 µg/ml.

Culture cellulaire

Les macrophages RAW 264.7 (ATCC-TIB 71) et RAW-Blue ™ ont été obtenus à partir de la collection de cultures ATCC et InVivoGen. Les cellules ont été mises en culture dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco avec 25 mM de glucose, 10 % de sérum bovin fœtal inactivé à la chaleur, 5 mM de L-glutamine, 2 µg/ml de streptomycine et 0,03 µg/ml de pénicilline. Les cellules ont été maintenues dans un incubateur humidifié à 5 % de CO2 à 37 °C et ont été passées 4 jours avant le test lorsqu'une confluence de 70 à 80 % fût atteinte. Pour les macrophages RAW-Blue, l'addition de zéocine (200 µg/ml) au milieu de culture a permis de maintenir une pression de sélection.

Evaluation de l'impact de décoctions de plantes médicinales sur la production de radicaux libres intracellulaires par des monocytes/macrophages murins RAW 264.7 exposés à des LDL oxydées (Data supplémentaires)

La présence de radicaux libres intracellulaires (ROS) a été déterminée en mesurant l'oxydation de la sonde de 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate. DCFH-DA. Dans une plaque 96 puits, les cellules ont été ensemencées à une densité de 10.10^3 cellules / puits. Les cellules ont ensuite été co-incubées en présence des échantillons et des LDL oxydées pendant 24h. Un rinçage au PBS a ensuite été fait et les cellules ont été exposées pendant 45 min à la sonde DCFH-DA. Après l'incubation, la sonde en excès a été éliminées par lavage au PBS puis 100µL de PBS ont été ajoutés. Les ROS intracellulaires ont ensuite été détectés par fluorimétrie à 492 nm d'excitation et 520 nm d'émission.

Evaluation de l'impact de décoctions de plantes médicinales sur la viabilité cellulaire de monocytes/macrophages murins RAW 264.7 exposés à des concentrations cytotoxiques de LDL oxydées

Quantification des cellules viables avec la méthode au Rouge Neutre

La viabilité cellulaire a été évaluée en mesurant l'internalisation du rouge neutre par les monocytes/macrophages murins. La quantification des cellules viables au rouge neutre a été réalisée selon l'article de Repetto *et al.,* (Repetto et al., 2008). Les cellules ont été placées dans une plaque 96 puits à une densité de 10.10^3 cellules / puits et déprivée en sérum pendant 16h,

puis co-incubées avec les échantillons en présence de LDL oxydées ou non pendant 24h. Après deux rinçages au PBS, 100 µl d'une solution de rouge neutre (40 µg/ml) a été ajoutée et incubée pendant 2 h. Après rinçage au PBS, une décoloration a été réalisée en utilisant 100 µl d'une solution d'un mélange éthanol:eau:acide formique (49,5:49,5:1). Après 5 minutes d'homogénéisation, la densité optique a été lue à 540 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage par rapport au témoin (% control)

Evaluation de l'impact de décoctions de plantes médicinales sur la captation de LDL marquées au Dil C18 par des monocytes/macrophages murins RAW 264.7

Microscopie à fluorescence / confocale

Les macrophages RAW 264.7 ont été ensemencés à une densité de 200 x 10^3 cellules /ml dans une plaque de 24 puits. Après 24 h, le milieu de culture cellulaire a été enlevé et déprivée en sérum bovin foetal (SBF) pendant 16 h. Les cellules ont été lavées avec 500 µl de PBS puis incubées pendant 4 h à 37°C / 5% CO2 avec un milieu de culture cellulaire complété avec des Dil-oxLDL. Après une incubation de 4 h, les cellules ont été rincées 3 fois avec du PBS puis incubées avec du PFA 4% pendant 15 min. Les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS, incubées avec du DAPI pendant 10 min et rincées deux fois avec du PBS. Les lamelles ont été récupérées et scellées avant l'analyse sur Nanozoomer (scanner de lames) ou en microscopie confocale.

Cytométrie en flux

Les macrophages RAW 264.7 ont été ensemencés à une densité de 250 x 10^3 cellules/ml sur une plaque de 96 puits. Après 24h, les cellules ont été privées de sérum pendant 16 h. Les cellules ont ensuite été stimulées avec un milieu de culture cellulaire supplémenté en Dil-ox-LDL pendant 4 h, incubées avec de l'accutase pendant 15 min à 37°C et transférées sur une plaque à 96 puits avec fond en U. Les cellules ont été fixées avec du PFA 4 % pendant 15 min à la température ambiante et centrifugées à 700 g pendant 1 min. Le surnageant a été retiré puis le PBS a été ajouté. Les cellules ont été centrifugées à 700 g pendant 1 minute et remises en suspension dans 100 µl de PBS. L'absorption cellulaire de Dil-ox-LDL a été réalisée en mesurant la fluorescence moyenne de phycoérythrine (PE-A) sur le cytomètre de flux. La fluorescence a été exprimée en % du contrôle.

Evaluation de l'impact de décoctions de plantes médicinales sur l'activation de la voie de signalisation cellulaire NF-κB par des monocytes/macrophages murins RAW 264.7 exposés au LPS d'*E. coli*

Les macrophages RAW-Blue sont des macrophages RAW 264.7 transfectés. Ils ont pour particularité de sécréter une phosphatase alcaline lorsque la voie NF-κB est activée. Les cellules ont été ensemencées à une densité de 100.10^3 cellules/puits dans une plaque de 96 puits. 20 µl de milieu de culture supplémenté en décoctions ont été ajoutés aux cellules. Ensuite, les cellules ont été traitées avec du LPS d'*E. coli* à une concentration finale de 0,5µg/ml. Après 24 heures d'incubation, 20 µl de surnageant ont été récupérés et le réactif Quantiblue (substrat pour la phosphatase alcaline) a été ajouté. L'absorbance a été lue à 620 nm et les résultats ont été exprimés en % du contrôle.

Analyses statistiques

Les données ont été exprimées comme la moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été menées sur le logiciel GraphPad Prism. Les différences statistiques entre les différentes moyennes ont été déterminées par le test de Bonferroni et ont été considérées comme significatives pour une p-value $< 0,05$.

Article 1

Date de soumission : 18 Août 2020 - Date de publication : 7 Octobre 2020

Objectifs de l'étude

Cette étude, a été réalisée sur huit plantes médicinales de La Réunion : l'Ambaville (*Hubertia ambavilla*), l'Ayapana (*Ayapana triplinervis*), le Bois d'Arnette (*Dodonaea viscosa*), le Change Écorce (*Aphloia theiformis*), le Fleur Jaune (*Hypericum lanceolatum*), le Géranium rosa (*Pelargonium x graveolens*), le Jamblon (*Syzygium cumini*) et le Bois de Pêche Marron (*Psiloxylon mauritianum*).

Ces plantes ont été sélectionnées selon les critères suivants :

- Utilisation traditionnelle à La Réunion
- Propriétés antioxydantes, antidiabétiques, anti-inflammatoires ou hypolipémiantes décrites traditionnellement (données empiriques)
- Transformation industrielle et commercialisation par l'Entreprise HABEMUS PAPAM (collaborateur CIFRE)

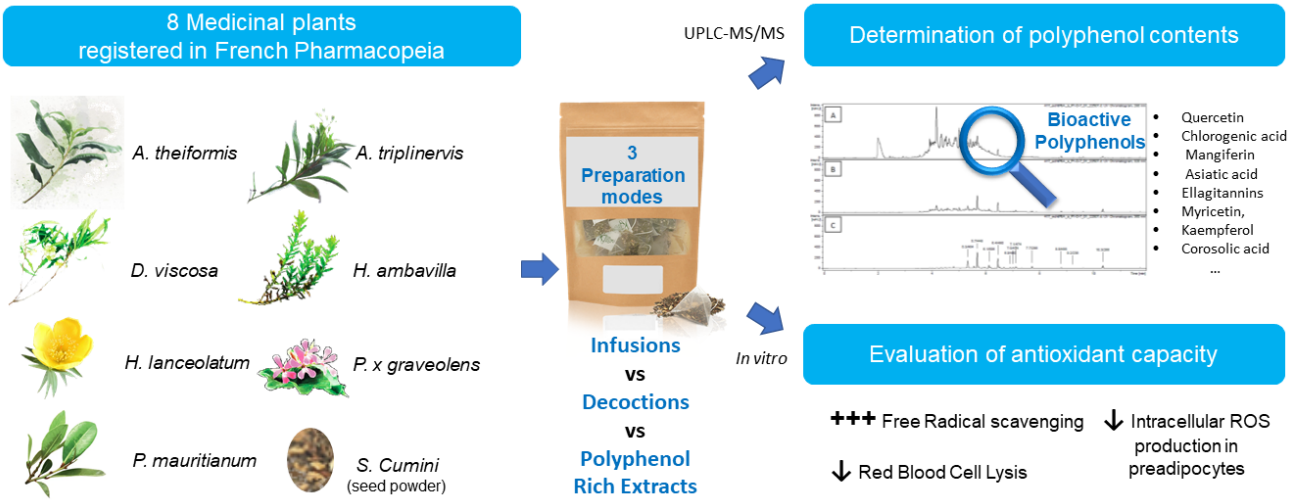
Au Laboratoire, trois procédés de transformation ont été appliqués à ces plantes médicinales (à partir de sachets de tisanes commerciales) :

- Les ***infusions*** et les ***décoctions*** aqueuses utilisées traditionnellement par les consommateurs (tisanes)
- Les ***extraits hydroacétoniques*** riches en polyphénols

Le premier objectif de cette étude a été de quantifier et d'identifier les polyphénols présents dans les différentes préparations de plantes médicinales. Dans un second temps, il a été question de déterminer l'impact des procédés de transformation sur le contenu en polyphénols (aspects quantitatif et qualitatif).

Le second objectif de l'étude a été d'évaluer la capacité antioxydante des tisanes et des extraits riches en polyphénols et de déduire l'impact du procédé de transformation sur ce paramètre.

Article 1: "Evaluation of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Aqueous Extracts from Eight Medicinal Plants from Reunion Island: Protection against Oxidative Stress in Red Blood Cells and Preadipocytes"



Graphical Abstract 1 : Article 1

antioxidants

MDPI

Article

Evaluation of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Aqueous Extracts from Eight Medicinal Plants from Reunion Island: Protection against Oxidative Stress in Red Blood Cells and Preadipocytes

Eloïse Checkouri [1,2], Franck Reignier [2], Christine Robert-Da Silva [1] and Olivier Meilhac [1,3,*]

1 INSERM, UMR 1188 Diabète Aathérothombose Réunion Océan Indien (DéTROI), Université de La Réunion, 97490 Sainte-Clotilde, La Réunion, France; eloise.checkouri@gmail.com (E.C.); christine.robert@univ-reunion.fr (C.R.-D.S.)
2 Habemus Papam, Food Industry, 97470 Saint-Benoit, La Réunion, France; dg.asbethleem@outlook.fr
3 CHU de La Réunion, CIC 1410, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France
* Correspondence: olivier.meilhac@inserm.fr; Tel.: +262-0262-938-811

Received: 18 August 2020; Accepted: 30 September 2020; Published: 7 October 2020

check for updates

Abstract: Background—Medicinal plants are traditionally used as infusions or decoctions for their antioxidant, anti-inflammatory, hypolipidemic and anti-diabetic properties. Purpose—The aim of the study was to define the polyphenol composition and to assess the antioxidant capacity of eight medicinal plants from Reunion Island referred to in the French Pharmacopeia, namely *Aphloia theiformis*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa*, *Hubertia ambavilla*, *Hypericum lanceolatum*, *Pelargonium x graveolens*, *Psiloxylon mauritianum* and *Syzygium cumini*. Methods—Polyphenol content was assessed by biochemical assay and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Antioxidant capacity was assessed by measuring DPPH reduction and studying the protective effects of herbal preparation on red blood cells or preadipocytes exposed to oxidative stress. Results—Polyphenol content ranged from 25 to 143 mg gallic acid equivalent (GAE)/L for infusions and 35 to 205 mg GAE/L for decoctions. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry analysis showed the presence of major bioactive polyphenols, such as quercetin, chlorogenic acid, procyanidin and mangiferin. Antioxidant capacity assessed by different tests, including DPPH and Human red blood cell (RBC) hemolysis of herbal preparations, demonstrated a dose-dependent effect whatever the extraction procedure. Our data suggest that decoction slightly improved polyphenol extraction as well as antioxidant capacity relative to the infusion mode of extraction (DPPH test). However, infusions displayed a better protective effect against oxidative stress-induced RBC hemolysis. Conclusion—Traditional preparations of medicinal plant aqueous extracts (infusions and decoctions) display antioxidant properties that limit oxidative stress in preadipocytes and red blood cells, supporting their use in the context of metabolic disease prevention and treatment.

Keywords: antioxidant; medicinal plants; polyphenols; infusions; decoctions; pharmacopeia

1. Introduction

Reunion Island is a hotspot of vegetal biodiversity where the use of medicinal plant-derived beverages is documented since the 17th century [1]. To date, 22 plants are referred to in the French Pharmacopeia; they are traditionally used by the population for their antioxidant, antidiabetic, hypolipidemic and anti-inflammatory properties. The commercialization of these plants (dry form) for

infusion or decoction is based on empirical data, urging for the need to investigate the composition and antioxidant activity of these herbal preparations.

Eight commercially available medicinal plants were selected for this study according to the following criteria: (1) wide use in traditional practices in Reunion Island, (2) reported biological activity: anti-diabetic, antioxidant and cholesterol-lowering properties, and (3) marketability. The bioactivity and traditional uses of the different medicinal plants is described in the Table S1.

Several ethnopharmacological studies have identified bioactive molecules from medicinal plants exerting antioxidant and anti-inflammatory activity. These studies put in light the potential of the use of medicinal plants in the prevention and management of metabolic disorders in which excessive oxidative stress plays an important role.

Oxidative stress is the consequence of an imbalance between the production of free radicals and antioxidant defense [2]. An excess of reactive oxygen species (ROS, such as $^{\bullet}OH$ or $O_2^{\bullet -}$) can induce major damage on the main cell constituents including lipids, proteins, carbohydrates and nucleic acids. Oxidative stress is known to be a trigger for several signaling pathways, leading to chronic, low-grade inflammation (production of cytokines, activation of different cell types by increasing the expression of adhesion molecules for leukocytes, etc.) and thus participating in the etiology of several human diseases such as diabetes mellitus and obesity [3–6]. In the context of metabolic diseases, oxidative stress and inflammation are the first signs of cellular dysfunction prior to the onset of symptoms. For example, in case of intestinal dysbiosis and unbalanced diet, preadipocytes and adipocytes are subjected to a high metabolic activity. In fact, the excess of energy provided by the diet leads to an increased stimulation of the energetic metabolism (mitochondrial activity and respiratory chain) causing overwhelming production of free radicals resulting in a marked oxidative stress. Oxidative stress can impair preadipocyte differentiation and promotes insulin resistance [7,8].

Several studies have focused on dietary polyphenols [9]. Medicinal plants constitute natural sources of polyphenols and are commonly used in traditional medicine all over the world. Polyphenols are secondary plant metabolites with several hydroxyl groups on one or more aromatic rings. They are omnipresent in the plant kingdom, notably in vascular plants, encompassing more than 8000 identified components, including simple molecules but also high-molecular weight polymers. Polyphenols are the most abundant dietary antioxidants as their dietary intake is about 1 g/day [10–13].

Evidence for the role of these abundant dietary micronutrients in the prevention of degenerative diseases such as Alzheimer's disease or cardiovascular disease is emerging [14–17]. For example, various bioactive effects of flavonoids have been investigated, highlighting their anti-inflammatory, antioxidant, anti-diabetic, cardioprotective and anti-cancer properties via their action on different enzymes and signaling pathways [18–23]. Moreover, several studies have shown that dietary polyphenols exert antioxidant activity and display protective effects on erythrocyte oxidative damage and lipid peroxidation [24–28]. Among the plants selected for this study, some have been described in the literature while others remain poorly documented, in particular because they are rare and endemic. Despite their widespread use in Reunion Island, there is a real lack of information on the chemical composition and biological properties of herbal teas (infusion or decoction) prepared from these medicinal plants. The goal of this study was to explore the polyphenol composition (qualitative and quantitative) of eight different Reunion Island medicinal plants and to assess their antioxidant capacity according to their preparation mode (polyphenol rich extract, infusion or decoction) by different approaches in vitro and in cell culture.

2. Material and Methods

2.1. Sample Preparation

2.1.1. Raw Material

The following industrial process was applied for the different plant leaves and stems (except for *S. cumini* for which dehydrated seed powder was used): trimming, microwave dehydration, grinding

and packaging in tea bags containing 1 g of dehydrated plant mash or powder. All raw material was provided by HABEMUS PAPAM Industry. Industrial lots and corresponding GPS coordinates are provided in Table 1.

Table 1. Industrial lots and raw material cropland localization according to the global positioning system.

Medicinal Plant	Industrial Lot	GPS Coordinates
Ayapana triplinervis	PAY180111	−21.037151, 55.687405″
Hubertia ambavilla	FLAM20171127	−21.131021, 55.640708″
Psiloxylon mauritianum	FLBPM 20180427	−20.947334, 55.548979″
Dodonaea viscosa	FLBA20171106	−21.059596, 55.507404″
Aphloia theiformis	FLCE20171106	−21.059596, 55.507404″
Hypericum lanceolatum	FLFJ20171016	−21.140988, 55.641630″
Syzygium cumini	JAMBLON230617	−20.540390, 55.26290″
Pelargonium x graveolens	FLOGE171113	−21.210391, 55.548644″

2.1.2. Polyphenol-Rich Extracts (PRE)

Plant powders were incubated with an acetone/water (70/30) solvent mixture at 4 °C for 90 min (4 g of plant mash in 20 mL acetone/water). The mixture was then centrifuged at 1372 g, 4 °C for 20 min. The polyphenol-rich supernatant (ranging from 7 to 15 mL depending on the level of solvent retention by the plant material) was collected and stored at −80 °C until analysis. Each sample was prepared in triplicate.

2.1.3. Infusions and Decoctions

Infusions were prepared by the addition of one tea bag (containing 1 g of plant mash) to 1 L of boiling distilled water followed by 15 min of incubation at room temperature (RT). For decoction, one tea bag was added to 1 L of RT distilled water and kept boiling for 30 min. The tea bags were removed and the infusions or decoctions were cooled at RT before storage at −80 °C until analysis.

3. Determination of Antioxidant Polyphenol Content in Medicinal Plant Extracts, Infusions and Decoctions

3.1. Total Phenolic Content

To determine the total polyphenol content of the different samples, the Folin–Ciocalteu test was used [29]. Briefly, 25 µL of each sample, 125 µL of Folin–Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) and 100 µL of sodium carbonate (75 g/L) were added to a 96-well microplate and incubated at 50 °C for 5 min. After cooling for 5 min at 4 °C, the absorbance was measured at 760 nm (Fluostar Omega, Bmg Labtech, Cambridge, UK). A calibration curve was made using a standard solution of gallic acid (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). For the polyphenol-rich extracts (PRE), the total polyphenol content was expressed as g gallic acid equivalent (GAE)/1 g plant mash. For infusions and decoction, the total polyphenol content was expressed as mg GAE/1 g (=mg GAE/1 L since these preparations are made at a ratio of 1 g/L)

3.2. Determination of Antioxidant Polyphenol Content in Medicinal Plant PRE, Infusions and Decoctions

Polyphenols contained in medicinal plant PRE, infusions and decoctions were identified by ultra-high-performance liquid chromatography analysis coupled to diode array detection and electrospray ionization-mass spectrometry (UPLC-ESI-MS, Agilent Technologies, Les Ulis, France) in Polyphenols Biotech platform (ADERA, Villenave d'Ornon, France). Briefly, samples were diluted, filtered on PTFE (0.45 µm) and injected at 1 µL on an Agilent ZORBAX RRHD SB-C18 column (1.8 µm,

2.1 × 100 mm) for chromatographic separation. The content of the column was eluted with a gradient mixture of 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B) at the flow rate of 0.3 mL/min, with 1% B at 0–0.4 min, 1–10% B at 0.4–2 min, 10–35% B at 2–6 min, 35–50% B at 6–7 min, 50–70% B at 7–8.8 min, 70–92% B at 8.8–10.8 min, 92–100% B at 10.8–12 min, 100–1% B at 12–15.2 min. The column temperature was held at room temperature and the detection wavelength was set to 280, 320 and 380 nm. For the mass spectrometer conditions, an electrospray ionization source was used.

4. Evaluation Antioxidant Activity of Polyphenol-Rich Extracts, Infusions and Decoctions from Medicinal Plants

4.1. Evaluation of the Free Radical-Scavenging Activity: DPPH Assay

Evaluation of the different sample radical scavenging activity on DPPH was performed according to the method described by Yang et al. with slight modifications [30]. Briefly, 0.25 mM of DPPH (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) was diluted in methanol and added to a 96-well microplate containing plant PRE, infusion or decoction samples. An antioxidant standard of 100 µM vitamin C (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) was used as a positive control. After 25 min of incubation at 25°C, the absorbance was measured at 517 nm (Fluostar Omega, Bmg Labtech, Cambridge, UK). The percentage of free radical scavenging activity was determined based on the optical density (OD) measured at 517 nm with a spectrophotometer, according to the following formula:

$$\text{Antioxidant capacity (\%)} = [(\text{OD negative control} - \text{OD sample})/(\text{OD negative control})] \times 100$$

The negative control is DPPH solution supplemented in sample vehicle diluted in methanol following sample dilution conditions.

4.2. Evaluation of the Protective Effects on Erythrocyte Damage Induced by the Radical AAPH: Hemolysis Test

The capacity of the plant polyphenol-rich extracts (PRE), infusions and decoctions to inhibit free radical-induced hemolysis was measured as described [26]. Red blood cells were obtained from five healthy subjects (O + group) at the "French Blood Agency". Cells were suspended in NaCl (0.15 M) at pH 7; different concentrations of PRE (1, 5, 10, 25 and 50 µM GAE) were added and hemolysis was triggered by addition of AAPH (50 mM). Red blood cell hemolysis was followed at 450 nm for 18.5 h at 37 °C using a FLUOstar Optima spectrophotometer (Bmg Labtech). Half time hemolysis (HT50) was determined with the x-axis value corresponding to ((OD t_0 + OD endpoint)/2) value of ordinate axis.

4.3. Cell Culture

Mouse 3T3-L1 preadipocytes were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC©, Manassas, VA, USA). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 25 mM glucose, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 5 mM L-glutamine, 2 µg/mL streptomycin and 0.03 µg/mL penicillin (Pan Biotech, Dutscher, Brumath, France). Cells were maintained in a humidified 5% CO_2 incubator at 37 °C.

4.3.1. Evaluation of the Medicinal Plant Extracts, Infusions and Decoctions on Cell Viability

LDH Assay

3T3-L1 preadipocytes were seeded at a density of 10×10^3 cells/well for 24 h. Then, cells were incubated with PRE, infusions, decoctions or 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) for 24 h. After treatment, the supernatant was collected and LDH assay was performed according to the supplier's instructions (Abcam, Cambridge, UK).

Neutral Red Assay

Cell viability was assessed by measuring the intake of the neutral red as described by Repetto and colleagues with slight modifications [31]. This test is based on the capacity of viable cell lysosomes to incorporate neutral red dye. After 24 h of incubation with medicinal plant PRE, infusions and decoctions, the medium was removed and cells were washed twice with PBS. A Total of 100 µL of neutral red medium solution (40 µg/mL) was added and the plate was incubated for 2 h at RT. The medium was removed and the cells were washed twice with PBS. Finally, neutral red destain solution (49.5% water, 49.5% ethanol, 1% glacial acetic acid) was added and absorbance was read at 540 nm. Results are expressed as % of control.

4.3.2. Evaluation of the Effects of Medicinal Plants PRE, Infusions and Decoctions on Intracellular ROS Production by 3T3-L1 Preadipocytes Exposed to H_2O_2

Intracellular levels of reactive oxygen species were determined by measuring the oxidation of 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), as previously described [29]. In a 96-well black plate, cells were seeded at a density of 10×10^3 cells/well and incubated with cell culture medium containing the different medicinal plant preparations. After 24 h, cells were washed with PBS and exposed to DCFH-DA (10 µM) for 45 min. After the incubation with the probe, cells were washed and then incubated for 1 h with or without H_2O_2 (200 µM). ROS were detected by fluorimetry (Fluostar Omega, Bmg Labtech, Cambridge, UK) at 492 nm for excitation and 520 nm for emission.

5. Statistical Analysis

Data are expressed as means ± SEM of three independent experiments performed in triplicate. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). Differences between the means were determined by the Bonferroni test and were considered as statistically significant for a p value < 0.05.

6. Results and Discussion

This study aimed at evaluating the composition and antioxidant properties of polyphenol-rich extracts (PRE), infusions and decoctions of eight medicinal plants from Reunion Island: *Aphloia theiformis*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa*, *Hubertia ambavilla*, *Hypericum lanceolatum*, *Pelargonium x graveolens*, *Psiloxylon mauritianum* and *Syzygium cumini*.

6.1. Determination of Polyphenol Content in Medicinal Plant Extracts

6.1.1. Total Phenolic Contents

As reported by Nowicka et al., the total polyphenol content can be used as an indicator of the antioxidant capacity of the food matrix. In our study, the total polyphenol content of the different medicinal plants was assessed by using the Folin–Ciocalteu assay and expressed in g of gallic acid equivalent (GAE)/g of plant (=GAE/L for infusions or decoctions since they were prepared using a ratio of 1 g/L) [32].

As shown on Figure 1, polyphenol contents significantly varied depending on the medicinal plant considered. *S. cumini, H. lanceolatum* and *P. mauritianum* extracts exhibited higher concentrations of polyphenols with, respectively, 7.6%, 5.2% and 4.9% GAE, *w/w*. Furthermore, these values are comparable to that of other dietary sources of polyphenols such as star anise, cocoa, spearmint, rosemary or thyme [33]. Traditional extraction consisting in infusion and decoction provided similar results, suggesting that these three aforementioned plants contained more polyphenols than the others. As expected, the decoction procedure allowed a better extraction than infusion (statistical significance was reached for *A. theiformis, S. cumini, H. lanceolatum* and *P. mauritianum*) (Figure 1B). Acetone/water extraction led to a lower yield than aqueous extraction (decoction/infusion) probably due to a different

ratio of mash to solvent (4 g/20 mL acetone-water then reduced to about 10 mL of extract for PRE versus 1 g/1000 mL for decoction and infusion). Traditional preparation is therefore very efficient for extracting polyphenols.

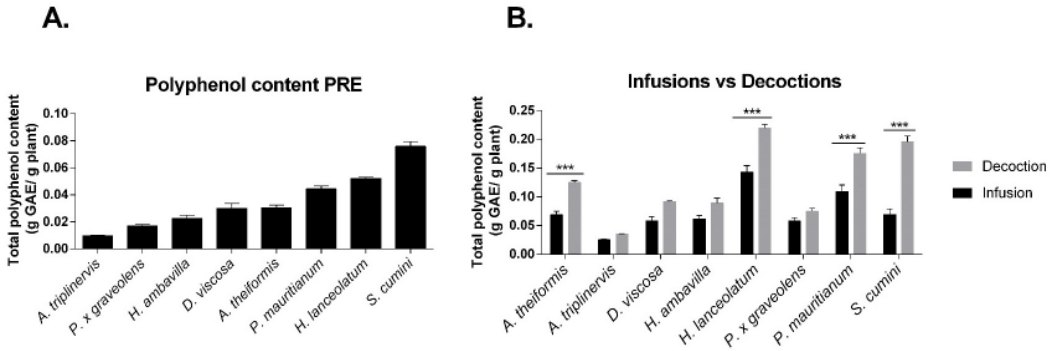


Figure 1. Total polyphenol content of the 8 medicinal plants depending on the preparation mode. (**A**) Medicinal plant polyphenol-rich extracts (PRE); (**B**) Infusions and decoctions. Polyphenol content was determined by Folin–Ciocalteu colorimetric assay and expressed as g gallic acid equivalent (GAE)/g plant. Infusions and decoctions were obtained with a ratio of 1 g plant/L of water, therefore g GAE/g plant = g GAE/L. Data shown are means ± SEM of three independent experiments. *** $p < 0.005$ as compared to decoctions.

6.1.2. Polyphenol Composition of Medicinal Plant PRE, Infusions and Decoctions by UPLC-MS/MS Analysis

Ultra-performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) analysis performed on both infusion and decoction samples of *Aphloia theiformis*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa*, *Hubertia ambavilla*, *Hypericum lanceolatum*, *Pelargonium x graveolens*, *Psiloxylon mauritianum* and *Syzygium cumini* allowed identification of 2 major families of polyphenols: phenolic acids and flavonoids (Table 2).

Table 2. UPLC-MS/MS analysis of the polyphenol content of medicinal plant PRE, infusions and decoctions.

Plant	Retention Time (min)	Molecular Weight (Da)	$[M-H]^-$/ $[M-H]^{2-}$	$[M-H]^+$	Assigned Identity	Content in µg/mL			% of Total Composition		
						Extract	Infusion	Decoction	Extract	Infusion	Decoction
H. ambavilla	3.4	354	353		Chlorogenic acid isomer	63.6 ± 0.2	0.40 ± 0.3	0.74 ± 0.01	0.51 ± 0.00	0.71 ± 0.01	1.21 ± 0.02
	3.6	370	369		Unidentified	/	/	/	/	/	/
	3.9	354	353		Chlorogenic acid	1337.9 ± 5.5	7.18 ± 0.11	8.02 ± 0.21	10.98 ± 0.04	12.71 ± 0.19	13.06 ± 0.34
	5.0	610	609		Quercetin-hexose-rhamnose	369.8 ± 4.4	0.54 ± 0.01	0.64 ± 0.01	2.95 ± 0.04	0.6 ± 0.02	1.04 ± 0.02
	5.2	464	463		Quercetin-hexose	2473.5 ± 10.5	9.68 ± 0.03	11.43 ± 0.08	19.71 ± 0.08	17.13 ± 0.06	18.61 ± 0.13
	(5.4; 5.7; 5.8)	516	515		Di-caffeoyl quinic acid isomers	4876.5 ± 24.7	23.34 ± 0.15	25.34 ± 0.20	38.85 ± 0.20	41.31 ± 0.27	41.27 ± 0.32
	5.8	682	681		Di-O-caffeoyl-O-[(hydroxy-oxocyclohe-dienyl)acetyl] quinic acid + hydroxy	930.5 ± 13.9	4.34 ± 0.13	17.50 ± 0.32	7.41 ± 0.11	7.68 ± 0.23	6.37 ± 0.26
	(6.3; 6.6)	666	665		Di-O-caffeoyl-O-[(hydroxy-oxocyclohe-dienyl)acetyl] quinic acid isomers	2280.8 ± 2.7	10.13 ± 0.16	10.24 ± 0.03	18.17 ± 0.02	17.93 ± 0.28	16.68 ± 0.06
	7.0	650	649		Di-O-caffeoyl-O-[(hydroxyphenyl)acetyl] quinic acid	178.0 ± 1.1	0.88 ± 0.01	1.08 ± 0.01	1.42 ± 0.01	1.56 ± 0.02	1.76 ± 0.02
A. triplinervis	(2.6; 2.9; 3.0; 3.2; 3.5)	372	371		Caffeoyl glucarate isomers	58.6 ± 0.43	1.351 ± 0.008	1.359 ± 0.006	3.47 ± 0.03	12.55 ± 0.08	13.17 ± 0.07
	4.3	534	533		Di-caffeoyl glucarate	69.7 ± 0.6	1.251 ± 0.033	1.312 ± 0.003	4.13 ± 0.04	11.62 ± 0.31	12.72 ± 0.03
	5.0	610 356	609 355		Quercetin-hexose-rhamnose or feruoyl hexose	478.8 ± 2.0	2.649 ± 0.009	2.472 ± 0.046	28.37 ± 0.12	24.61 ± 0.08	23.97 ± 0.45
	5.2	464	463		Quercetin hexose	192.9 ± 2.8	1.121 ± 0.015	1.205 ± 0.011	11.43 ± 0.17	10.42 ± 0.14	11.68 ± 0.11
	5.5	550	549		Quercetin-hexose-malonate	232.7 ± 1.7	1.303 ± 0.007	0.997 ± 0.034	13.79 ± 0.10	12.11 ± 0.07	9.67 ± 0.33
	6.0	696	695		Tri-caffeoyl glucarate	212.6 ± 4.4	1.246 ± 0.023	1.278 ± 0.013	12.60 ± 0.26	11.58 ± 0.21	12.39 ± 0.13
	6.4	194	193		Isoferulic acid or thymohydroquinone dimethyl ether	189.05 ± 0.5	0.898 ± 0.018	0.799 ± 0.018	11.20 ± 0.03	8.34 ± 0.17	7.75 ± 0.17
	10.5	/	/	/	Unidentified	/	/	/	/	/	/
	6.9	190		191	Ayapin	31.1 ± 0.4	0.132 ± 0.006	0.122 ± 0.001	1.84 ± 0.02	1.23 ± 0.06	1.18 ± 0.01
	7.5	176		177	Herniarin	222.3 ± 0.7	0.707 ± 0.015	0.671 ± 0.004	13.17 ± 0.04	6.57 ± 0.14	6.51 ± 0.04
D. viscosa	(2.6; 3.0; 3.2; 3.5)	372	371		Caffeoyl glucarate isomers	47 ± 0.15	0.759 ± 0.002	1.434 ± 0.003	1.43 ± 0.00	4.54 ± 0.01	4.15 ± 0.02
	3.4	354	353		Chlorogenic acid isomer	47.9 ± 0.6	0.331 ± 0.005	0.480 ± 0.003	1.45 ± 0.02	1.98 ± 0.03	2.66 ± 0.02
	(3.7; 3.8; 4.8)	1152	1151		Procyanidin tetramer type A isomers	646.3 ± 2.47	4.538 ± 0.034	5.002 ± 0.049	19.59 ± 0.08	27.15 ± 0.21	27.73 ± 0.27
	4.0	354	353		Chlorogenic acid	186.2 ± 2.9	0.888 ± 0.017	0.733 ± 0.008	5.64 ± 0.09	5.31 ± 0.10	4.06 ± 0.04
	4.3	578	577		Procyanidin dimer type B	548.5 ± 5.4	2.431 ± 0.035	2.354 ± 0.096	16.63 ± 0.16	14.54 ± 0.21	13.05 ± 0.53
	4.5	290	289		Catechin or epicatechin	388.0 ± 8.7	1.112 ± 0.025	1.118 ± 0.010	11.76 ± 0.26	6.65 ± 0.15	6.20 ± 0.06
	4.5	338	337		Coumaroyl quinic acid	105.3 ± 2.5	0.449 ± 0.009	3.557 ± 0.044	3.19 ± 0.08	2.69 ± 0.05	2.64 ± 0.08
	(4.6; 5.0)	864	863		Procyanidin trimer type A isomers	988.9 ± 6.25	4.389 ± 0.021	5.085 ± 0.05	29.98 ± 0.19	26.25 ± 0.13	28.19 ± 0.27
	5.0	610	609		Quercetin-hexose-rhamnose	59.8 ± 0.9	0.307 ± 0.005	0.329 ± 0.004	1.81 ± 0.03	1.84 ± 0.03	1.82 ± 0.02
	5.3	478	477		Quercetin-glucuronide	30.9 ± 0.5	0.173 ± 0.002	0.197 ± 0.001	0.94 ± 0.02	1.03 ± 0.01	1.09 ± 0.01
	5.4	624	623		Isorhamnetin-hexose-rhamnose	175.4 ± 1.15	0.881 ± 0.010	0.991 ± 0.005	5.86 ± 0.03	5.26 ± 0.06	5.49 ± 0.02
	5.7	492	491		Isorhamnetin-glucuronide	74.3 ± 0.9	0.464 ± 0.007	0.525 ± 0.005	2.25 ± 0.03	2.77 ± 0.04	2.91 ± 0.03
	(8.2; 9.3; 9.5; 9.6; 9.7; 10.7; 10.9)	(416; 330; 454; 484; 398; 436; 466)	(415; 329; 453; 483; 397; 435; 465)		Unidentified	/	/	/	/	/	/

Table 2. *Cont.*

Plant	Retention Time (min)	Molecular Weight (Da)	$[M-H]^-$/ $[M-H]^{2-}$	$[M-H]^+$	Assigned Identity	Content in µg/mL			% of Total Composition		
						Extract	Infusion	Decoction	Extract	Infusion	Decoction
A. theiformis	3.5	584	583		Neomangiferin	243.1 ± 0.5	1.56 ± 0.02	1.93 ± 0.030	3.59 ± 0.01	2.76 ± 0.35	2.56 ± 0.04
	3.9	408	407		Iriflophenone-C-hexoside	/	/	/	/	/	/
	4.2	422	421		Mangiferin	6488.6 ± 27.0	54.9 ± 0.10	73.4 ± 0.30	95.71 ± 0.40	97.24 ± 0.18	97.23 ± 0.40
	(4.4; 4.9)	436	435		Homomangiferin or O-methylisomangiferin isomers	47.6 ± 0.85	/	0.16 ± 0.01	0.71 ± 0.01	/	0.21 ± 0.00
	5.2	452	451		Aspalatin	/	/	/	/	/	/
H. lanceolatum	3.4	354	353		Chlorogenic acid isomer	598.2 ± 7.0	4.36 ± 0.04	4.11 ± 0.06	3.70 ± 0.04	4.06 ± 0.04	3.71 ± 0.05
	3.9	354	353		Chlorogenic acid	7022.3 ± 11.3	54.54 ± 0.27	53.17 ± 0.21	43.47 ± 0.07	50.78 ± 0.25	47.94 ± 0.19
	4.3	578	577		Procyanidin dimer type B	669.1 ± 21.9	3.56 ± 0.26	4.33 ± 0.22	4.14 ± 0.14	3.31 ± 0.24	3.90 ± 0.20
	4.4	180	179		Caffeic acid	240.5 ± 4.5	1.30 ± 0.02	2.82 ± 0.07	1.49 ± 0.03	1.21 ± 0.02	2.54 ± 0.06
	4.6	866	865		Procyanidin trimer type B	642.3 ± 9.8	3.09 ± 0.29	3.51 ± 0.07	3.98 ± 0.06	2.88 ± 0.27	3.17 ± 0.06
	4.8	1154	1153		Procyanidin tetramer type B	497.8 ± 29.6	2.36 ± 0.10	2.18 ± 0.16	3.08 ± 0.18	2.20 ± 0.09	1.97 ± 0.14
	5.0	610	609		Quercetin-hexose-rhamnose	197.1 ± 1.7	1.16 ± 0.03	1.17 ± 0.04	1.22 ± 0.10	1.08 ± 0.03	1.06 ± 0.04
	(5.2; 5.3)	464	463		Quercetin-hexose isomers	1041.8 ± 2.35	6.13 ± 0.03	6.90 ± 0.04	6.45 ± 0.02	5.71 ± 0.04	6.22 ± 0.05
	5.5	550	549		Quercetin-malonate-hexose	747.2 ± 7.1	3.75 ± 0.04	3.52 ± 0.07	4.62 ± 0.04	3.49 ± 0.04	3.17 ± 0.06
	5.7	448	447		Quercetin-rhamnose	427.8 ± 4.9	2.10 ± 0.03	2.36 ± 0.02	2.65 ± 0.03	1.96 ± 0.03	2.13 ± 0.02
	(5.7; 5.9)	516	515		Di-caffeoyl quinic acid isomers	3440.3 ± 19.4	21.61 ± 0.12	23.00 ± 0.1	21.3 ± 0.24	20.12 ± 0.11	20.74 ± 0.09
	6.0	520	519		Isorhamnetin-acetyl-hexose	38.1 ± 0.5	0.16 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.00	0.15 ± 0.01	0.19 ± 0.01
	6.2	500	499		Caffoyl coumaroyl quinic acid	252.6 ± 7.3	1.50 ± 0.05	1.70 ± 0.01	1.56 ± 0.05	1.40 ± 0.05	1.53 ± 0.01
	6.4	530	529		Feruoyl caffeoyl quinic acid	153.7 ± 3.5	0.87 ± 0.01	0.99 ± 0.03	0.95 ± 0.02	0.81 ± 0.01	0.89 ± 0.03
	7.1	302	301		Quercetin	187.4 ± 8.7	0.92 ± 0.01	0.93 ± 0.03	1.16 ± 0.05	0.01 ± 0.01	0.84 ± 0.03
P. x graveolens	(2.9; 3.5)	372	371		Caffeoyl glucarate isomers	28.2 ± 0.75	0.227 ± 0.004	0.146 ± 0.003	1.73 ± 0.05	2.41 ± 0.04	1.88 ± 0.04
	4.5	612	611		Myricetin derivatives	41.4 ± 1.1	0.198 ± 0.006	0.153 ± 0.005	2.55 ± 0.07	2.10 ± 0.06	1.97 ± 0.06
	4.7	626	625		Myricetin-rhamnose-hexose	55.9 ± 1.1	0.263 ± 0.008	0.220 ± 0.005	3.44 ± 0.07	2.79 ± 0.08	2.83 ± 0.06
	4.8	480	479		Myricetin-hexose	103.6 ± 0.9	0.520 ± 0.005	0.425 ± 0.011	6.37 ± 0.06	5.51 ± 0.05	5.47 ± 0.14
	4.9	596	595		Quercetin-pentose-hexose	268.3 ± 2.1	1.574 ± 0.019	1.312 ± 0.010	16.51 ± 0.13	16.69 ± 0.20	16.87 ± 0.13
	5.1	610	609		Quercetin-hexose-rhamnose	122.3 ± 2.2	0.761 ± 0.008	0.636 ± 0.002	7.52 ± 0.14	8.07 ± 0.08	8.18 ± 0.03
	5.1	450	449		Myricetin-pentose	43.4 ± 1.3	0.184 ± 0.009	0.150 ± 0.002	2.67 ± 0.08	1.95 ± 0.10	1.93 ± 0.03
	5.2	464	463		Myricetin-rhamnose	91.1 ± 0.7	0.456 ± 0.009	0.381 ± 0.004	5.60 ± 0.04	4.84 ± 0.10	4.90 ± 0.05
	(5.2; 5.3)	464	463		Quercetin-hexose isomers	513.6 ± 2.9	3.058 ± 0.006	2.558 ± 0.009	31.6 ± 0.18	32.43 ± 0.06	32.9 ± 0.12
	5.4	594	593		Kaempferol-hexose-rhamnose	16.4 ± 0.4	0.089 ± 0.002	0.067 ± 0.005	1.01 ± 0.02	0.94 ± 0.02	0.86 ± 0.06
	(5.5; 5.6)	448	447		Kaempferol-hexose isomers	112.4 ± 0.8	0.655 ± 0.004	0.534 ± 0.004	5.07 ± 0.00	6.95 ± 0.04	6.87 ± 0.05
	5.5	434	433		Quercetin pentose	189.2 ± 2.9	1.092 ± 0.010	0.877 ± 0.004	11.64 ± 0.18	11.58 ± 0.11	11.28 ± 0.05
	5.8	418	417		Kaempferol-pentose	44.6 ± 0.6	0.252 ± 0.003	0.201 ± 0.003	2.74 ± 0.04	2.67 ± 0.03	2.58 ± 0.04
	6.2	318	317		Myricetin	/	/	/	/	/	/
	7.1	302	301		Quercetin	19.3 ± 0.4	0.090 ± 0.002	0.101 ± 0.002	1.19 ± 0.02	0.95 ± 0.02	1.30 ± 0.03
	7.7	286	285		Kaempferol	5.8 ± 0.2	0.011 ± 0.001	0.015 ± 0.001	0.36 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.19 ± 0.01

Table 2. *Cont.*

Plant	Retention Time (min)	Molecular Weight (Da)	$[M-H]^-$/ $[M-H]^{2-}$	$[M-H]^+$	Assigned Identity	Content in µg/mL			% of Total Composition		
						Extract	Infusion	Decoction	Extract	Infusion	Decoction
S. cumini	2.4	170	169		Gallic acid	210.7 ± 6.8	1.931 ± 0.039	6.351 ± 0.084	19.54 ± 0.63	21.03 ± 0.42	27.82 ± 0.37
	(2.5; 2.9)	634	633		HHDP-galloyl-hexose isomers	59.5 ± 0.8	1.025 ± 0.016	2.969 ± 0.021	5.52 ± 0.07	11.16 ± 0.18	13.01 ± 0.18
	2.6	484	483		Di-galloyl-hexose	7.7 ± 0.3	0.090 ± 0.002	0.143 ± 0.003	0.71 ± 0.03	0.98 ± 0.02	0.63 ± 0.01
	3.0	934 484	933/466 483		Vescalagin/di-galloyl-hexose	30.8 ± 0.7	0.255 ± 0.014	0.533 ± 0.009	2.86 ± 0.06	2.78 ± 0.15	2.33 ± 0.04
	(3.2; 3.7; 4.2; 4.5)	784	783		Bis-HHDP-hexose isomers	63.1 ± 0.7	0.720 ± 0.006	1.253 ± 0.015	5.85 ± 0.06	3.14 ± 0.02	1.41 ± 0.03
	(3.2; 3.6)	802	801		Galloyl tannin isomers	53.1 ± 0.9	0.775 ± 0.010	2.583 ± 0.023	4.92 ± 0.08	8.44 ± 0.11	11.32 ± 0.11
	3.4	934 1418	933/466 1417/708		Castalagin/ellagitannin	50.7 ± 0.7	0.623 ± 0.007	0.968 ± 0.029	4.70 ± 0.06	6.79 ± 0.08	4.24 ± 0.013
	3.9	952 1418	951 1417/708		Trisgalloyl-HHDP-hexose/ellagitannin	53.7 ± 1.7	0.420 ± 0.009	0.662 ± 0.027	4.98 ± 0.16	4.57 ± 0.10	2.90 ± 0.12
	4.0	1086	1085		Digalloyl-Gallagyl-hexose	97.2 ± 0.85	0.802 ± 0.008	1.511 ± 0.013	9.01 ± 0.08	5.29 ± 0.13	4.18 ± 0.07
	4.3	952	951		Trisgalloyl-HHDP-hexose	51.7 ± 2.3	0.370 ± 0.017	0.814 ± 0.035	4.79 ± 0.21	4.03 ± 0.19	3.57 ± 0.15
	(4.8; 5.0)	434	433		Ellagic acid -pentose isomers	209.1 ± 2.8	1.086 ± 0.017	2.039 ± 0.033	19.39 ± 0.26	4.77 ± 0.10	3.86 ± 0.19
	5.2	302	301		Ellagic acid	191.0 ± 3.5	1.083 ± 0.038	3.005 ± 0.072	17.71 ± 0.32	11.79 ± 0.41	13.16 ± 0.32
P. mauritianum	5.3	464	463		Quercetin-hexose	166.4 ± 6.6	0.796 ± 0.026	1.235 ± 0.026	21.74 ± 0.86	25.43 ± 0.83	32.85 ± 0.69
	5.7	448	447		Kaempferol-hexose	274.9 ± 10.6	1.094 ± 0.035	1.208 ± 0.053	35.91 ± 1.38	34.95 ± 1.12	32.13 ± 1.41
	6.1	506	505		Quercetin-acetyl- hexose	66.7 ± 3.9	0.256 ± 0.003	0.283 ± 0.015	8.71 ± 0.51	8.18 ± 0.10	7.53 ± 0.40
	6.4	490	489		Kaempferol-acetyl-hexose	165.3 ± 7.9	0.634 ± 0.012	0.662 ± 0.002	21.59 ± 1.03	20.26 ± 0.38	17.61 ± 0.59
	6.9	460	459		Kaempferol-acetyl-pentose	13.2 ± 0.4	0.039 ± 0.002	0.042 ± 0.002	1.72 ± 0.05	1.25 ± 0.06	1.12 ± 0.05
	7.0	474	473		Kaempferol-acetyl-rhamnose	49.6 ± 1.0	0.219 ± 0.005	0.230 ± 0.002	6.48 ± 0.13	7 ± 0.16	6.12 ± 0.06
	7.7	286	285		Kaempferol	29.4 ± 1.5	0.092 ± 0.006	0.100 ± 0.005	3.84 ± 0.20	2.94 ± 0.19	2.66 ± 0.13
	8.8	488	487		Asiatic acid	/	/	/	/	/	/
	(9.2; 10.3)	(238; 266)	(237; 265)		Unidentified	/	/	/	/	/	/

Polyphenol composition was different depending on the plant considered. *A. theiformis* contained almost exclusively mangiferin and its derivatives as reported by Dantu et al. [34]. This polyphenol, widely contained in mangos, is known to exert antioxidant activity and to inhibit both glucose uptake and carbohydrate metabolism enzymes such as α-glucosidase and β-glucosidase [35,36]. The presence of this polyphenol supports the use of *A. theiformis* for its antidiabetic properties in traditional medicine. *A. triplinervis* contains a majority of quercetin glycosides but also specific polyphenols such as ayapin, ayapanin and thymohydroquinone dimethyl ether, as previously described in the literature [37]. High concentrations of catechin, procyanidin, quercetin, isorhamnetin and coumaroyl quinic acid were found in *D. viscosa*. These polyphenols are mostly flavonoids, recognized for their antioxidant and anti-inflammatory properties [21,38]. Chlorogenic acid, quercetin hexoses and di-caffeoyl quinic acid derivatives were detected in *H. ambavilla*. Hydroxybenzoic acids contained in *H. ambavilla* also have an antioxidant and healing potential [14]. Two major types of polyphenols were identified in *H. lanceolatum*: phenolic acids such as chlorogenic acid and di-caffeoyl quinic acid and two types of flavonoid represented by quercetin hexoses and procyanidin isomers. For *P. x graveolens*, polyphenols such as caffeoyl glucarate, myricetin, quercetin and kaempferol hexoses were identified. Similarly, most of the identified polyphenols in *D. viscosa* belong to the flavonoid family. *S. cumini* seed powder extracts exhibited the higher polyphenol content mainly represented by ellagitannins; vescalagin, castalagin, galloyl-hexoses, HHDP-hexose, galloyl tannin and ellagic acid were detected. This result highlights differences in polyphenol composition between fruit seeds, skin and pulp; indeed, Tavares et.al showed that *S. cumini* skin and pulp mainly contain anthocyanins, flavonols and flavanonols [39]. Finally, *P. mauritianum* extracts contained quercetin hexoses, kaempferol derivatives and also asiatic acid. Interestingly, corosolic acid identified by Rangasamy et al. was not detected in our experimental conditions [40]. This difference may be due to different environmental conditions (temperature, altitude, biotope).

The main biological activities reported in the literature for the different compound identified in our eight plant extracts are presented in the Table S2.

Our study shows that the identified polyphenolic compounds are frequently found in human diet and medicinal plants [13,41] and are known for their bioactivity [10,15,42].

Interestingly, UPLC-MS analysis led to the detection of a wide range of polyphenols in infusions and decoctions that may constitute the basis of their bioactivity. Indeed, these components, such as quercetin, chlorogenic acid, gallic acid and kaempferol, that represent about 20 to 40% of the total polyphenol composition of *H. lanceolatum*, *P. x graveolens*, *S. cumini* and *P. mauritianum* are known to exert an antioxidant activity, for example, by limiting ROS production. As reported in detail in Table S2, most of the compounds detected and identified by mass spectrometry have already been described in the literature for their antioxidant and/or anti-inflammatory bioactivity. Another example is the composition of *A. theiformis* extracts; it has been shown that mangiferin and its metabolites represent more than 95% of the total polyphenol content. Mangiferin may be responsible for *A. theiformis* antidiabetic and cholesterol lowering effects traditionally reported for this medicinal plant. In fact, the bioactivity observed in medicinal plants results from the synergistical or individual action of the different components identified in aqueous extracts, and particularly polyphenols. Although our study is intended to test the bioactivity of these eight medicinal plants, our results underline the importance of studying the polyphenol contents of these extracts. The mode of preparation did not significantly impact the polyphenol qualitative composition and further investigations are needed to understand the mechanisms underlying plant bioactivity. (Table 2).

7. Impact of Infusion and Decoction Process on the Antioxidant Polyphenolic Contents

Data presented in Figure 1B show that polyphenol concentrations ranged from 25 to 143 mg acid gallic equivalent (GAE)/L for infusions and 35–219 mg GAE/L for decoctions. Interestingly, polyphenol contents of infusions and decoctions (1 g/L) are comparable to that of a chocolate beverage with milk, soy milk or pure pomelo juice [33]. This result suggests that significant amounts of polyphenols can be

extracted with water despite a low quantity of plant matrix (1 g/L). Indeed, plant infusions such as tea or medicinal plants can be prepared with more than 2 g of plant mash/L [43–45]. Statistical analysis shows an impact of the extraction process (infusion vs. decoction) on the total polyphenol content; indeed, for *A. theiformis, H. lanceolatum, S. cumini* and *P. mauritianum,* the decoction process yielded higher polyphenol contents. The difference of plant matrix immersion time and exposition at high temperature between the two modes of preparation can explain this result. Decoction process may allow the extraction of polyphenols from rigid tissues such as lignified tissues by promoting cell lysis.

7.1. Impact of Infusion and Decoction Process on Antioxidant Activity

7.1.1. DPPH Assay

The free-radical scavenging activity of medicinal plant infusions, decoctions and acetone extracts was evaluated by the DPPH reduction assay. Data presented in Figure 2 show the percentage of reduced DPPH in the presence of infusions, decoctions or PRE at different polyphenol final concentrations (Figure 2A–C).

The results illustrate a dose-dependent antioxidant activity. This antioxidant effect is the result of the radical scavenging by polyphenol reducing extremities (hydroxyl groups). As described by Villaño et al., polyphenols can exert antioxidant activity by direct abstraction of phenol H-atom with the nitrogen of the DPPH or by undergoing an electron transfer to the free radical. The number of -OH groups available is also an important factor that impacts the antioxidant activity [46]. Infusions and decoctions demonstrated higher antioxidant activity than observed for vitamin C (100 μM, used as positive control). Interestingly, at a final concentration of 25 μM GAE, *S. cumini* infusions, decoctions and PRE exerted the best free radical-scavenging activity reaching, respectively, 60.5 ± 4.1%, 55 ± 2.7% and 58.3 ± 0.2% (Figure 2D). Overall, the antioxidant capacity of the different medicinal plant infusions and decoctions, respectively, vary from 27.22 to 60.5% and from 28.5 to 55%, for a final concentration of GAE fixed at 25 μM. Our results underline that the antioxidant capacity of *S. cumini* and *P. mauritianum* infusions are close to that observed for tropical fruits cultivated in Reunion Island that exerted radical-scavenging activities showed to reduce by 45 to 58% DPPH oxidation [29]. For a fixed concentration of polyphenols, a trend towards an improved antioxidant capacity was observed for decoctions vs. infusions. Statistical significance was reached for *A. theiformis* and *H. lanceolatum* at 10 μM GAE and for *P. x graveolens* and *S. cumini* at 50 μM GAE ($p < 0.05$, data not shown).

In Figure 3, results are presented after normalization to the initial 1g/L concentration of dry plant powder diluted in water for infusion and decoction, reflecting the herbal tea that a customer would ingest. Significant differences between antioxidant activity of *H. ambavilla*, *A. triplinervis*, *D. viscosa* and *P. x graveolens* infusions vs. decoctions were observed when evaluated without normalization to polyphenol levels. This result can be linked to the differences of final polyphenol concentrations between infusions and decoctions. Other plant herbal extracts reached their maximal radical-scavenging activity.

These results are in accordance with the total polyphenol concentrations reported in Figure 1, suggesting that polyphenol account for most of the antioxidant activity of infusions and decoctions. For example, *A. triplinervis* has the lowest polyphenol content and also the lowest radical scavenging activity.

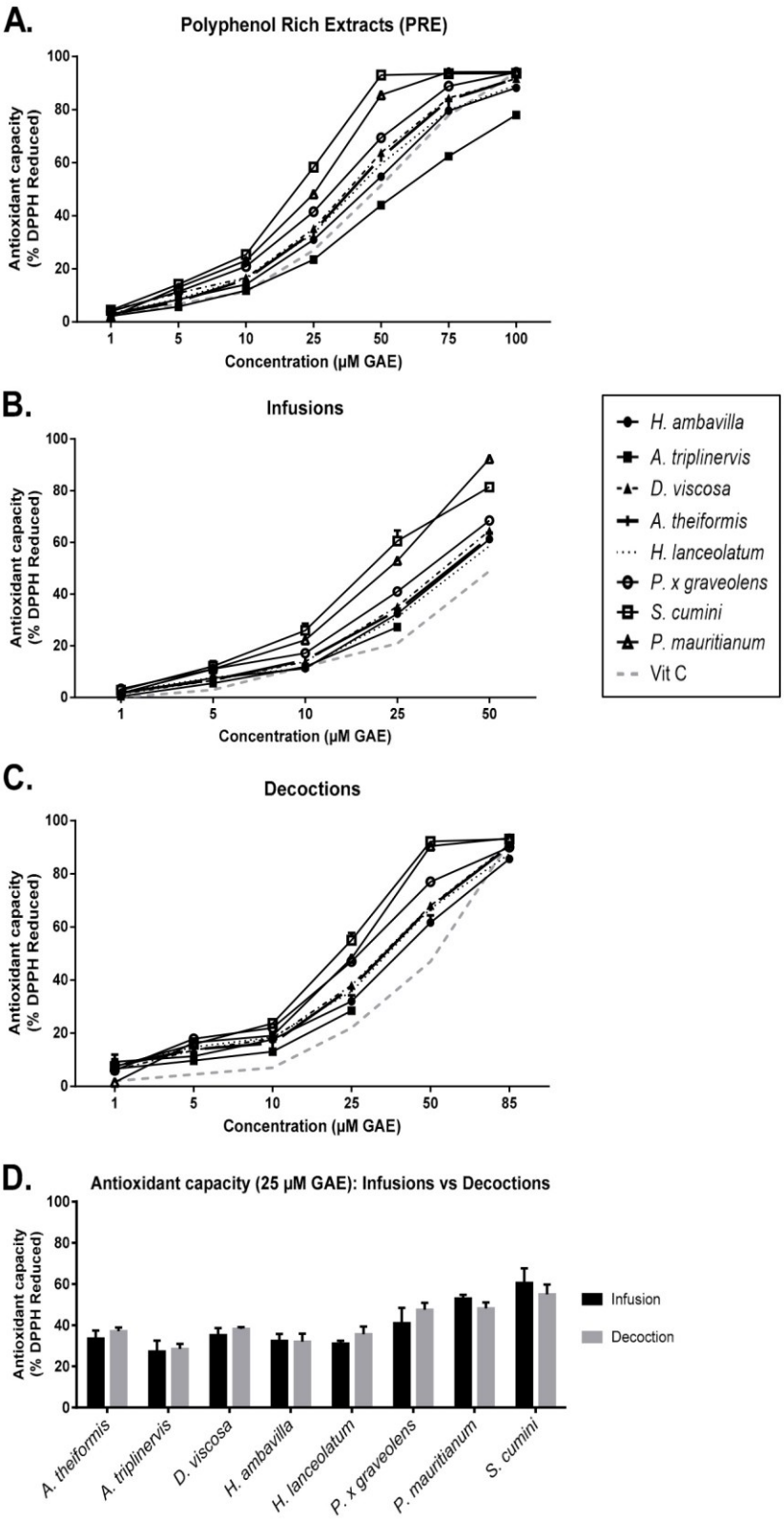


Figure 2. Antioxidant capacity of medicinal plant PRE, infusions and decoctions using DPPH assay after normalization to GAE. Dose-dependent antioxidant capacity of PRE (**A**), infusions (**B**) and decoctions (**C**) at different concentrations. (**D**) Antioxidant capacity of infusions versus decoctions at 25 µM GAE final concentration. The radical-scavenging activity was evaluated through the DPPH colorimetric method at 517 nm. Data are means ± SEM of three independent experiments.

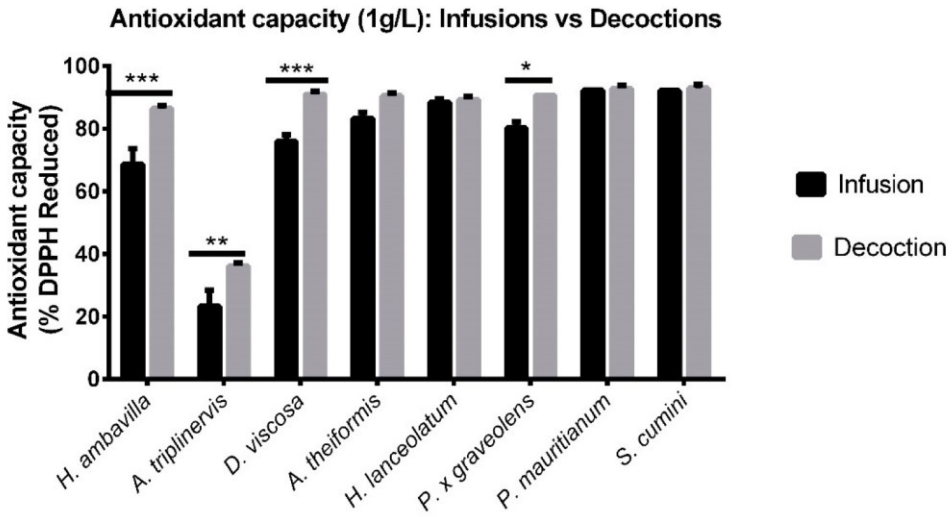


Figure 3. DPPH assay comparing infusion and decoction modes based on traditional preparation (1 g dry powder/L). Data are means ± SEM of three independent experiments. * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ as compared to decoctions.

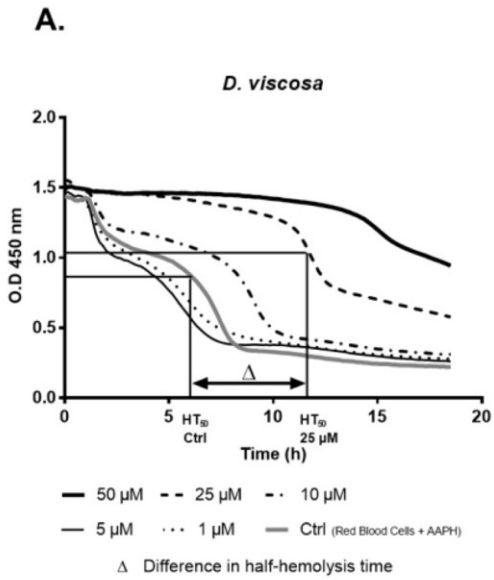
7.1.2. Evaluation of the Protective Effects of Medicinal Plant PRE, Infusions and Decoctions on Red Blood Cell Damage Induced by the Radical AAPH

Oxidative stress induces biomolecule damage and alters redox intracellular signaling. Several studies highlighted the protective effects of polyphenols against oxidative stress. On the one hand, protective effects of the polyphenols rely on their ability to improve cellular antioxidant response by promoting the Nrf2 pathway or by stimulating antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase (GPx), catalase or superoxide dismutase (SOD) [47]. On the other hand, the capacity of polyphenols to act as free-radical scavengers and electron donors give them a protective effect against oxidative stress [48]. Polyphenols prevent lipid peroxidation and cell membrane damage caused by oxidative stress [49,50].

Several reports emphasize on the use of medicinal plants and polyphenols to prevent oxidative stress damage notably in red blood cells [24,51–54]. Oxidative stress affects membrane stability and fluidity [55]. To reproduce the conditions of an oxidative stress, AAPH was added to purified human red blood cells. Interactions between red blood cell membrane polyunsaturated fatty acids and AAPH-derived free radicals leads to membrane rupture and eventually hemolysis (detectable through a progressive decrease in optical density at 450 nm) [56]. In our study, the ability of plant preparations to protect red blood cells against oxidative stress was assessed by performing a hemolysis inhibition test.

Red blood cells exposed to oxidative stress in the presence of infusions, decoctions or PRE, presented a higher half-hemolysis time. Moreover, the half-hemolysis time was different according to the plant, the preparation mode and the final polyphenol concentration (Figure 4).

It is important to note that PRE exert high protective effects at 25 μM by increasing the HT50 from 8.01 ± 0.16 h (for *H. ambavilla*) to 11.72 ± 0.12 h (for *D. viscosa*). As previously reported, polyphenols may prevent hemolysis and thus increase red blood cell half-life [24,26]. As presented in Figure 4, at a final concentration of 25 μM GAE, half-hemolysis time was prolonged from 2.9 ± 0.2 h to 6.9 ± 0.1 h for the infusions, from 2.3 ± 0.2 h to 5.8 ± 0.1 h for the decoctions and from 1.5 ± 0.2 h to 5.2 ± 0.1 h for the PRE. Our results suggest that, whatever the mode of extraction, polyphenols exert a protective effect on red blood cell damage induced by AAPH. Interestingly, infusions of *D. viscosa*, *H. lanceolatum*, *P. x graveolens* and *S. cumini* have a higher protective effect than decoctions.



B.

Δ Difference in half-hemolysis time (h) in presence of medicinal plant preparations (25 µM) as compared to control			
Medicinal plant	**PRE**	**Infusion**	**Decoction**
H. ambavilla	1.53 ± 0.17	2.90 ± 0.23	2.64 ± 0.30
A. triplinervis	2.5 ± 0.16	3.42 ± 0.12	2.87 ± 0.07
D. viscosa	5.24 ± 0.12	6.98 ± 0.17 **	5.81 ± 0.09
A. theiformis	2.12 ± 0.21	3.53 ± 0.19	2.90 ± 0.20
H. lanceolatum	3.94 ± 0.30	3.77 ± 0.33 **	2.61 ± 0.48
P. x graveolens	3.79 ± 0.18	6.35 ± 0.32 **	5.14 ± 0.14
P. mauritianum	2.83 ± 0.23	3.16 ± 0.29	2.33 ± 0.18
S. cumini	3.48 ± 0.12	5.25 ± 0.16 ***	2.85 ± 0.12

Figure 4. Effect of medicinal plant preparation on the half-time hemolysis (HT50) of red blood cells. Red blood cell hemolysis was induced by AAPH. Optical density at 450 nm was measured every 3 min for 18.5 h. The decrease in optical density indicated the progression of hemolysis. (**A**) Example of hemolysis kinetics when red blood cells where co-incubated with AAPH free-radical and *D viscosa* infusions at different polyphenol final concentrations. (**B**) Table summarizing the delayed red blood cell half-hemolysis time (h) in the presence of medicinal plant preparations (25 µM) depending on extraction mode. Data are means ± SEM of three independent experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ as compared to decoctions.

7.2. Impact of Medicinal Plant Preparations on 3T3-L1 Preadipocytes

Preadipocytes are the base of adipose tissue expansion and function; they enable energy storage by differentiation mechanisms [57]. Protecting preadipocytes from oxidative stress is a major issue to preserve their functionality and to avoid metabolic disorders such as insulin resistance.

7.2.1. Evaluation of the Impact of Medicinal Plant Preparations on Cell Viability

As described in the literature, medicinal plant extracts may have an impact on cell viability and/or proliferation [58,59]. Before analyzing the protective effect that medicinal plants could exert on 3T3-L1 preadipocytes exposed to oxidative stress, we checked for their potential impact on cell viability and proliferation.

As shown in Figure 5, PRE, infusions and decoctions did not have any significant impact on cell necrosis at physiological (10 µM) and supraphysiological (25–50 µM) concentrations. The percentage of viable cells relative to controls assessed by neutral red assay did not show any impact of plant preparations on mortality or cell proliferation. At the doses tested (10–50 µM), our results showed that PRE, infusions and decoctions were not cytotoxic and did not induce proliferation (Figure 5, Figure 6).

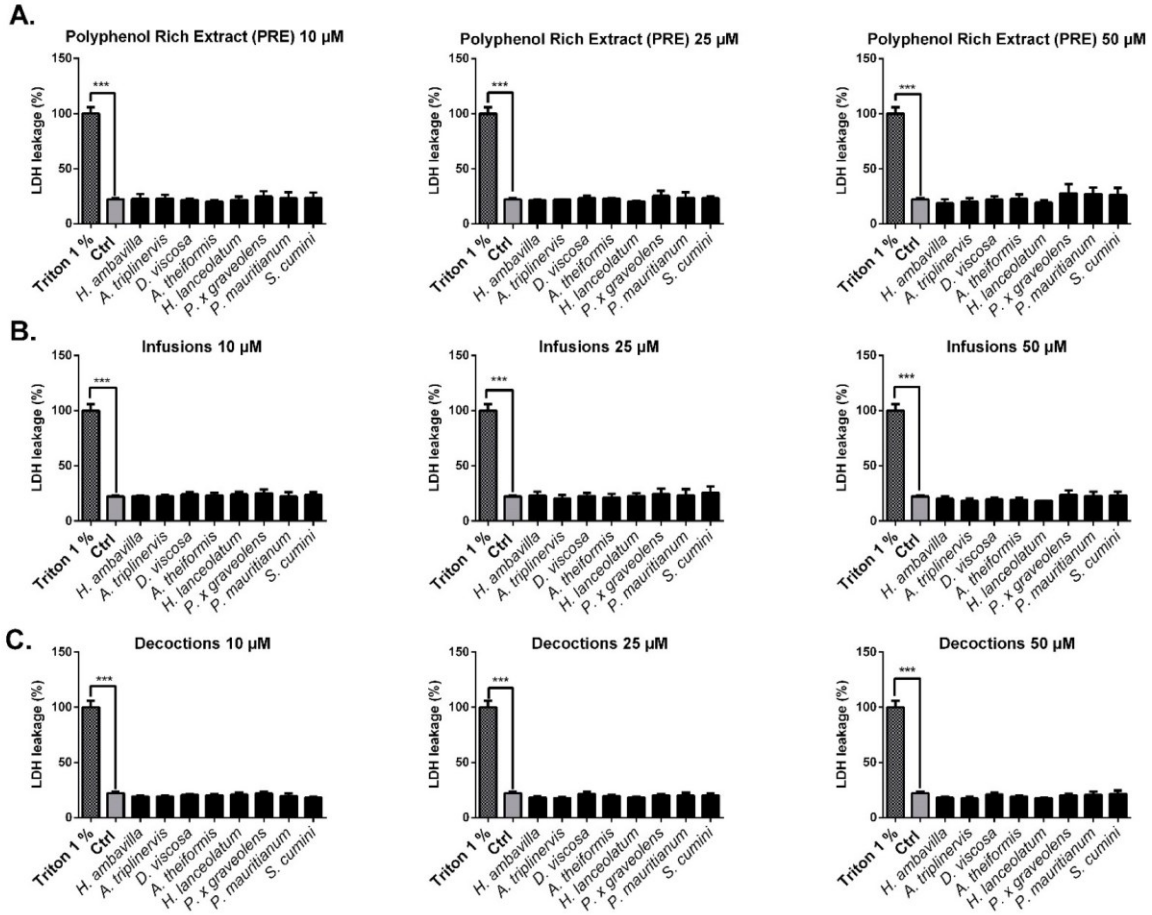


Figure 5. Impact of medicinal plant preparations on 3T3-L1 preadipocytes necrosis. 3T3-L1 preadipocytes were incubated for 24h with polyphenol-rich extracts (PRE) (**A**), infusions (**B**) and decoctions (**C**). LDH release (%) was measured in the supernatant. Triton X100 (1%) was used to induce cell necrosis (considered as 100% necrosis). Absorbance was read at 450 nm. The data shown are means ± SEM of three independent experiments *** $p < 0.005$ as compared to control. LDH: lactate dehydrogenase (an intracellular enzyme whose release into the extracellular medium reflects cell necrosis).

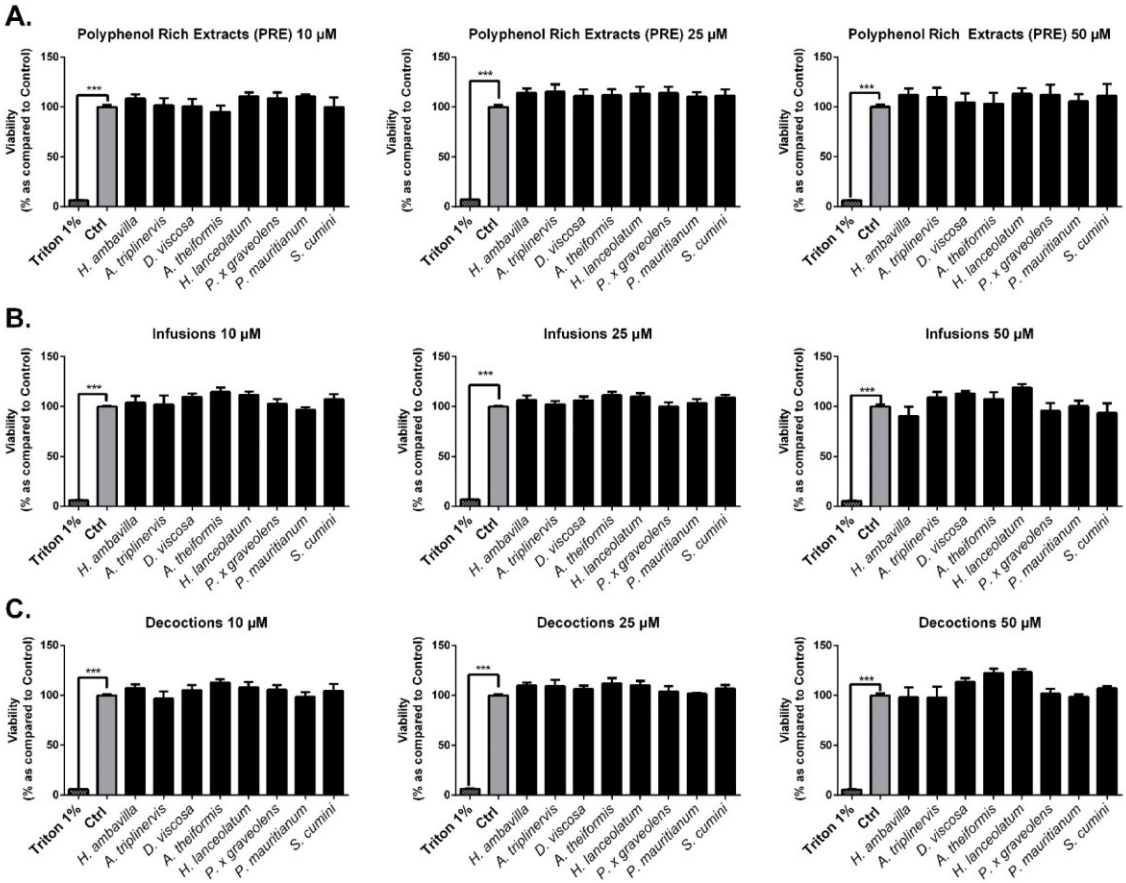


Figure 6. Effects of medicinal plant preparations on 3T3-L1 viability and proliferation. 3T3-L1 preadipocytes were incubated with different medicinal plant extracts: PRE (**A**), infusions (**B**) and decoctions (**C**). Viability (% Control) was assessed by the neutral red method. Triton X100 (1%) was used to induce cell necrosis. Results are presented as means ± SEM of three independent experiments *** $p < 0.005$ as compared to control (Ctrl).

7.2.2. Evaluation of the Protective Effect of Medicinal Plant PRE, Infusions and Decoctions on 3T3-L1 Preadipocyte Intracellular Oxidative Stress in Response to H_2O_2

Oxidative stress plays a major role on cell dysfunction. As reported by Sies, high concentrations of hydrogen peroxide can lead to oxidative stress and DNA, protein and lipid damage [60]. ROS production is associated with important biomolecule and cell damage [61]. Medicinal plant ability to prevent oxidative stress may allow a control of metabolic disturbances by reducing cell damage and by limiting the onset of chronic, low-grade inflammation [4,7,61].

As shown in Figure 7, medicinal plant PRE, infusions and decoctions did not have a significant impact on 3T3-L1 preadipocyte intracellular oxidative stress in basal conditions.

However, results highlight the protective effects of medicinal plants against oxidative stress induced by H_2O_2. This protective effect is more pronounced at 25 µM. Unexpectedly, only a few PRE displayed a significant protective effect at this concentration despite their higher polyphenol diversity as compared to infusions and decoctions. This suggests that the bioavailability of polyphenols contained in PRE and water-based extractions is different, being more efficient for infusions and decoctions. Moreover, the comparative analysis between infusions and decoctions did not reveal any significant difference that could be due to the preparation mode; both significantly reduced the intracellular ROS production to the basal level, for all plant tested (Figure S1). It should also be noted that a protective effect has been observed for most of infusions and decoctions even at a low concentration of 10 µM: *H. ambavilla*, *D. viscosa*, *A. theiformis* infusions and *H. ambavilla*, *D. viscosa*, *A. theiformis*, *P. x graveolens*, *S.*

cumini and *P. mauritianum* decoctions to totally inhibit ROS production induced by H_2O_2 at 10 μM GAE. These results point out the importance of the antioxidant activity of medicinal plant bioactive compounds that are known to exert peroxide inactivation leading to a protective effect on oxidative stress damages (mitochondrial stress, activation of redox signaling, cell death) [60,62].

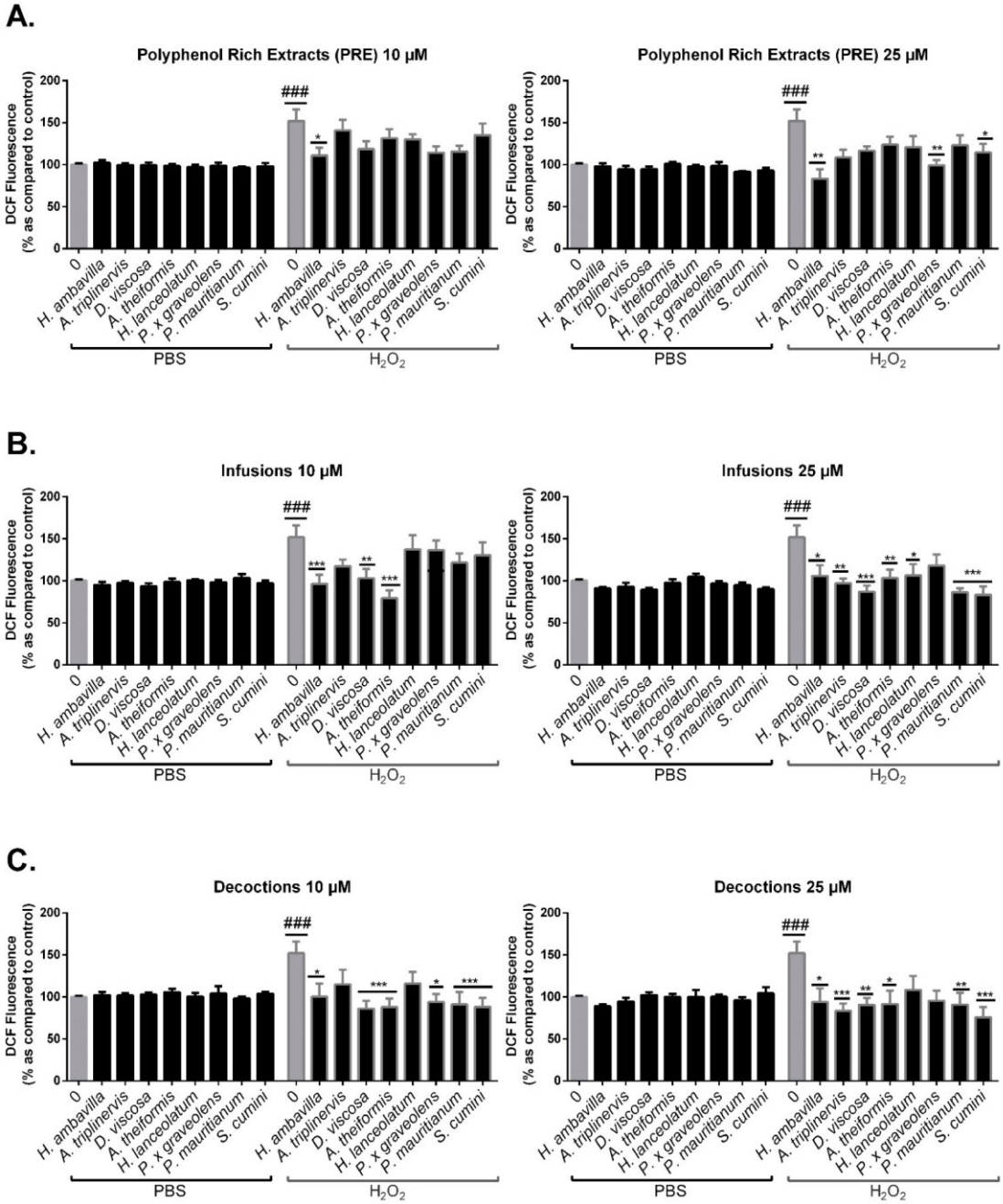


Figure 7. Effects of medicinal plant preparations on intracellular oxidative stress of preadipocytes exposed to H_2O_2. 3T3-L1 preadipocytes were incubated for 24 h with PBS, polyphenol-rich extracts (PRE) (**A**), infusions (**B**) and decoctions (**C**) at different concentrations (10–25 μM). DCF fluorescence was measured after 45 min of incubation with 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), followed by 1 h of incubation with PBS ± of H_2O_2 (200 μM). Data shown are means ± SEM of three independent experiments. ### $p < 0.005$ as compared to PBS alone (left histograms) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ as compared to controls (PBS alone, left histograms or H_2O_2, right histograms).

8. Conclusions

Medicinal plants from Reunion Island represent an interesting nutritional approach for the prevention or treatment of metabolic disorders resulting from oxidative stress and inflammation. First, medicinal plants preparations contain a large amount of bioactive polyphenols that enable them to exert an important antioxidant activity. This has been evidenced by the ability of herbal preparations to scavenge DPPH and AAPH radicals. Second, medicinal plant preparations showed protective effects on preadipocyte intracellular oxidative stress production subjected to H_2O_2 stimulation.

The preparation mode did not have a significant impact on the medicinal plant protective effects except for red blood cell lysis where infusions were significantly more efficient than decoctions. One limitation of our study is that we analyzed plant extracts, which implies a mixture of several antioxidant compounds at different concentrations acting alone or in synergy. Further investigations would be needed to investigate the individual contribution of each component to the global antioxidant activity. In addition, depending on environmental conditions, industrial process (drying, milling, conditioning) and extraction method, the composition of plant herbal tea may slightly vary from one preparation method to another, but the main components and biological function should be globally similar.

These results scientifically support the potential of the traditional use of Reunion Island medicinal plant preparations (infusions or decoctions) for limiting oxidative stress, involved in metabolic disorders and associated complications.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/2076-3921/9/10/959/s1.

Author Contributions: Conceptualization, O.M., F.R. and C.R.-D.S.; methodology, O.M., E.C. and C.R.-D.S.; validation, O.M., F.R. and C.R.-D.S.; formal analysis, E.C., O.M., and C.R.-D.S.; investigation, E.C.; resources, F.R. and O.M.; data curation, E.C., O.M., and C.R.-D.S.; writing—original draft preparation, E.C. and O.M.; writing—review and editing, E.C., O.M., and C.R.-D.S.; visualization, E.C., O.M., F.R. and C.R.-D.S.; supervision, E.C., O.M., and C.R.-D.S.; funding acquisition, O.M., and F.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by FEDER RE0001897 (EU—Région Réunion—French State national counterpart), as well as the BIOST Fédération.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge HABEMUS PAPAM for providing plant material. EC is financially supported by the National Agency of Research and Technology (ANRT).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AAPH: 2,2′-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride; DCFH-DA, 2′,7′-dichlorohydrofluorescein diacetate; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; GAE, Gallic acid equivalent; GPS, Global Positioning System; GPx, Gluthatione peroxidase; HHDP, Hexahydroxydiphenic acid; LDH, Lactate dehydrogenase; Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor; PBS, Phosphate Buffer Saline; PRE, Polyphenol Rich Extract; ROS, Reactive Oxygen Species; PTFE polytetrafluoroethylene; SOD, superoxide dismutase; UPLC-ESI-MS, Ultra Performance Liquid Chromatography- Electrospray Ionization—Mass Spectrometry

References

1. Lavergne, R. Plantes médicinales indigènes: Tisanerie et tisaneurs de la Réunion. Master's Thesis, Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, 1989.
2. Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D.P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 715–748. [CrossRef] [PubMed]
3. D'Archivio, M.; Annuzzi, G.; Varì, R.; Filesi, C.; Giacco, R.; Scazzocchio, B.; Santangelo, C.; Giovannini, C.; Rivellese, A.A.; Masella, R. Predominant role of obesity/insulin resistance in oxidative stress development: OBESITY/INSULIN RESISTANCE AND OXIDATIVE STRESS. *Eur. J. Clin. Investig.* **2012**, *42*, 70–78. [CrossRef] [PubMed]
4. Grattagliano, I.; Palmieri, V.O.; Portincasa, P.; Moschetta, A.; Palasciano, G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: A unifying hypothesis. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, *19*, 491–504. [CrossRef] [PubMed]
5. Vincent, H.K.; Innes, K.E.; Vincent, K.R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes. Metab.* **2007**, *9*, 813–839. [CrossRef] [PubMed]

6. Sies, H.; Jones, D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 363–383. [CrossRef] [PubMed]
7. de Ferranti, S.; Mozaffarian, D. The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences. *Clin. Chem.* **2008**, *54*, 945–955. [CrossRef] [PubMed]
8. Dludla, P.V.; Nkambule, B.B.; Jack, B.; Mkandla, Z.; Mutize, T.; Silvestri, S.; Orlando, P.; Tiano, L.; Louw, J.; Mazibuko-Mbeje, S.E. Inflammation and Oxidative Stress in an Obese State and the Protective Effects of Gallic Acid. *Nutrients* **2018**, *11*, 23. [CrossRef]
9. Tresserra-Rimbau, A.; Lamuela-Raventos, R.M.; Moreno, J.J. Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *156*, 186–195. [CrossRef]
10. Gharras, H.E. Polyphenols: Food sources, properties and applications–a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *7*, 2512–2518. [CrossRef]
11. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747. [CrossRef]
12. Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2009**, *2*, 270–278. [CrossRef] [PubMed]
13. Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *13*, 2073S–2085S. [CrossRef] [PubMed]
14. Dai, J.; Mumper, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313–7352. [CrossRef] [PubMed]
15. Santhakumar, A.B.; Battino, M.; Alvarez-Suarez, J.M. Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *113*, 49–65. [CrossRef] [PubMed]
16. Zanforlin, E.; Zagotto, G.; Ribaudo, G. An Overview of New Possible Treatments of Alzheimer's Disease, Based on Natural Products and Semi-Synthetic Compounds. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24*, 3749–3773. [CrossRef]
17. Ciccone, L.; Tonali, N.; Nencetti, S.; Orlandini, E. Natural compounds as inhibitors of transthyretin amyloidosis and neuroprotective agents: Analysis of structural data for future drug design. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35*, 1145–1162. [CrossRef]
18. Ghorbani, A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *96*, 305–312. [CrossRef]
19. Li, X.W.; Chen, H.P.; He, Y.Y.; Chen, W.L.; Chen, J.W.; Gao, L.; Hu, H.Y.; Wang, J. Effects of Rich-Polyphenols Extract of Dendrobium loddigesii on Anti-Diabetic, Anti-Inflammatory, Anti-Oxidant, and Gut Microbiota Modulation in db/db Mice. *Molecules* **2018**, *23*, 3245. [CrossRef]
20. Morand, C. Intérêt des aliments riches en flavonoïdes pour le maintien de la santé cardio-métabolique. *Médecine Mal. Métaboliques* **2014**, *8*, 477–482. [CrossRef]
21. Wan, L.; Jiang, J.-G. Protective effects of plant-derived flavonoids on hepatic injury. *J. Funct. Foods* **2018**, *44*, 283–291. [CrossRef]
22. Arya, V.S.; Kanthlal, S.K.; Linda, G. The role of dietary polyphenols in inflammatory bowel disease: A possible clue on the molecular mechanisms involved in the prevention of immune and inflammatory reactions. *J. Food Biochem.* **2020**. [CrossRef] [PubMed]
23. D'Angelo, C.; Franceschelli, S.; Quiles, J.L.; Speranza, L. Wide Biological Role of Hydroxytyrosol: Possible Therapeutic and Preventive Properties in Cardiovascular Diseases. *Cells* **2020**, *9*, 1932. [CrossRef] [PubMed]
24. Delveaux, J.; Turpin, C.; Veeren, B.; Diotel, N.; Bravo, B.; Begue, F.; Álvarez, E.; Meilhac, O.; Bourdon, E.; Rondeau, P. Antirhea borbonica Aqueous Extract Protects Albumin and Erythrocytes From Glycoxidative Damages. Available online: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32408712/?from_single_result=PMID%3A+32408712&expanded_search_query=PMID%3A+32408712 (accessed on 23 May 2020).
25. dos Santos, M.M.; Prestes, A.S.; de Macedo, G.T.; Ecker, A.; Barcelos, R.P.; Boligon, A.A.; Souza, D.; de Bem, A.F.; da Rocha, J.B.T.; Barbosa, N.V. Syzygium cumini leaf extract inhibits LDL oxidation, but does not protect the liproprotein from glycation. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *210*, 69–79. [CrossRef] [PubMed]
26. Hatia, S.; Septembre-Malaterre, A.; Le Sage, F.; Badiou-Bénéteau, A.; Baret, P.; Payet, B.; Lefebvre d'hellencourt, C.; Gonthier, M.P. Evaluation of antioxidant properties of major dietary polyphenols and their protective effect on 3T3-L1 preadipocytes and red blood cells exposed to oxidative stress. *Free Radic. Res.* **2014**, *48*, 387–401. [CrossRef]
27. Kang, M.R.; Park, K.H.; Oh, S.J.; Yun, J.; Lee, C.W.; Lee, M.Y.; Han, S.-B.; Kang, J.S. Cardiovascular protective effect of glabridin: Implications in LDL oxidation and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *29*, 914–918. [CrossRef]

28. Sung, Y.Y.; Kim, D.-S.; Kim, S.H.; Kim, H.K. Aqueous and ethanolic extracts of welsh onion, Allium fistulosum, attenuate high-fat diet-induced obesity. *BMC Complementary Altern. Med.* **2018**, *18*. [CrossRef]
29. Septembre-Malaterre, A.; Stanislas, G.; Douraguia, E.; Gonthier, M.-P. Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Réunion French Island. *Food Chem.* **2016**, *212*, 225–233. [CrossRef]
30. Yang, C.S.; Sang, S.; Lambert, J.D.; Lee, M.J. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**. [CrossRef]
31. Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125–1131. [CrossRef]
32. Nowicka, A.; Kucharska, A.Z.; Sokół-Łętowska, A.; Fecka, I. Comparison of polyphenol content and antioxidant capacity of strawberry fruit from 90 cultivars of Fragaria × ananassa Duch. *Food Chem.* **2019**, *270*, 32–46. [CrossRef]
33. Pérez-Jiménez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: An application of the Phenol-Explorer database. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2010**, *64*, S112–S120. [CrossRef] [PubMed]
34. Danthu, P.; Lubrano, C.; Flavet, L.; Rahajanirina, V.; Behra, O.; Fromageot, C.; Rabevohitra, R.; Roger, E. Biological Factors Influencing Production of Xanthones in *Aphloia theiformis*. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7*, 140–150. [CrossRef] [PubMed]
35. Kulkarni, V.M.; Rathod, V.K. Exploring the potential of Mangifera indica leaves extract versus mangiferin for therapeutic application. *Agric. Nat. Resour.* **2018**, *52*, 155–161. [CrossRef]
36. Lobo, F.A.; Nascimento, M.A.; Domingues, J.R.; Falcão, D.Q.; Hernanz, D.; Heredia, F.J.; de Lima Araujo, K.G. Foam mat drying of Tommy Atkins mango: Effects of air temperature and concentrations of soy lecithin and carboxymethylcellulose on phenolic composition, mangiferin, and antioxidant capacity. *Food Chem.* **2017**, *221*, 258–266. [CrossRef]
37. Gauvin-Bialecki, A.; Marodon, C. Essential oil of Ayapana triplinervis from Reunion Island: A good natural source of thymohydroquinone dimethyl ether. *Biochem. Syst. Ecol.* **2008**, *36*, 853–858. [CrossRef]
38. Formica, J.V.; Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **1995**, *33*, 1061–1080. [CrossRef]
39. Tavares, I.M.D.C.; Lago-Vanzela, E.S.; Rebello, L.P.G.; Ramos, A.M.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Da-Silva, R.; Hermosín-Gutiérrez, I. Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (Syzygium cumini (L.) Skeels). *Food Res. Int.* **2016**, *82*, 1–13. [CrossRef]
40. Rangasamy, O.; Mahomoodally, F.M.; Gurib-Fakim, A.; Quetin-Leclercq, J. Two anti-staphylococcal triterpenoid acids isolated from Psiloxylon mauritianum (Bouton ex Hook.f.) Baillon, an endemic traditional medicinal plant of Mauritius. *S. Afr. J. Bot.* **2014**, *93*, 198–203. [CrossRef]
41. Wang, T.; Li, Q.; Bi, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm. Sci.* **2018**, *13*, 12–23. [CrossRef]
42. Heleno, S.A.; Martins, A.; Queiroz, M.J.R.P.; Ferreira, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chem.* **2015**, *173*, 501–513. [CrossRef]
43. Carnat, A.; Carnat, A.P.; Fraisse, D.; Ricoux, L.; Lamaison, J.L. The aromatic and polyphenolic composition of Roman camomile tea. *Fitoterapia* **2004**, *75*, 32–38. [CrossRef] [PubMed]
44. Neergheen-Bhujun, V.S.; Munogee, N.; Coolen, V. Antioxidant and anti-inflammatory efficacies of polyherbal formulations and elixirs traditionally used in Mauritius for the treatment of rheumatoid arthritis. *J. Herb. Med.* **2014**, *4*, 1–9. [CrossRef]
45. Pérez-Burillo, S.; Giménez, R.; Rufián-Henares, J.A.; Pastoriza, S. Effect of brewing time and temperature on antioxidant capacity and phenols of white tea: Relationship with sensory properties. *Food Chem.* **2018**, *248*, 111–118. [CrossRef] [PubMed]
46. Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; Moyá, M.L.; Troncoso, A.M.; García-Parrilla, M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* **2007**, *71*, 230–235. [CrossRef] [PubMed]
47. Callcott, E.T.; Santhakumar, A.B.; Luo, J.; Blanchard, C.L. Therapeutic potential of rice-derived polyphenols on obesity-related oxidative stress and inflammation. *J. Appl. Biomed.* **2018**. [CrossRef]
48. Nimse, S.B.; Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 27986–28006. [CrossRef]

49. Bonarska-Kujawa, D.; Pruchnik, H.; Cyboran, S.; Żyłka, R.; Oszmiański, J.; Kleszczyńska, H. Biophysical Mechanism of the Protective Effect of Blue Honeysuckle (Lonicera caerulea L. var. kamtschatica Sevast.) Polyphenols Extracts Against Lipid Peroxidation of Erythrocyte and Lipid Membranes. *J. Membr. Biol.* **2014**, *247*, 611–625. [CrossRef]
50. Yang, Q.; Noviana, M.; Zhao, Y.; Chen, D.; Wang, X. Effect of curcumin extract against oxidative stress on both structure and deformation capability of red blood cell. *J. Biomech.* **2019**, *95*, 109301. [CrossRef]
51. Dai, F.; Miao, Q.; Zhou, B.; Yang, L.; Liu, Z.-L. Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Life Sci.* **2006**, *78*, 2488–2493. [CrossRef]
52. Gangwar, M.; Gautam, M.K.; Sharma, A.K.; Tripathi, Y.B.; Goel, R.K.; Nath, G. Antioxidant Capacity and Radical Scavenging Effect of Polyphenol Rich *Mallotus philippenensis* Fruit Extract on Human Erythrocytes: An In Vitro Study. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1–12. [CrossRef]
53. Kumarappan, C.T.; Thilagam, E.; Mandal, S.C. Antioxidant activity of polyphenolic extracts of Ichnocarpus frutescens. *Saudi J. Biol. Sci.* **2012**, *19*, 349–355. [CrossRef] [PubMed]
54. Zou, Y.; Zhao, M.; Yang, K.; Lin, L.; Wang, Y. Enrichment of antioxidants in black garlic juice using macroporous resins and their protective effects on oxidation-damaged human erythrocytes. *J. Chromatogr. B* **2017**, *1060*, 443–450. [CrossRef] [PubMed]
55. Becatti, M.; Marcucci, R.; Mannucci, A.; Gori, A.; Giusti, B.; Sofi, F.; Mannini, L.; Cellai, A.; Alessandrello Liotta, A.; Mugnaini, M.; et al. Erythrocyte Membrane Fluidity Alterations in Sudden Sensorineural Hearing Loss Patients: The Role of Oxidative Stress. *Thromb. Haemost.* **2017**, *117*, 2334–2345. [CrossRef] [PubMed]
56. Aman, S.; Moin, S.; Owais, M.; Siddiqui, M.U. Antioxidant activity of thymol: Protective role in AAPH-induced hemolysis in diabetic erythrocytes. *IJPSI* **2013**, *6*, 55–60.
57. Gregoire, F.M.; Smas, C.M.; Sul, H.S. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol. Rev.* **1998**, *78*, 783–809. [CrossRef]
58. Brima, E.I. Toxic Elements in Different Medicinal Plants and the Impact on Human Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, *14*, 1209. [CrossRef]
59. Mothana, R.A.A.; Abdo, S.A.A.; Hasson, S.; Althawab, F.M.N.; Alaghbari, S.A.Z.; Lindequist, U. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Yemeni Medicinal Plants. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* **2010**, *7*, 323–330. [CrossRef]
60. Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* **2017**, *11*, 613–619. [CrossRef]
61. Vallejo, M.J.; Salazar, L.; Grijalva, M. Oxidative Stress Modulation and ROS-Mediated Toxicity in Cancer: A Review on *In Vitro* Models for Plant-Derived Compounds. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1–9. [CrossRef]
62. Pavan, V.; Ribaudo, G.; Zorzan, M.; Redaelli, M.; Pezzani, R.; Mucignat-Caretta, C.; Zagotto, G. Antiproliferative activity of Juglone derivatives on rat glioma. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31*, 632–638. [CrossRef]

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

SUPPLEMENTARY DATA

Table 1 – SUPPLEMENTARY DATA: Reported bioactivity of the 8 selected medicinal plants

Aphloia theiformis
Aphloia theiformis belongs to the aphloiaceae family; its leaves, barks and roots are widely used as herbal beverage. This plant is found in East Africa, Madagascar, Mascarene and Seychelles areas. *Aphloia theiformis* was traditionally known and used for treatment of digestive disorders in young children [1], treatment of fever, stomach pain and albuminuria [2], for blood pressure lowering [3], as a dewormer [4] and for its photoprotective properties [5]. In the context of metabolic diseases, *A. theiformis* is used for its antidiabetic and cholesterol lowering properties [6].
Ayapana triplinervis
Ayapana triplinervis is a well-known asteraceae from Brazil. Also known as *Eupatorium triplinerve,* this plant was traditionally used in India in case of pain and inflammatory disorders [7,8]. In Mauritius Island, this plant is usually prepared as a decoction for children stomach pain, diarrhoea, colitis and vomiting symptoms [9]. Introduced in Reunion Island in the 1800s, herbal beverages with *Ayapana triplinervis* leaves were used for their antiemetic properties and protective effects against dysentery and digestive problems. The essential oil of *A. triplinervis* and its major component the thymohydroquinone dimethyl ether was recently reported to exert anti-viral activity against Zika virus. [10,11]
Dodonaea viscosa
This indigenous plant of Reunion Island can be found in subtropical regions of South Africa, South America, Asia and Oceania. Traditionally used as depurative, beverage against renal colic, kidney stones, osteoarthritis, gout and rheumatism, this plant showed interesting antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and anti-ulcer activity [12]. In the context of metabolic disorders, the use of *D viscosa* was found to have antispasmodic, antidiarrheal and antidiabetic actions [6].
Hubertia ambavilla
This endemic asteraceae of Reunion Island is traditionally used to improve blood circulation, to prevent diabetes, eczema, wounds, rheumatism, itch, asthma and ulcer. It has been described for its antioxidant properties [13,14].
Hypericum lanceolatum
This endemic hypericaceae of Reunion Island is traditionally prepared for preventing fever, cystitis, bad blood circulation and dysmenorrhoea but also for its antioxidant and antimicrobial activities [14–16].
Pelargonium x graveolens
This plant is commonly used for its antioxidant, haemostatic, anti-inflammatory anti-eczema, and anti-rheumatism activities but also as analgesic and skin astringent. This geraniaceae rich in essential oil is also known to have antidiabetic and antioxidant properties [17,18].
Psiloxylon mauritianum
This endemic psiloxylaceae can only be found in Reunion and Mauritius Islands. Known for its contents in asiatic and corosolic acids, this plant was firstly described as a treatment for amenorrhea and dysentery with diuretic, anti-inflammatory, depurative and cholesterol-lowering properties [2].
Syzygium cumini
This plant is probably the most studied of our selection; it belongs to the myrtaceae family and is used in Brazil, Reunion Island, India and Asia as an antidiabetic agent and has been described to exert antioxidant activity.[19,20]

Table 2 – SUPPLEMENTARY DATA: Reported bioactivity of the main polyphenols detected in medicinal plant polyphenol rich extracts (PRE), infusions and decoctions.

Component	Plant	Bioactivity
Mangiferin	*Aphloia theiformis*	Prevents disorders in skin regeneration [21] Action on key enzymes associated with type 2 diabetes complications [22] Inhibition of metabolic enzymes (acetylcholine esterase, cholesterol esterase, glycogen phosphorylase a) and angiotensin (1) converting enzyme [22] Antioxidant capacity [23,24] Cardioprotective effects [25] Impairs Zika virus attachment to host cell surface[10] Anti-chikungunya activity [26]
Aphloiol		Prevent red blood cell lysis [2,27]
Caffeoyl glucarate	*Ayapana triplinervis, Pelargonium x graveolens, Dodonaea viscosa*	Modulation of pro-inflammatory response to LPS [28]
Coumarin derivatives Ayapin	*Ayapana triplinervis*	Antinociceptive, antioxidant effects [8]
Herniarin		Protection against DNA damages [29], anti-inflammatory activity [30], anti-cancer [31]
Thymohydroquinone dimethyl ether		Inhibition of zika virus [11]
Quercetin	*Ayapana triplinervis, Dodonaea viscosa, Hubertia ambavilla, Pelargonium x graveolens, Psiloxylon mauritianum,,Hypericum lanceolatum*	Antihypertensive effects [32], anti-obesity effects [33], neuroprotective effects and antioxidant activity [34], antidiabetic effects [35], cardiovascular protective effects [36], chemopreventive potential [37], anti-inflammatory effects [38]
Chlorogenic acid	*Dodonaea viscosa, Ayapana triplinervis, Hubertia ambavilla*	Antioxidant activity [39], Anti-inflammatory effects [40], Anti-obesity, improves lipid metabolism [41]

Procyanidins	*Hypericum lanceolatum, Dodonaea viscosa*	Inhibitory effects on α-amylase [42], anti-inflammatory activity by down-regulating macrophage polarization [43], insulin sensitizer in adipocytes [44], reduces liver fibrosis, over-deposition of extracellular matrix and angiogenesis [45], modulation of gut microbiota and impact on Non Alcoholic Fatty Liver Disease and Diet induced-obesity [46]
Catechin	*Dodonaea viscosa*	Protection against oxidative stress [47], prevention of infectious diseases [48], antioxidant activity [49,50]
Epicatechin	*Dodonaea viscosa*	Antioxidant activity [50], reduces blood pressure [51], protects beta cell activity [52], protective effects on steatosis and insulin resistance [53]
Isorhamnetin	*Hypericum lanceolatum, Dodonaea viscosa*	Protection against cardiac hypertrophy [54], ameliorates metabolic disorders [55], hepatoprotective effects [56], anti-inflammatory effects against LPS stimulation [57], prevention of oxidative stress induced by H_2O_2 [58]
Coumaroyl quinic acid	*Dodonaea viscosa*	Antioxidant activity [55], anti-inflammatory effects by inhibition of NFκB [59], peroxynitrite-scavenging effects [60]
Kaempferol	*Psiloxylon mauritianum, Pelargonium x graveolens*	Antioxidant activity [61,62], anti-inflammatory properties [63], cardiovascular protective effects [64–66], prevent red blood cell lysis induced by Reactive Oxygen Species [67], anti-cancer action [68]
Myricetin	*Pelargonium x graveolens*	Cardioprotective effects [69], anti-inflammatory activity [70,71], antidiabetic activity [72], protection against metabolic disorders [73]
Gallic acid	*Syzygium cumini*	Antioxidant and neuroprotective agent [74], anti-inflammatory effects [75], impact on metabolism and insulin resistance [76,77], protection against oxidative stress [78]
Vescalagin		Potential in chemotherapy [79,80], action on insulin resistance [81], down regulation of lipid profile and glycemia [82]
Castalagin		Effects on osteoclastogenesis [83]
Galloyl tannins		α-glucosidase inhibitory activity, cholesterol lowering [84]
Ellagic acid		Antioxidant, anti-inflammatory effects [85–87], cardioprotective effects [88,89], protection against oxidative stress [11]
HHDP (hexahydroxydiphenic acid)		Anti-inflammatory activity [90] moderate lipase inhibition activity [91]

Caffeic acid	*Hypericum lanceolatum*	Reduces oxidative stress [92–94] metabolic effects on hepatic steatosis [95], anti-inflammatory effects [96,97]
Asiatic acid	*Psiloxylon mauritianum*	Anti-inflammatory effects [26,98–100], protective effects against oxidative stress damage [101–103], cardioprotective effects [42,104]
Caffeoyl quinic acid	*Hypericum lanceolatum, Hubertia ambavilla*	Antioxidant activity [105,106]

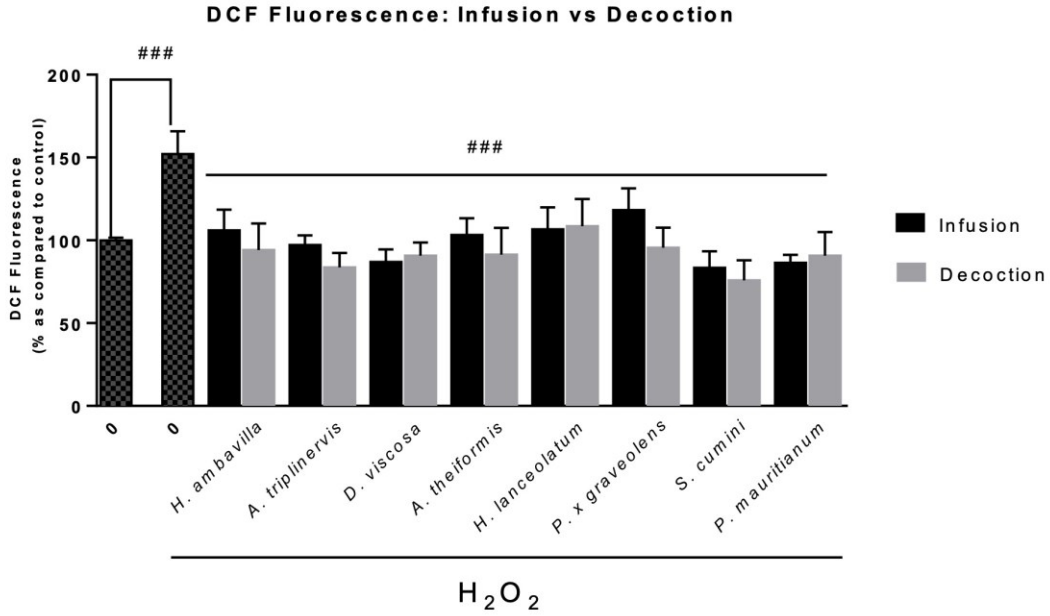


Figure 1 SUPPLEMENTARY DATA: Comparative study of the protective effect of medicinal plant infusions and decoctions at 25 µM GAE final concentration in response to H_2O_2. 3T3-L1 preadipocytes were incubated with medicinal plant infusions and decoctions. DCF fluorescence was measured at 492 nm for excitation and 520 nm for emission. Data shown are means ± SEM of three independent experiments ### $p<0.005$ as compared to control (PBS alone, or H_2O_2).

References

1. Duchemann, B. *"Les plantes médicinales" Exposition universelle de 1900. Colonies et protectorats.*; **1900**;
2. Lavergne, R. Plantes médicinales indigènes: tisanerie et tisaneurs de la Réunion, Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc: France, **1989**.
3. Lopez, J.-G.; Drouet, G.; de Haro, L. Hypotension sévère au cours d'une intoxication par deux plantes médicinales à l'île de la Réunion : *Aphloia theiformis* et *Rubus alceifolius*. *Annales de Toxicologie Analytique* **2013**, *25*, 121–123, doi:10.1051/ata/2013046.
4. Decary, R. Plantes utiles de la Flore Malgache. *Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale* **1979**, 338–339.
5. Danthu, P.; Lubrano, C.; Flavet, L.; Rahajanirina, V.; Behra, O.; Fromageot, C.; Rabevohitra, R.; Roger, E. Biological Factors Influencing Production of Xanthones in *Aphloia theiformis*. *Chemistry & Biodiversity* **2010**, *7*, 140–150, doi:10.1002/cbdv.200900199.
6. Mootoosamy, A.; Fawzi Mahomoodally, M. Ethnomedicinal application of native remedies used against diabetes and related complications in Mauritius. *Journal of Ethnopharmacology* **2014**, *151*, 413–444, doi:10.1016/j.jep.2013.10.069.
7. Cheriyan, B.V.; Kadhirvelu, P.; Nadipelly, J.; Shanmugasundaram, J.; Sayeli, V.; Subramanian, V. Anti-nociceptive Effect of 7-methoxy Coumarin from Eupatorium Triplinerve vahl (Asteraceae). *Pharmacogn Mag* **2017**, *13*, 81–84, doi:10.4103/0973-1296.197650.
8. Melo, A.S.; Monteiro, M.C.; da Silva, J.B.; de Oliveira, F.R.; Vieira, J.L.F.; de Andrade, M.A.; Baetas, A.C.; Sakai, J.T.; Ferreira, F.A.; Cunha Sousa, P.J. da; et al. Antinociceptive, neurobehavioral and antioxidant effects of Eupatorium triplinerve Vahl on rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2013**, *147*, 293–301, doi:10.1016/j.jep.2013.03.002.
9. Mahomoodally, M.F.; Sreekeesoon, D.P. A Quantitative Ethnopharmacological Documentation of Natural Pharmacological Agents Used by Pediatric Patients in Mauritius. *Biomed Res Int* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/136757.
10. Clain, E.; Sinigaglia, L.; Koishi, A.C.; Gorgette, O.; Gadea, G.; Viranaicken, W.; Krejbich-Trotot, P.; Mavingui, P.; Desprès, P.; Nunes Duarte dos Santos, C.; et al. Extract from Aphloia theiformis, an edible indigenous plant from Reunion Island, impairs Zika virus attachment to the host cell surface. *Sci Rep* **2018**, *8*, doi:10.1038/s41598-018-29183-2.
11. Haddad, J.G.; Picard, M.; Bénard, S.; Desvignes, C.; Desprès, P.; Diotel, N.; El Kalamouni, C. Ayapana triplinervis Essential Oil and Its Main Component Thymohydroquinone Dimethyl Ether Inhibit Zika Virus at Doses Devoid of Toxicity in Zebrafish. *Molecules* **2019**, *24*, doi:10.3390/molecules24193447.
12. Arun, M.; Asha, V.V. Gastroprotective effect of Dodonaea viscosa on various experimental ulcer models. *Journal of Ethnopharmacology* **2008**, *118*, 460–465, doi:10.1016/j.jep.2008.05.026.
13. Ben Haddada, M.; Gerometta, E.; Chawech, R.; Sorres, J.; Bialecki, A.; Pesnel, S.; Spadavecchia, J.; Morel, A.-L. Assessment of antioxidant and dermoprotective activities of gold nanoparticles as safe cosmetic ingredient. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2020**, *189*, 110855, doi:10.1016/j.colsurfb.2020.110855.
14. Poullain, C.; Girard-Valenciennes, E.; Smadja, J. Plants from reunion island: evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities. *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, *95*, 19–26, doi:10.1016/j.jep.2004.05.023.
15. Couladis, M.; Baziou, P.; Verykokidou, E.; Loukis, A. Antioxidant activity of polyphenols from Hypericum triquetrifolium Turra. *Phytotherapy Research* **2002**, *16*, 769–770, doi:10.1002/ptr.1062.

16. Tchakam, P.D.; Lunga, P.K.; Kowa, T.K.; Lonfouo, A.H.N.; Wabo, H.K.; Tapondjou, L.A.; Tane, P.; Kuiate, J.-R. Antimicrobial and antioxidant activities of the extracts and compounds from the leaves of Psorospermum aurantiacum Engl. and Hypericum lanceolatum Lam. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2012**, *12*, doi:10.1186/1472-6882-12-136.
17. Boukhris, M.; Bouaziz, M.; Feki, I.; Jemai, H.; El Feki, A.; Sayadi, S. Hypoglycemic and antioxidant effects of leaf essential oil of Pelargonium graveolens L'Hér. in alloxan induced diabetic rats. *Lipids in Health and Disease* **2012**, *11*, 81, doi:10.1186/1476-511X-11-81.
18. Lavergne, R. *Les plantes médicinales réunionnaises d'aujourd'hui* -; 2018;
19. Ayyanar, M.; Subash-Babu, P.; Ignacimuthu, S. Syzygium cumini (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: Folk medicinal and pharmacological evidences. *Complementary Therapies in Medicine* **2013**, *21*, 232–243, doi:10.1016/j.ctim.2013.03.004.
20. dos Santos, M.M.; Prestes, A.S.; de Macedo, G.T.; Ecker, A.; Barcelos, R.P.; Boligon, A.A.; Souza, D.; de Bem, A.F.; da Rocha, J.B.T.; Barbosa, N.V. Syzygium cumini leaf extract inhibits LDL oxidation, but does not protect the liproprotein from glycation. *Journal of Ethnopharmacology* **2018**, *210*, 69–79, doi:10.1016/j.jep.2017.08.033.
21. Pleguezuelos-Villa, M.; Nácher, A.; Hernández, M.J.; Ofelia Vila Buso, M.A.; Ruiz Sauri, A.; Díez-Sales, O. Mangiferin nanoemulsions in treatment of inflammatory disorders and skin regeneration. *Int J Pharm* **2019**, *564*, 299–307, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.04.056.
22. Picot, M.C.N.; Bender, O.; Atalay, A.; Zengin, G.; Loffredo, L.; Hadji-Minaglou, F.; Mahomoodally, M.F. Multiple pharmacological targets, cytotoxicity, and phytochemical profile of Aphloia theiformis (Vahl.) Benn. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2017**, *89*, 342–350, doi:10.1016/j.biopha.2017.02.031.
23. Dembitsky, V.M.; Poovarodom, S.; Leontowicz, H.; Leontowicz, M.; Vearasilp, S.; Trakhtenberg, S.; Gorinstein, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Research International* **2011**, *44*, 1671–1701, doi:10.1016/j.foodres.2011.03.003.
24. Lim, Y.P.; Pang, S.F.; Yusoff, M.M.; Abdul Mudalip, S.K.; Gimbun, J. Correlation between the extraction yield of mangiferin to the antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid content of Phaleria macrocarpa fruits. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2019**, *14*, 100224, doi:10.1016/j.jarmap.2019.100224.
25. Jiang, T.; Han, F.; Gao, G.; Liu, M. Mangiferin exert cardioprotective and anti-apoptotic effects in heart failure induced rats. *Life Sciences* **2020**, *249*, 117476, doi:10.1016/j.lfs.2020.117476.
26. Ledoux, A.; Cao, M.; Jansen, O.; Mamede, L.; Campos, P.-E.; Payet, B.; Clerc, P.; Grondin, I.; Girard-Valenciennes, E.; Hermann, T.; et al. Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *52*, 622–628, doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.07.017.
27. Jonville, M.C.; Kodja, H.; Strasberg, D.; Pichette, A.; Ollivier, E.; Frédérich, M.; Angenot, L.; Legault, J. Antiplasmodial, anti-inflammatory and cytotoxic activities of various plant extracts from the Mascarene Archipelago. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *136*, 525–531, doi:10.1016/j.jep.2010.06.013.
28. Dudek, M.K.; Michalak, B.; Woźniak, M.; Czerwińska, M.E.; Filipek, A.; Granica, S.; Kiss, A.K. Hydroxycinnamoyl derivatives and secoiridoid glycoside derivatives from Syringa vulgaris flowers and their effects on the pro-inflammatory responses of human neutrophils. *Fitoterapia* **2017**, *121*, 194–205, doi:10.1016/j.fitote.2017.07.008.
29. Rezaee, R.; Behravan, E.; Behravan, J.; Soltani, F.; Naderi, Y.; Emami, B.; Iranshahi, M. Antigenotoxic activities of the natural dietary coumarins umbelliferone, herniarin and 7-isopentenyloxy coumarin on human lymphocytes exposed to oxidative stress. *Drug Chem Toxicol* **2014**, *37*, 144–148, doi:10.3109/01480545.2013.834352.

30. Nayeli, M.-B.; Maribel, H.-R.; Enrique, J.-F.; Rafael, B.-P.; Margarita, A.-F.; Macrina, F.-M.; Ivan, M.-D.; Manasés, G.-C. Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from Tagetes lucida Cav. *Nat. Prod. Res.* **2019**, 1–5, doi:10.1080/14786419.2018.1553172.
31. Kielbus, M.; Skalicka-Wozniak, K.; Grabarska, A.; Jeleniewicz, W.; Dmoszynska-Graniczka, M.; Marston, A.; Polberg, K.; Gawda, P.; Klatka, J.; Stepulak, A. 7-substituted coumarins inhibit proliferation and migration of laryngeal cancer cells in vitro. *Anticancer Res.* **2013**, *33*, 4347–4356.
32. Marunaka, Y.; Marunaka, R.; Sun, H.; Yamamoto, T.; Kanamura, N.; Inui, T.; Taruno, A. Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure. *Molecules* **2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22020209.
33. Ahn, J.; Lee, H.; Kim, S.; Park, J.; Ha, T. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**, *373*, 545–549, doi:10.1016/j.bbrc.2008.06.077.
34. Costa, L.G.; Garrick, J.M.; Roquè, P.J.; Pellacani, C. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, *2016*, 1–10, doi:10.1155/2016/2986796.
35. Eid, H.M.; Haddad, P.S. The Antidiabetic Potential of Quercetin: Underlying Mechanisms. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24*, 355–364, doi:10.2174/0929867323666160909153707.
36. Patel, R.V.; Mistry, B.M.; Shinde, S.K.; Syed, R.; Singh, V.; Shin, H.-S. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *155*, 889–904, doi:10.1016/j.ejmech.2018.06.053.
37. Kashyap, D.; Garg, V.K.; Tuli, H.S.; Yerer, M.B.; Sak, K.; Sharma, A.K.; Kumar, M.; Aggarwal, V.; Sandhu, S.S. Fisetin and Quercetin: Promising Flavonoids with Chemopreventive Potential. *Biomolecules* **2019**, *9*, doi:10.3390/biom9050174.
38. Carullo, G.; Cappello, A.R.; Frattaruolo, L.; Badolato, M.; Armentano, B.; Aiello, F. Quercetin and derivatives: useful tools in inflammation and pain management. *Future Med Chem* **2017**, *9*, 79–93, doi:10.4155/fmc-2016-0186.
39. Tošović, J.; Marković, S.; Dimitrić Marković, J.M.; Mojović, M.; Milenković, D. Antioxidative mechanisms in chlorogenic acid. *Food Chem* **2017**, *237*, 390–398, doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.080.
40. Naveed, M.; Hejazi, V.; Abbas, M.; Kamboh, A.A.; Khan, G.J.; Shumzaid, M.; Ahmad, F.; Babazadeh, D.; FangFang, X.; Modarresi-Ghazani, F.; et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *97*, 67–74, doi:10.1016/j.biopha.2017.10.064.
41. Cho, A.-S.; Jeon, S.-M.; Kim, M.-J.; Yeo, J.; Seo, K.-I.; Choi, M.-S.; Lee, M.-K. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology* **2010**, *48*, 937–943, doi:10.1016/j.fct.2010.01.003.
42. Dai, T.; Chen, J.; Li, Q.; Li, P.; Hu, P.; Liu, C.; Li, T. Investigation the interaction between procyanidin dimer and α-amylase: Spectroscopic analyses and molecular docking simulation. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *113*, 427–433, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.01.189.
43. Tian, Y.; Yang, C.; Yao, Q.; Qian, L.; Liu, J.; Xie, X.; Ma, W.; Nie, X.; Lai, B.; Xiao, L.; et al. Procyanidin B2 Activates PPARγ to Induce M2 Polarization in Mouse Macrophages. *Front Immunol* **2019**, *10*, 1895, doi:10.3389/fimmu.2019.01895.
44. Sun, P.; Li, K.; Wang, T.; Ji, J.; Wang, Y.; Chen, K.-X.; Jia, Q.; Li, Y.-M.; Wang, H.-Y. Procyanidin C1, a Component of Cinnamon Extracts, Is a Potential Insulin Sensitizer That Targets Adipocytes. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 8839–8846, doi:10.1021/acs.jafc.9b02932.
45. Feng, J.; Wang, C.; Liu, T.; Li, J.; Wu, L.; Yu, Q.; Li, S.; Zhou, Y.; Zhang, J.; Chen, J.; et al. Procyanidin B2 inhibits the activation of hepatic stellate cells and angiogenesis via the

mountainous vegetables used for chwinamul and their peroxynitrite-scavenging effect. *Arch. Pharm. Res.* **2009**, *32*, 1361–1367, doi:10.1007/s12272-009-2003-6.
61. Park, J.-W.; Choi, J.-S.; Choi, J.-S. Effects of Kaempferol, an Antioxidant, on the Bioavailability and Pharmacokinetics of Nimodipine in Rats. *Journal of Pharmaceutical Investigation* **2011**, *41*, 301–307, doi:10.4333/KPS.2011.41.5.301.
62. Teffo, L.S.; Aderogba, M.A.; Eloff, J.N. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from Dodonaea viscosa Jacq. var. angustifolia leaf extracts. *South African Journal of Botany* **2010**, *76*, 25–29, doi:10.1016/j.sajb.2009.06.010.
63. Devi, K.P.; Malar, D.S.; Nabavi, S.F.; Sureda, A.; Xiao, J.; Nabavi, S.M.; Daglia, M. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacol. Res.* **2015**, *99*, 1–10, doi:10.1016/j.phrs.2015.05.002.
64. Dabeek, W.M.; Marra, M.V. Dietary Quercetin and Kaempferol: Bioavailability and Potential Cardiovascular-Related Bioactivity in Humans. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/nu11102288.
65. Kong, L.; Luo, C.; Li, X.; Zhou, Y.; He, H. The anti-inflammatory effect of kaempferol on early atherosclerosis in high cholesterol fed rabbits. *Lipids Health Dis* **2013**, *12*, 115, doi:10.1186/1476-511X-12-115.
66. Zhong, X.; Zhang, L.; Li, Y.; Li, P.; Li, J.; Cheng, G. Kaempferol alleviates ox-LDL-induced apoptosis by up-regulation of miR-26a-5p via inhibiting TLR4/NF-κB pathway in human endothelial cells. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *108*, 1783–1789, doi:10.1016/j.biopha.2018.09.175.
67. Wu, P.; Meng, X.; Zheng, H.; Zeng, Q.; Chen, T.; Wang, W.; Zhang, X.; Su, J. Kaempferol Attenuates ROS-Induced Hemolysis and the Molecular Mechanism of Its Induction of Apoptosis on Bladder Cancer. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23102592.
68. Wang, X.; Yang, Y.; An, Y.; Fang, G. The mechanism of anticancer action and potential clinical use of kaempferol in the treatment of breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *117*, 109086, doi:10.1016/j.biopha.2019.109086.
69. Zhang, N.; Feng, H.; Liao, H.-H.; Chen, S.; Yang, Z.; Deng, W.; Tang, Q.-Z. Myricetin attenuated LPS induced cardiac injury in vivo and in vitro. *Phytother Res* **2018**, *32*, 459–470, doi:10.1002/ptr.5989.
70. Hou, W.; Hu, S.; Su, Z.; Wang, Q.; Meng, G.; Guo, T.; Zhang, J.; Gao, P. Myricetin attenuates LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages and mouse models. *Future Med Chem* **2018**, *10*, 2253–2264, doi:10.4155/fmc-2018-0172.
71. Xie, J.; Zheng, Y. Myricetin protects keratinocyte damage induced by UV through IκB/NFκb signaling pathway. *J Cosmet Dermatol* **2017**, *16*, 444–449, doi:10.1111/jocd.12399.
72. Li, Y.; Zheng, X.; Yi, X.; Liu, C.; Kong, D.; Zhang, J.; Gong, M. Myricetin: a potent approach for the treatment of type 2 diabetes as a natural class B GPCR agonist. *FASEB J.* **2017**, *31*, 2603–2611, doi:10.1096/fj.201601339R.
73. Xia, S.-F.; Le, G.-W.; Wang, P.; Qiu, Y.-Y.; Jiang, Y.-Y.; Tang, X. Regressive Effect of Myricetin on Hepatic Steatosis in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients* **2016**, *8*, doi:10.3390/nu8120799.
74. Yen, G.-C.; Duh, P.-D.; Tsai, H.-L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry* **2002**, *79*, 307–313, doi:10.1016/S0308-8146(02)00145-0.
75. BenSaad, L.A.; Kim, K.H.; Quah, C.C.; Kim, W.R.; Shahimi, M. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from Punica granatum. *BMC Complement Altern Med* **2017**, *17*, 47, doi:10.1186/s12906-017-1555-0.
76. Abdel-Moneim, A.; El-Twab, S.M.A.; Yousef, A.I.; Reheim, E.S.A.; Ashour, M.B. Modulation of hyperglycemia and dyslipidemia in experimental type 2 diabetes by gallic acid and p -coumaric acid: The role of adipocytokines and PPARγ. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *105*, 1091–1097, doi:10.1016/j.biopha.2018.06.096.

77. Oboh, G.; Ogunsuyi, O.B.; Ogunbadejo, M.D.; Adefegha, S.A. Influence of gallic acid on α-amylase and α-glucosidase inhibitory properties of acarbose. *Journal of Food and Drug Analysis* **2016**, *24*, 627–634, doi:10.1016/j.jfda.2016.03.003.
78. Dludla, P.V.; Nkambule, B.B.; Jack, B.; Mkandla, Z.; Mutize, T.; Silvestri, S.; Orlando, P.; Tiano, L.; Louw, J.; Mazibuko-Mbeje, S.E. Inflammation and Oxidative Stress in an Obese State and the Protective Effects of Gallic Acid. *Nutrients* **2018**, *11*, doi:10.3390/nu11010023.
79. Auzanneau, C.; Montaudon, D.; Jacquet, R.; Elkaoukabi-Chaibi, A.; Quideau, S.; De Giorgi, F.; Ichas, F.; Pourquier, P. R5: La vescalagine, ellagitanin polyphénolique, est un inhibiteur spécifique de l'isoforme alpha de la topo-isomérase 2 humaine. *Bulletin du Cancer* **2010**, *97*, S18–S19, doi:10.1016/S0007-4551(15)30922-X.
80. Kamada, Y.; Yakabu, H.; Ichiba, T.; Tamanaha, A.; Shimoji, M.; Kato, M.; Norimoto, C.; Yamashiro, R.; Miyagi, I.; Sakudo, A.; et al. Castalagin and vescalagin purified from leaves of Syzygium samarangense (Blume) Merrill & L.M. Perry: Dual inhibitory activity against PARP1 and DNA topoisomerase II. *Fitoterapia* **2018**, *129*, 94–101, doi:10.1016/j.fitote.2018.06.015.
81. Huang, D.-W.; Chang, W.-C.; Wu, J.S.-B.; Shih, R.-W.; Shen, S.-C. Vescalagin from Pink Wax Apple [Syzygium samarangense (Blume) Merrill and Perry] Alleviates Hepatic Insulin Resistance and Ameliorates Glycemic Metabolism Abnormality in Rats Fed a High-Fructose Diet. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 1122–1129, doi:10.1021/acs.jafc.5b05558.
82. Shen, S.-C.; Chang, W.-C. Hypotriglyceridemic and hypoglycemic effects of vescalagin from Pink wax apple [Syzygium samarangense (Blume) Merrill and Perry cv. Pink] in high-fructose diet-induced diabetic rats. *Food Chem* **2013**, *136*, 858–863, doi:10.1016/j.foodchem.2012.08.037.
83. Iwatake, M.; Okamoto, K.; Tanaka, T.; Tsukuba, T. Castalagin Exerts Inhibitory Effects on Osteoclastogenesis Through Blocking a Broad Range of Signaling Pathways with Low Cytotoxicity. *Phytother Res* **2015**, *29*, 917–924, doi:10.1002/ptr.5333.
84. Gato, N.; Kadowaki, A.; Hashimoto, N.; Yokoyama, S.; Matsumoto, K. Persimmon Fruit Tannin-Rich Fiber Reduces Cholesterol Levels in Humans. *Annals of Nutrition and Metabolism* **2013**, *62*, 1–6, doi:10.1159/000343787.
85. Boehning, A.L.; Essien, S.A.; Underwood, E.L.; Dash, P.K.; Boehning, D. Cell type-dependent effects of ellagic acid on cellular metabolism. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *106*, 411–418, doi:10.1016/j.biopha.2018.06.142.
86. Corbett, S.; Daniel, J.; Drayton, R.; Field, M.; Steinhardt, R.; Garrett, N. Evaluation of the Anti-inflammatory Effects of Ellagic Acid. *Journal of PeriAnesthesia Nursing* **2010**, *25*, 214–220, doi:https://doi.org/10.1016/j.jopan.2010.05.011.
87. Derosa, G.; Maffioli, P.; Sahebkar, A. Ellagic Acid and Its Role in Chronic Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *928*, 473–479, doi:10.1007/978-3-319-41334-1_20.
88. Long, L.; Song, Y. Dietary ellagic acid is protective for atherosclerosis. *International Journal of Cardiology* **2018**, *256*, 12, doi:10.1016/j.ijcard.2017.12.094.
89. Mele, L.; Mena, P.; Piemontese, A.; Marino, V.; López-Gutiérrez, N.; Bernini, F.; Brighenti, F.; Zanotti, I.; Del Rio, D. Antiatherogenic effects of ellagic acid and urolithins in vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2016**, *599*, 42–50, doi:10.1016/j.abb.2016.02.017.
90. Pinheiro, A.J.M.C.R.; Mendes, A.R.S.; Neves, M.D.F. de J.; Prado, C.M.; Bittencourt-Mernak, M.I.; Santana, F.P.R.; Lago, J.H.G.; de Sá, J.C.; da Rocha, C.Q.; de Sousa, E.M.; et al. Galloyl-Hexahydroxydiphenoyl (HHDP)-Glucose Isolated From Punica granatum L. Leaves Protects Against Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Acute Lung Injury in BALB/c Mice. *Front Immunol* **2019**, *10*, 1978, doi:10.3389/fimmu.2019.01978.
91. Huang, Y.-L.; Tsujita, T.; Tanaka, T.; Matsuo, Y.; Kouno, I.; Li, D.-P.; Nonaka, G. Triterpene hexahydroxydiphenoyl esters and a quinic acid purpurogallin carbonyl ester from the leaves of Salicornia herbacea against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *181*, 366–376, doi:10.1016/j.cbi.2009.07.017.

Discussion et perspectives

Les travaux présentés dans l'article 1 constituent une première approche quant à l'évaluation du contenu en polyphénols des plantes médicinales traditionnellement utilisées à La Réunion. L'analyse des extraits hydroacétoniques a révélé, d'une part, la présence de polyphénols dans toutes les plantes médicinales étudiées (avec des teneurs allant de 9,8 mg d'acide gallique équivalent (GAE) / g de plante à 75,8 mg GAE / g de plante séchée). D'autre part, les plantes médicinales les plus riches en polyphénols, comme le Jamblon (*S. cumini*), le Fleur Jaune (*H. lanceolatum*) et le Bois de Pêche Marron (*P. mauritianum*) présentent des teneurs en polyphénols comparables à celles d'aliments riches en polyphénols comme l'anis étoilée, le romarin et le thym (J Pérez-Jiménez et al., 2010). Les concentrations en polyphénols contenus dans les tisanes varient de 24 à 143 mg d'acide gallique équivalent (GAE) / L pour les infusions et de 35 à 219 mg GAE / L pour les décoctions. Un meilleur rendement d'extraction est observé pour les décoctions. Ce résultat s'explique notamment par une durée de préparation plus élevée que pour l'infusion, laissant alors davantage de temps de contact entre le broyat de plantes et l'eau.

Nous avons pu comparer les teneurs en polyphénols des infusions d'Ambaville (*H. ambavilla*) et de Fleur Jaune (*H. lanceolatum*) avec celles indiquées dans la littérature Morel *et al.,* (Morel et al., 2017) pour un procédé de décoction différent de nos conditions expérimentales (3 g de plante / 50 mL d'eau désionisée ; température finale : 60°C - 5 min), les teneurs en polyphénols relevées étaient de 19,67 g GAE / L pour l'Ambaville (*H. ambavilla*) et de 6,4 g GAE / L pour le Fleur Jaune (*H. lanceolatum*). Il est possible d'observer que pour une concentration en plante 60 fois plus élevée que dans notre étude (60 g / L vs 1 g /L), les teneurs en polyphénols extraits de la plante médicinale *H. ambavilla* sont plus de 3 fois supérieures à celles de *H. lanceolatum*. En comparant ce résultat à celui de notre étude, deux hypothèses sont envisagées :

- La différence de composition en polyphénols au sein même de la matière végétale (plantes provenant de terroirs différents)
- La différence du procédé de transformation utilisé : dans notre étude, l'extraction des polyphénols d'*H. lanceolatum* a été optimisée en utilisant un temps d'extraction plus long (30 min). En revanche, l'extraction des polyphénols d'*H. ambavilla* a été limitée par la quantité de broyat de plante utilisée (1 g / 1L). Il est possible que l'extraction utilisée par Morel *et al.,* n'ait pas permis une extraction optimale des polyphénols issus d'*H.*

lanceolatum en raison d'une plus faible durée de cuisson. Ainsi, les polyphénols issus de la matrice végétale la plus « fragile » (*H. ambavilla*) ont rapidement été extraits, contrairement à ceux de la seconde matrice (*H. lanceolatum*) plus rigide, dont les cellules n'ont pas été lysées aussi efficacement (Morel et al., 2017).

Ces premiers résultats ont mis en avant la présence de quantités importantes de molécules bioactives dans les préparations de plantes médicinales, dans les conditions d'utilisation traditionnelle (tisanes) ou non (extraits riches en polyphénols). Dans notre étude, le procédé de transformation permettant une meilleure extraction était la décoction. Ce mode de préparation est utilisé traditionnellement à La Réunion pour la préparation de tisanes à base d'écorces, tiges ou tissus végétaux rigides (dont l'extraction des principes actifs s'avère plus difficile).

L'identification des polyphénols présents dans les différentes plantes a été effectuée par spectrométrie de masse. Des polyphénols largement décrits par la littérature pour leur bioactivité ont été identifiés : la quercétine, l'acide chlorogénique, les procyanidines (A et B), le kaempférol ou encore la mangiférine.

La composition en polyphénols est différente selon la plante médicinale considérée. Par exemple, pour le Change Écorce (*A. theiformis*), la mangiférine et ses dérivés représentent plus de 98% des composés détectés. Pour le Fleur Jaune (*H. lanceolatum*), les flavonoïdes (quercétine et dérivés, isomères de procyanidine) et les acides phénoliques (acide chlorogénique, acide di-caffeoyl quinique) sont majoritaires. D'autres plantes médicinales présentent essentiellement des polyphénols issus d'une seule grande famille, par exemple :

- Les flavonoïdes (quercétine, kaempférol et dérivés) pour le Bois d'Arnette (*D. viscosa*), l'Ayapana (*A. triplinervis*), le Géranium rosa (*P. x graveolens*) et le Bois de Pêche Marron (*P. mauritianum*).
- Les acides phénoliques pour l'Ambaville (*H. ambavilla*) et le Jamblon (*S. cumini*).

Des polyphénols rares et spécifiques à certaines espèces, comme l'ayapanine, l'herniarine (*A. triplinervis*) ou encore l'acide asiatique (*P. mauritianum*) ont été détectés (parfois sous forme de traces).

La composition en polyphénols observée pour Ayapana (*A triplinervis*), Ambaville, Fleur Jaune, Géranium, Jamblon et Change Écorce est en accord avec les données de la littérature. Cependant, certains composés comme l'acide corosolique (pour le Bois de Pêche marron), la santine (pour le Bois d'Arnette) n'ont pu être détectés dans les préparations de plantes

effectuées au Laboratoire. Ces différences peuvent être dues aux différences d'environnement (terroir, climat), de préparation des extraits (solvants utilisés, procédé de transformation, masse de plante) ou encore aux méthodes de détection utilisées (spectrométrie de masse, chromatographie) (Morel et al., 2017; Picot et al., 2017; Ulla et al., 2017).

De manière générale, l'analyse en spectrométrie de masse a permis l'identification de différents types de polyphénols dans les préparations à base de plantes médicinales. Les procédés de transformation n'ont pas eu d'impact sur la nature des polyphénols qui ont été identifiés.

L'activité antioxydante des préparations de plantes médicinales a été évaluée dans un premier temps selon leur capacité à réduire un radical libre (DPPH). Nos résultats montrent que les principes actifs contenus dans les plantes médicinales exercent une activité antioxydante et ce, quel que soit le procédé de transformation utilisé (infusion, décoction ou extraits riches en polyphénols). Ce résultat est en accord avec les données de la littérature ayant souligné le potentiel antioxydant des huit plantes choisies dans le cadre de notre étude (Biswas et al., 2012; Mothana et al., 2010; Poullain et al., 2004; Priya et al., 2017). Les plantes médicinales ayant présenté une activité antioxydante élevée quel que soit le mode de préparation utilisé sont le Jamblon (*S. cumini*), le Bois de Pêche Marron (*P. mauritianum*) et le Géranium rosa (*P. x graveolens*). La capacité des préparations à réduire le radical libre dépend de la concentration finale en polyphénols. Aucune différence significative n'a été observée entre les infusions et les décoctions pour une même concentration donnée (25 µM). Cependant, l'évaluation des activités antioxydantes des infusions et décoctions sans standardisation de la concentration en polyphénols a mis en évidence une activité antioxydante significativement plus élevée pour les décoctions d'Ambaville (*H. ambavilla*), Ayapana (*A. triplinervis*) et (*P. x graveolens*). Ce résultat s'explique notamment par des teneurs plus élevées en polyphénols dans les décoctions.

L'analyse de l'impact de la présence de tisanes et d'extraits vis-à-vis de la lyse des globules rouges humains soumis à un stress oxydant (AAPH) a montré que toutes les préparations de plantes exercent un effet protecteur. De façon intéressante, l'inhibition de la lyse des globules rouges s'est révélée être significativement plus élevée pour les infusions de Bois d'Arnette (*D. viscosa*), de Fleur Jaune (*H. lanceolatum*), de Géranium rosa (*P. x graveolens*) et de Jamblon (*S. cumini*) prolongeant respectivement le temps de demi-vie des globules rouges de 6,98 ± 0,17 ; 3,77 ± 0,33 ; 6,35 ± 0,32 et 5,25 ± 0,16 heures.

Aucune cytotoxicité n'a été mise en évidence sur les préadipocytes en présence des infusions, décoctions ou extraits riches en polyphénols. D'autre part, l'analyse de la production de ROS intracellulaires par les préadipocytes murins soumis au stress oxydant a montré que :

- Toutes les préparations de plantes réduisent significativement la production de ROS intracellulaires associée à la présence de peroxyde d'hydrogène
- Les tisanes exercent un effet protecteur plus élevé que les extraits riches en polyphénols. Ce résultat peut s'expliquer par une meilleure biodisponibilité des polyphénols issus d'une extraction aqueuse. Parmi les tisanes, davantage de décoctions exercent une activité antioxydante et ce à des concentrations de 10 µM

Cette bioactivité observée sur les modèles *in vitro* peut s'expliquer par la présence de polyphénols connus pour avoir exercé des effets protecteurs dans les mêmes conditions expérimentales. Cette hypothèse est confortée par les travaux menés par Hatia *et al.,* au sein du Laboratoire (Hatia et al., 2014).

Un point important à noter dans notre cas est que la bioactivité observée lors de cette étude n'est pas exclusivement expliquée par la présence de polyphénols dans les plantes médicinales. En effet, les préparations de plantes ont fait l'objet d'une analyse en spectrométrie de masse ciblant spécifiquement les polyphénols, cependant d'autres composés comme les terpènes, vitamines, alcaloïdes et stérols pourraient aussi être présents dans les plantes et être à l'origine d'une activité antioxydante.

Dans le cadre de notre étude, des standards de polyphénols (quercétine, acide caféique et acide gallique) ont été utilisés dans un premier temps comme témoins positifs pour les différentes expérimentations (données non présentées dans l'article). Les différentes activités antioxydantes observées pour ces standards sont inférieures à ce qui est observé pour les préparations de plantes. Par exemple, pour le test d'inhibition de la lyse des globules rouges, l'augmentation du temps de demi-vie des globules rouges en présence de quercétine (25 µM) est de 4,20 ± 0,41 h alors que pour l'infusion de *P. x graveolens* (25 µM) (contenant majoritairement de la quercétine et des dérivés de quercétine) celle-ci est de 6,35 ± 0,32 h. Ce résultat peut suggérer l'implication d'autres composés (hors polyphénols) responsables de l'activité antioxydante observée. La forme (glycosylée ou non) sous laquelle les polyphénols sont présents a aussi son importance et pourrait expliquer cette différence. Il aurait été

intéressant de réaliser ce test avec un standard de mangiférine composant majoritaire des préparations d'*A. theiformis* afin de déterminer l'impact d'un polyphénol et de ses dérivés sur l'activité antioxydante. Ce résultat peut suggérer l'implication d'autres composés (hors polyphénols) responsables de l'activité antioxydante observée. La forme (glycosylée ou non) sous laquelle les polyphénols sont présents a aussi son importance et pourrait expliquer cette différence. Il aurait été intéressant de réaliser ce test avec un standard de mangiférine composant majoritaire des préparations d'*A. theiformis* afin de déterminer l'impact d'un polyphénol et de ses dérivés sur l'activité antioxydante.

Aussi, il n'est pas exclu que les polyphénols présents dans les préparations de plantes réagissent de façon cumulée ou synergique, comme le suggèrent différentes études (Cirico & Omaye, 2006; Gong et al., 2020; Saucier & Waterhouse, 1999).

Pour conclure, ces travaux ont mis en évidence la présence polyphénols connus pour leur bioactivité dans les préparations de plantes médicinales (infusions, décoctions et extraits riches en polyphénols). Une activité antioxydante a été observée pour toutes les préparations de plantes quel que soit le procédé de transformation utilisé. Cette activité antioxydante est en partie expliquée par la présence de polyphénols (détectés lors de l'analyse en spectrométrie de masse). Les résultats obtenus constituent une première approche ayant permis d'évaluer la bioactivité des plantes médicinales préparées selon un procédé de transformation traditionnel ou non.

Article de Revue

Date de soumission : prévue pour fin Décembre 2020 – Version DRAFT présentée dans ce manuscrit.

Objectifs

Les monocytes/ macrophages jouent un rôle majeur dans la survenue et la progression de l'athérosclérose. Il est possible de les considérer comme des facteurs initiateurs de l'athérosclérose (notamment au moment de la migration des monocytes vers la lésion) mais aussi comme des facteurs aggravants (lors de leur transformation en cellules spumeuses et leur participation à la formation du cœur nécrotico-lipidique (Moore et al., 2013; Takahashi et al., 2002).

Dans cet article de revue, une discussion est menée sur la véritable contribution de ce type cellulaire dans l'athérosclérose. En effet, un autre type cellulaire présent constitutivement dans la paroi des artères, les cellules musculaires lisses, semble tout aussi impliqué dans cette pathologie.

Au travers de cette revue seront confrontés deux visions mettant en avant soit l'implication des macrophages, soit celle des cellules musculaires lisses dans le processus d'athérosclérose.

biomedicines

MDPI

Review

Macrophages in atherosclerosis, first or second row players?

Eloïse Checkouri [1,2], Valentin Blanchard [1,3] and Olivier Meilhac [1*]

[1] Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérothrombose Thérapies Réunion Océan Indien (DéTROI), Sainte-Clotilde, La Réunion, Franc
[2] Habemus Papam, Food Industry, 97470 Saint-Benoit, La Réunion, France
[3] Departments of Medicine, Centre for Heart Lung Innovation, Providence Healthcare Research Institute, St Paul's Hospital, University of British Columbia, Vancouver, Canada.
* Correspondence: Olivier.meilhac@nserm.fr

Received: date; Accepted: date; Published: date – **DRAFT**

Abstract: Macrophages represent a cell type that has been widely described in the context of atherosclerosis since the earliest studies. However, their role, long considered to be major in the onset and aggravation of atherosclerosis, is currently proving to be controversial due to more recent discoveries involving another cell type that is a major constituent of the arterial walls: smooth muscle cells (SMCs). In this review, we will discuss the potential involvement of each of these two cell types in atherogenesis and later complications. Are macrophages the main actors of atherosclerosis? Could SMCs, described as second row players in the formation of atheroma, finally take the center stage in atherosclerosis? Is there only one culprit? Or is the crime the result of a collective action? Evidence for the involvement of macrophages and SMCs will be examined, as well as possible biases introduced by animal models.

Keywords: Macrophages; Smooth muscular cells; Atherosclerosis

1. Introduction

In the world, cardiovascular diseases represent about 31% of total death, constituting the first cause total mortality [1]. Atherosclerosis is the major cause of cardiovascular disease and stroke. At the origin of this process: a progressive accumulation of lipids and fibrous components within the arterial intima leading to their stiffening and eventually to their obstruction [2].

First, endothelial stress and the accumulation of cholesterol-rich lipoproteins containing apolipoprotein B in the subendothelial space trigger an immune and inflammatory response, promoting the recruitment of monocytes (macrophage precursors). Secondly, after their differentiation into macrophages, these cells participate in the clearance of the excess of LDL-cholesterol. Accumulation of LDL in the subendothelial area favors their oxidation and their subsequent unregulated uptake by macrophages (via the scavenger receptors), leading to the formation of lipid-laden cells called "foam cells".

The omnipresence of monocytes and macrophages in the literature at all stages of atherosclerosis suggests that this cell type is predominantly involved in this pathology. However, the central role of these cells in plaque formation and progression tends to be controversial. Unlike macrophages, vascular smooth muscle cells (VSMCs) are thought to prevent plaque rupture by means of their stabilizing properties of the fibrous cap [3]. Several recent studies using lineage-tracing techniques pointed at VSMCs and VSMC-derived cells as major contributors of atherosclerosis from early to late stages [4].

The purpose of this review is, on the basis of bibliographical data, to evaluate the role of macrophages and SMCs in atherosclerosis. In this work, we wanted to highlight the different arguments in favor of the involvement of each cell types at the different stage of atherogenesis.

At the beginning of atherosclerosis

Everything starts in the circulatory system. In a context still not very conducive to atherosclerosis, a first stress occurs at the level of the endothelium of the arteries: the shear stress. This stress is due to a set of mechanical phenomena (vortices, vortex) related to the blood flow at the curvatures of the arteries [5]. This "endothelial shear stress" is at the origin of a first disorganization of the endothelial cells. Despite their polygonal shape allowing them to adapt to a modified blood flow, endothelial cells located at the bifurcation zones are strongly impacted by mechanical stresses [6]. In this context, the endothelium is therefore more permeable to low-density lipoproteins (LDL). In case of hyperlipidemia, high blood levels of LDL-cholesterol (LDL-C) will promote their passage across the endothelium and their subsequent interaction with the extracellular matrix. This accumulation of cholesterol-rich lipoproteins in the subendothelial space will favor their modification by reactive oxygen species (ROS) and enzymes (lipases and myeloperoxidase). Modified LDL particles (in particular oxidized LDLs) will not be endocytosed by the regulated LDL-receptor pathway, but via scavenger receptors whose expression are not subjected to negative feedback loop. The formation of foam cells constitute the first step of early atheromatous lesions called fatty streaks [2].

Endothelial cells, responding to these stress conditions (presence of oxidized LDLs, shear stress, reactive oxygen species), initiate the secretion of cytokines (TNF-a, IL-1B, IL-6, IL-8) [7,8], chemokines (CCL2,CX3CL1) **[9–11]** and express adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) [12].This primary defense reaction aims at promoting the recruitment of leukocytes that play an important role in the development and exacerbation of atherosclerosis.

Monocytes as initiators of atherosclerosis

The implication of monocytes has been described as a risk factor for cardiovascular diseases, notably for coronary heart disease [13]. Dyslipidemia (including hypercholesterolemia) is a risk factor of atherosclerosis as it promotes LDL-C accumulation within the arterial wall [14]. Studies on animal models showed that hypercholesterolemia was associated with an increase in circulating monocytes and then would promote the aggravation of atherosclerosis [15]. Moreover, their presence in atherosclerotic lesions has been described in both humans and animal models [16–18]. Indeed, monocytes are reported to initiate the atherosclerotic process via different steps: rolling, adhesion, activation and migration through the activated endothelium.

Monocytes come from the differentiation and proliferation of hematopoietic stem and multipotential progenitor cells (HSPCs) from the bone marrow. Studies show that cellular environments associated with rheumatoid arthritis or hypercholesterolemia enhance HSPC differentiation into myeloid cells (monocytes and neutrophils) [19–21].

Monocytes can be categorized according to glycoproteins expressed at their membranes. Monocytes that will differentiate into macrophages express the high levels of the glycoprotein Ly6C (lymphocyte antigen 6C "Ly6C^{high}" in mice) known as CD14 humans (CD14^{++}CD16^{-}) and will actively contribute to atherosclerosis in contrast to monocytes expressing low Ly6C levels and CD14$^{+/low}$CD16^{+} for humans [22,23]; Ly6C^{high} and CD14^{++}CD16^{-} are considered as precursors of M1 macrophages producing inflammatory cytokines and leading to foam cell formation whereas Ly6C^{low} and CD14$^{+/low}$CD16^{+} were described as resident and patrolling cells, responding to infections, producing high levels of anti-inflammatory cytokines and able to remove damaged cells from the vasculature [24–26]. Recent studies put in light the conversion of monocytes Ly6C^{high} into Ly6C^{low} [27–29], an important process that may lead to atherosclerosis regression [30].

The trafficking of monocytes to the damaged area of the endothelium is regulated by interactions between secreted chemokine (C-C motif) ligands (CCLs) and chemokine (C-C motif) receptors (CCRs) present at the cell surface. Each monocyte subset has a different phenotype: CX3CR1^{low} and CCR2^{high} are associated with inflammatory monocytes (Ly6C^{high}; CD14^{++}CD16^{-}) whereas CX3CR1^{high} and CCR2^{low} are associated with resident monocytes [31]. It was described that CXC3CR1 expression is stimulated by CCL-2 and leads to higher adhesion of monocytes [32]. On the other side CCR2 determines the number of Ly6C^{high} cells and has an impact on the release of monocytes from the bone marrow even if it is not required for the monocyte migration [33].

Different models of CCLs or CCRs deficient mice put in light the role of these proteins in the monocyte recruitment and the development of atherosclerosis. For example, CCR2-/- mice showed a delay in clearance after an intramuscular injection of LDL-c (suggesting that CCR2 is essential in monocyte migration to the lesion) [34]. CX3CR1-/- apoE -/- mice model showed an impaired survival of Ly6Clow monocytes and enhanced atherosclerosis [35]. Furthermore, studies done after inhibition of CCL2, CX3CR1 and CCR5 in apoE-/- mice highlighted the contribution of CCL2, CX3CR1 and CCR5 in the monocyte accumulation process and their impact on monocyte differentiation [36,37]. Another experiment done by Gu *et al.* showed that CCL2 depletion in LDL-/- was associated with reduced lipid depositions (less 83%) in the aortas [38].

After reaching the damaged/activated endothelium, monocytes roll to the lesion by interacting with the P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) that can bind with P, E or L-selectins [39]. Other interactions, in particular with endothelial adhesion molecules contribute to monocyte anchoring and transendothelial migration. Indeed, the integrin-type cell adhesion molecules, leukocyte function-associated antigen (LFA-1) and very late antigen (VLA-4) respectively bind to intracellular adhesion molecule (ICAM-1,2,-3) and vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) or fibronectin [40,41]. Recent in vitro studies showed the implication of α-2,6 sialyltransferase 1 (ST6GAL1) in atherosclerosis related transendothelial migration [42].

In brief, in the atherosclerosis context, high levels of cholesterol and cytokines produced by the endothelium stimulate the production of two main subset of monocytes from the bone marrow. One of these subsets is known to be a precursor of an atherosclerosis aggravating phenotype of macrophages. Monocytes following the chemokine signalling roll, adhere and pass through to the activated endothelium.

"First come, first served! At the early stage of atherosclerosis, monocytes are recruited into endothelial lesions. It would be rational to think that these macrophages precursors, the first arrived on the scene, not only play a second row in atherosclerosis "

Vascular Smooth Muscle cells and early atherosclerosis

VSMCs form the medial layer of arteries and are responsible for arterial contractility by expressing contractile proteins including alpha-smooth muscle actin (αSMA) and smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC or myosin 11 (MYH11)) [43,44]. VSMCs also secrete extracellular matrix (ECM) proteins such as elastin, collagens and proteoglycans which can modulate the elastic properties of large arteries [3]. VSMCs also strongly contribute to diffuse intimal thickening (DIT) of human arteries throughout the years but this process begins already *in utero* and is universally present at the age of 2 [45,46]. DIT is thought to be a crucial step of lipid retention in early atherosclerosis as it occurs predominantly in atherosclerosis-prone arteries [47,48]. Interestingly, while medial VSMCs are elongated and spindle-shaped, VSMCs in DIT are less elongated and display a cobblestone morphology [49]. Moreover, DIT VMSCs have more synthetic organelles such as rough endoplasmic reticulum and ribosomes [50].This is consistent with the fact that DIT is abundantly composed of VSMC-derived secretory products such elastin and proteoglycans. In contrast, DIT lacks macrophages [46,51]. Atherogenic apoB100-containing lipoproteins such as LDLs enter the DIT and bind to the negatively-charged carbohydrate chains of VSMCs-derived proteoglycans via their

positively-charged apoB100 or apoE molecules [52–54]. As the first cells facing the arrival of blood lipids, synthetic DIT VSMCs undergo lipoprotein uptake. *In vitro* studies showed that synthetic VSMCs were more efficient to bind and accumulate lipoprotein cholesterol than contractile VSMCs, resulting in a higher propensity to become foam cells [4,55,56].

Owing to chronic lipid deposition into the arterial wall, DIT can progress to pathological intimal thickening (PIT) akin to an early atheromatous lesion [4]. At this stage of atherosclerosis, several cell types including endothelial cells, platelets, and inflammatory cells release proinflammatory mediators leading to an irreversible phenotype switch of VSMCs from quiescent contractile to proliferative- and synthetic-macrophage like cells [57,58].

VSMCs migrate from the media the intima, acquire a synthetic and phagocytic phenotype, and thus largely contribute to PIT, fibroatheroma and late atherosclerosis. According to the original "response-to-injury" hypothesis of atherogenesis, this migration of phenotypically-switching VSMCs occurs in part as a wound healing mechanism by overexpression of ECM components including proteoglycans [59]. However, many studies highlighted also a role of VSMC-derived cells in plaque growth and rupture.

VSMC phenotypic switch is modulated by transcription factors including myocardin (MYOCD) and its cofactor serum response factor (SRF), the two main mediators driving the SMC contractile phenotype [60,61], and Krüppel-like factor (KLF4) which is not expressed in contractile VSMCs. Wang *et al* showed that together, MYOCD and SRF form a ternary complex over the CArG-box elements located on the promoter region of genes coding for contraction-related protein [60]. In contrast, KLF4 promotes phenotypic transition of VSMCs by inhibiting MYOCD/SRF interaction in response to mediators like platelet-derived growth factor PDGF BB [62], oxidized phospholipids [63], cholesterol loading [64], interleukin (IL) 1-β [65], or in response to environmental changes related to cell-cell and cell-ECM interactions [66]. For example, in healthy conditions, a basal laminae composed of proteins such as collagen IV or laminin surrounds medial VSMCs and limits their growth [67]. During early atherosclerosis the degradation of this basal laminae leads to increased interactions between VSMCs integrins and collagen I/III of interstitial matrix [68]. Consistent with this, Kappart *et al.* demonstrated that integrin inhibition reduces neointima formation induced by VSMCs migration *in vivo* [69].

"First come, first served indeed! Despite macrophages are thought to be play the role of initiators of fatty streaks, VSMCs are naturally present in both medial and intimal layers. Moreover, as major cells of DIT, VSMCs and their secretory products involved in early lipid retention seem to be crucial for the atherogenesis."

At the origin of foam cell formation: Macrophages or SMC?

Atherosclerotic lesion is an environment where oxidative stress and inflammation occur. Through the contact with subendothelial ox-LDL-c, monocytes undergo proliferation, development and differentiation to macrophages influenced by environmental factors including the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and the chemokine CXC ligand 4 (CXCL4) **[70–72]**.

Depending on environmental conditions (presence of cytokines, LPS, oxidized lipids), monocyte differentiation may result in different macrophages phenotypes. For example, the better known phenotypes M1 (induced by T-helper 1 / Th1 cytokine signature) and M2 (induced by T-helper 2 / Th2 cytokine signature) macrophages respectively involved in atherosclerosis progression or resolution and some less known atheroprotective phenotypes (HA-mac ; M(Hb) ; Mhem) carrying out haemoglobin, cholesterol and erythrocyte clearance [73]. As a general observation studies on humans and mice put in light two major populations of macrophages: the M1 phenotype, sensitive to interferon, TNF-a and LPS, known to secrete high quantities of pro-inflammatory cytokines, and

the M2 phenotype, influenced by the cytokines IL-4 and IL-13, is more associated with the anti-inflammatory reaction [74,75]. The term "polarization" is commonly used in reference to their ability to switch to the other phenotype [74]. For instance, M2 macrophage polarization was described as mediated by the Stat6 pathway [76]. Oxidized LDL-c (ox-LDL) present in the atherosclerotic lesions also promotes monocyte differentiation into pro-inflammatory macrophages involving PPARγ expression [77]. Although the mechanisms of action of macrophages have been described, there is still a real paradigm on their classification **[78–80]**.

"An important point to note in the aggravation of atherosclerosis is this "cellular distress" caused by a massive secretion of cytokines leading to the dysfunction and death of the surrounding cells. At the origin of this phenomenon are the so-called "pro-inflammatory" macrophages. Depending on their level of differentiation, macrophages could aggravate or delay the progression of atherosclerosis. But what about VSMCs? "

VSMC-foam cell formation

Due to the expression of macrophage-specific markers by synthetic VSMCs **[81]**, the contribution of VSMC-derived foam cells to all plaque foam cells has long been underestimated or even ignored. VSMCs are now suggested to be the major cellular site of lipid accumulation leading to subsequent stages of atherosclerosis. First evidence is that VSMCs, unlike macrophages, contribute to initial lipid retention in the intima of atherosclerosis-susceptible arteries in utero as well as in infants and children [45,46,82]. VSMCs also contribute significantly to the foam cell population in advanced plaques of adults [48]. A major study from Allahverdian *et al.* revealed that in human coronary artery sections at least 50% of total intimal foam cells were SMC derived and that about 40% of CD68+ cells were of VSMC rather than myeloid origin [83]. They also showed that ABCA1 expression was significantly reduced in VSMC-foam cells but not in macrophages-foam cells suggesting that VSMCs might contain a much larger burden of lipids in atherosclerosis as they display an inability to release excess lipid via ABCA1 [83]. In line with this observation, a recent study found that TNF ligand-related molecule 1A (TL1A), a vascular endothelial growth inhibitor reducing neovascularization, was able to inhibit the development of atherosclerosis by regulating VSMC- (but not macrophage-) foam cell formation by activating ABCA1, ABCG1 and cholesterol efflux by a liver X Receptor (LXR)-dependent signalling pathway [84].

Several studies reported mechanisms and processes by which VSMCs may accelerate foam cell formation in atherosclerosis. First, the secretory properties of intimal synthetic VSMCs contribute to ECM formation by an increased proteoglycan production [45]. ApoB100-containing lipoproteins including LDL particles are retained and modified within the proteoglycan network built by VSMC via hydrophobic interactions [85,86]. In vitro studies showed that VSMCs-foam cell formation can occur irrespective of oxidative [87] or enzymatic [88] LDL modifications. However, enzymatic modification of LDL appears as a more potent stimulus than oxidative modification in terms of VSMCs-foam cells formation [89].

Unlike the early stage of DIT during which VSMCs are the only lipid-laden cells of intima, later stage lesions contain macrophages-foam cells derived from activated monocytes [48]. In vitro study from Vijayagopal *et al.* of VSMC-macrophage coculture showed that direct cell-cell contact significantly increases both cholesterol accumulation and synthesis in VSMCs [90]. A more recent report from Weinert et al. demonstrated that this cell-cell interaction might in part involve lysosomal transfer of cholesterol from macrophages into VSMCs [91] which furthermore increase their phagocytosis activity. Interestingly, Niu *et al.* also showed that extracellular vesicles released by macrophage foam cells could promote VSMC migration and adhesion via ERK and Akt kinases phosphorylation [92]. However, the authors did not investigate whether such extracellular vesicles were also able to promote VSMCs foam cell formation. In contrast, an early investigation reported that VSMCs were able to phagocyte cholesterol ester-rich droplets isolated from macrophage foam cells in a metabolic

activity-dependent manner [93]. A more recent study confirmed that macrophages were able to transfer surplus cholesterol toward adjacent VMSCs even in the absence of HDL or ABCA1 at the cell surface of macrophages [94].

"All recent investigations including lineage-tracing studies that can accurately estimate the number and the origin of each cell type in plaques consent that VSMCs are the principal contributors to form foam cells at all stages of atherosclerosis."

The scavenger receptors expression, a step towards foam cell formation

Foam cell presence is described at the early stages of atherosclerosis [95]. These cells are the result of an excessive and unregulated engorgement of modified cholesterol-rich lipoproteins (including ox-LDL) by macrophages [96]. It has been shown that ox-LDL also triggers surface expression of "scavenger receptors" such as scavenger receptor A (SRA), lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1), cluster of differentiation (CD) 36 (CD 146 and CD 68 for humans) leading to foam cell formation [97–100]. In vitro studies also put in light the close link between Toll-like receptors (TLR) pathway and foam cell formation argued in particular by the improvement of lipid accumulation in presence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) [101–103].This uptake, in contrast with the LDL receptor mechanism, has no feedback control [104]. Nonetheless, scavenger receptors don't only play a role in oxidized lipoprotein uptake, but they also act as lipid sensors [105].

The main scavenger receptors involved in atherosclerosis are presented in Table 1.

Table 1. The main scavenger receptors involved in atherosclerosis

Cell type	Receptor	Stimulus	Function	References
Macrophages	Scavenger receptor-A1 (SR-A1)	Visfatin, ox-LDL	Ox-LDL uptake, cell apoptosis, foam cell formation	[106–108]
	Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)	Ox-LDL, ER stress, modified lipoprotein, advanced glycation end-products (AGEs)	ox-LDL uptake, inhibition macrophage migration, improve foam cell formation	[109–112]
	CD 36	Ox-LDL, ox-phospholipids, IL-34, visfatin	Ox-LDL uptake, cytokine release, NLRP3 inflammasome activation, improve foam cell formation	[106,107,113,114]
	CD 68	Ox-LDL	Ox-LDL uptake, contributes to inflammation	[115,116]
	CD 146	Ox-LDL	Foam cell formation, macrophage retention	[117]
	TLR4	Ox-LDL, LPS, saturated fatty acids	Mediates inflammatory response	[118–120]
	Macrophage scavenger receptor -1 (MSR-1)	Native or modified LDL (acetylated, oxidized	Ox-LDL uptake	[121,122]

	Scavenger receptor-A1 (SR-A1)	Phorbol esters, ROS, ox-LDL,	Ox-LDL uptake, foam cell formation	[123,124]
SMC	CD 36	Free fatty acids (Oleic acid), ox-LDL	Free fatty acid and ox-LDL uptake, Foam cell formation	[125]
	Scavenger Receptor BI/II	Intracellular cholesterol content	Cholesterol ester uptake, apoB containing lipoproteins,	[126,127]
	Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)	LPS, TNF-a, IL-1b, IFN-y, ox-LDL, shear stress	SMC proliferation, ox-LDL uptake, foam cell formation	[110,128]

Ox-LDL uptake is followed by an enzymatic degradation in the late endosome/lysosome to form free cholesterol and fatty acids [129]. Free cholesterol can be reconditioned in cholesteryl esters by the acylCoA cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) and stocked in the endoplasmic reticulum. In homeostatic conditions, cholesterol efflux may occur via neutral cholesteryl ester hydrolase (NCEH) activity and free cholesterol transfer to ATP-Binding Cassette A1 (ABCA1), ABCG1 and scavenger receptor B1 (SR-B1). However, atherosclerosis context is associated with unbalanced lipid contents and promotes scavenger receptors expression to the detriment of cholesterol efflux mediators [130,131]. This unregulated lipid uptake and their partial degradation in the lysosomes, leads to endoplasmic reticulum (ER) stress mediated by unfolded protein response (UPR) and activation of "cholesterol-induced apoptosis" (involving caspases, Jun-N-terminal stress activated protein kinases (JNK), and the transcription factor CHOP) [132–134].

Nevertheless, red blood cells also constitute another substrate for foam cell formation. Indeed, glycophorin from the erythrocyte membrane is recognized by macrophage scavenger receptors. Beyond that, traces of erythrocytes at different stages of atherosclerosis (intimal thickening, fibrous cap atheroma, neovascularization, intraplaque hemorrhages) would argue their implication in promoting plaque initiation, progression, instability and rupture [135,136]. As a result, it is possible that the cholesterol responsible in foam cell formation may also come from damaged erythrocytes degradation by macrophages [137,138].

"- What can be added to this? The conclusion seems undeniable: the macrophages already present in large numbers in the fatty streak undergo the processes of plaque clearance. Unfortunately this unregulated uptake of cholesterol that is only partially degraded in the lysosomes leads them to transform into foamy cells a well-known driver of atherosclerosis.

-Macrophages are not the only cell type with scavenger receptors. Indeed, VSMCs are also able to transform themselves into foamy cells! "

CD36 is a major receptor for ox-LDL uptake by macrophages. Matsumoto *et al.* reported that certain but not all primary human aortic VSMCs were able to express CD36, suggesting a clonal difference between them [139]. During the same year, Ricciarelli and Azzi indicated that Vitamin E downregulated CD36 expression by reducing its promoter activity and led to a parallel reduction of ox-LDL uptake by human aortic VSMCs [140]. More recently, Xue *et al.* reported that hyperglycaemia-induced foam cell formation in VSMCs was mediated by CD36-related ox-LDL and associated with

increased oxidative stress and with the activation of the NF-κB pathway [141]. In addition to its LDL-C uptake capacity, CD36 is also able to induce VSMCs-foam cell formation by the uptake of free fatty acids such as oleic acid [125]. CD36 is likely the most important scavenger receptor in VSMCs as antisense oligonucleotides to CD36 mRNA are able to inhibit the uptake of fluorescent ox-LDL up to 80% [124].

VSMC-foam cells display several types of scavenger receptors involved in excess lipid loading. Like macrophages, SR-AI is present on VSMCs of both rabbits [142] and humans [143] atherosclerotic lesions. In human VSMCs, EGF and TGF-beta 1 together stimulate SR-AI activity in presence of either IGF 1 or PDGF BB [144]. Pitas' group showed that SR-AI mRNA expression in VSMCs was upregulated by redox-sensitive transcription factors such as NFKB activating protein-1 c-Jun and CCAAT enhancer-binding protein beta in presence of ox-LDL and ROS was correlated with cyclooxygenase-2 expression and calcium flux [123,145,146]. Although SR-AI is a key receptor in the uptake of LDL by macrophages, its involvement in the total cholesterol burden in VSMC appears to be negligible [147].

LOX-1 is present on VSMCs cell membrane and its expression is increased in human atherosclerotic lesions in response to ox-LDL and proinflammatory cytokines such as TNF-α, IL-1 and IFN-γ [148,149]. Hypertension and high blood cholesterol also induced LOX-1 expression in VSMCs [150,151]. Mukai *et al.* reported that heparin-binding EGF (HB-EGF) significantly increased LOX-1 expression and Ox-LDL uptake by promoting phosphorylation of ERK, p38 MAPK and Akt in VSMCs [152].

The scavenger receptor for phosphatidylserine and ox-LDL (SR-PSOX) is a transmembrane chemokine also known as CXCL16 present on human aortic VSMCs cell surface [153]. The increase in SR-PSOX levels at the cell surface of VSMCs is upregulated by IFN-γ and followed by an intracellular accumulation of ox-LDL [154]. Although this SR-PSOX has been identified as being responsible for ox-LDL uptake by VSMCs, studies are lacking to decipher the role of this receptor in the formation of VSMCs-derived foam cells.

Additional receptors such as receptors for advanced glycation end products (RAGE) [155], P2RY12 receptor [156] or LRP1 [157,158] have recently been suggested to be key mediators of VSMCs-derived foam cell formation but further investigations are needed to clarify their influence in atherosclerosis.

"Image evidence, there could indeed be a phenotypic change in VSMCs that can be observed by immunohistology!"

Our histological analyses on human carotids with atherosclerotic lesions showed areas where VSMCs present both the smooth muscle actin alpha (alpha SMA) specific in addition to the scavenger receptor CD 68 generally expressed by macrophages. Our results presented in Figure 1 suggest a phenotypic change in smooth muscle cells and their contribution to foam cell formation.

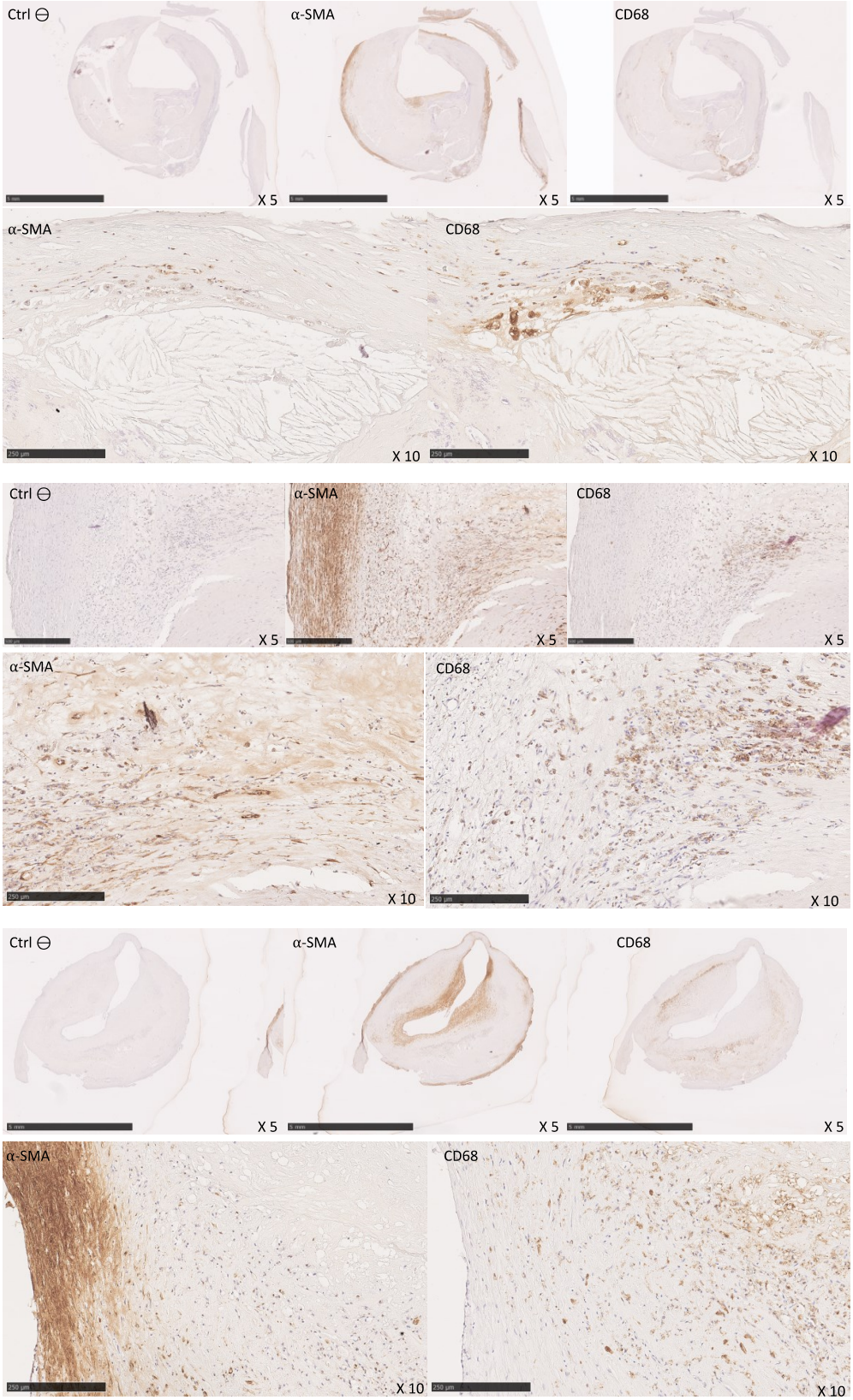


Figure 1. Immunohistological analysis of human carotids

330
331 **Towards the necrotic core formation**

332 Under the influence of various environmental factors such as cholesterol levels or high concentrations
333 of cytokines secreted by smooth muscle cells, macrophages trigger apoptosis and secondary necrosis.
334 Foam cells, damaged cells and debris constitute the necrotic core [2]. The development of the necrotic
335 core is also mediated by phagocytes efferocytosis. Consequently, early lesions display more effective
336 efferocytosis as compared to vulnerable plaques because of the lower number of apoptotic cells
337 [159,160]. At this stage of atherosclerosis, the implication of macrophages seems undeniable, both
338 by their presence at the very initiation of atheroma and by their contribution to inflammation and
339 necrotic core formation.
340
341 Senescence is a natural protective mechanism leading to cell division blockage to prevent
342 transmission of defects to progeny cells [161]. However, intimal foam cell senescence mediated by
343 DNA damage, mitochondrial deterioration or oxidative stress is deleterious at all stages of
344 atherosclerosis [162]. In line with this observation, the telomere erosion observed in atherosclerotic
345 plaques [163] probably induced by repeated cell divisions of clonal VSMCs could activate their
346 senescence [4,164]. Moreover, a recent in vitro study from Wang et al. showed that VSMCs senescence
347 promotes plaque formation and exhibits marked effects on the fibrous cap and necrotic core. They
348 also showed that these negative effects were blunted by reduced DNA damage induced by the
349 expression of telomeric repeat-binding factor-2 (TRF2) in cultured VSMCs as well as in mice [165].
350 8oxoG DNA glycosylase I (OGG1) is a base excision repair enzyme which displays anti-
351 atherosclerotic properties [166] Shah *et al.* showed that the necrotic core and total atherosclerosis area
352 were reduced in ApoE-/- mice expressing a VSMC-restricted OGG1 version compared with ApoE−/−
353 mice deficient in OGG1 [167], suggesting a major role of VSMCs senescence in necrotic core formation
354 irrespective of macrophages.
355
356 In addition to senescence, cell death including programmed apoptosis of VSMCs is a major event in
357 pathophysiology of atherosclerosis [164]. Several studies from Clarke et al. showed that VSMC
358 apoptosis alone increases necrotic cores volume of both developing and established plaques in apoE-
359 /- mice [168,169] whereas macrophages apoptosis appear to induce necrotic core growth only in
360 established plaques [170]. Furthermore, the potent efferocytosis capacity of human VSMCs is
361 significantly reduced by ox-LDL in vitro or hyperlipidaemia *in vivo* compared with macrophages
362 apoptotic cells [171,172]. This inefficient apoptotic-cell phagocytosis of VSMCs results in secondary
363 necrosis and the subsequent release of pro-inflammatory mediators further aggravating the
364 pathogenicity [172]. All these studies suggest that VSMCs can promote necrotic core development by
365 at least two distinct mechanisms involving both their apoptosis and reduced efferocytosis capacity.
366
367 **"Of mice and men"**

368 First analysis of human atherosclerotic lesions was done by Virchow in the 1800's. In his description
369 of the "Vertical section from a sclerotic plate in the aorta in process of fatty degeneration", Virchow
370 revealed the presence of proliferating cells, vascular smooth muscle cells ("spindle shape cells") and
371 foam cells ("fatty degeneration") at the advanced stage of atherosclerosis (Cellular Pathology as
372 based upon physiological and pathological histology - Rudolf Virchow - Page 359). This observation

373 constituted the first description of macrophage related. Almost a century later, Jonasson *et al.*, showed
374 the predominance of macrophages in the different parts of human atherosclerotic plaque by
375 immunohistochemistry. Macrophages represented 23.9 +/- 3.7 % of the fibrous cap and 60.3 +/- 5.1 %
376 of the necrotic core showing their undeniable role in atherosclerosis [173]. To understand the
377 mechanisms of lipid uptake by macrophages in atherosclerosis, Goldstein *et al.*, explored the
378 esterification of cholesterol in different cell types (macrophages or fibroblast) in presence of extracts
379 from human atherosclerotic plaques. Their results showed that macrophages were the only cell type
380 that took up the aortic extract and triggered cholesterol storage/esterification [174]. New
381 technological approaches by mass cytometry (CyTOF) highlighted the different clusters and subsets
382 of macrophages such as "resident-like","pro-inflammatory", "anti-inflammatory",'involved in foam
383 cell formation" or "involved in cholesterol efflux" [175,176].
384
385 While the first animal model of atherosclerosis was developed on rabbits, the use of murine models
386 has enabled the study of the implication of macrophages in atherosclerosis [177]. Models involving
387 bone marrow transplantation as Linton's in 1995 and Herijers in 1997 have introduced the hypothesis
388 that macrophages derived from hematopoietic cells play a crucial role in atherosclerosis. In these
389 pioneering experiments in the field of atherosclerosis, ApoE-/- and LDLR-/- mice were irradiated and
390 respectively transplanted with ApoE+/+ and C57BL/6 wild type bone marrow. In the two experiments
391 results showed a modulation of the lipid profile with downregulation of levels of circulating
392 cholesterol [38,178]. Bone marrow transplantation and mouse chimeric models are broadly used to
393 assess the role of macrophages in atherosclerosis. This can range from the study of macrophages pro-
394 inflammatory phenotypes to the study of their metabolic profile. For example, Kennedy *et al.*
395 highlighted the contribution of CCL3 in the aggravation of atherosclerosis on an LDLR-/- mouse
396 model transplanted with bone marrow from CCL3-/- donors [179]. In another study, Kubo et al.
397 showed the enhancement of atherosclerosis in LDLR-/- mice that received bone marrow from mice
398 with defective Fas-ligand expression (Ipr mice) [180]. Other studies such as those of Nong *et al.* and
399 Yu *et al*. have shown the importance of macrophage metabolism in the aggravation of atherosclerosis
400 notably by the functions of hepatic and lipoprotein lipases promoting foam cell formation and the
401 expression of apoE involved in cholesterol efflux and SRB-1 expression [181,182]. Furthermore, the
402 use of murine models allowed the exploration of macrophage subsets in atherosclerosis [183,184].

403 The implication of VSMC in atherosclerosis was established in the 1960's following their
404 identification in both normal and injured arteries of rats, rabbits and humans by electron microscopy
405 [185–187]. Most plaque cells including a large part of the abundant foam cells were therefore already
406 thought to be SMC-derived exhibiting an altered phenotype [188]. The further development of
407 immunohistochemistry has provided a clearer clue of the importance of each cell type in different
408 sections of atherosclerotic early or advanced plaques. Numerous studies showed that DIT and fibrous
409 cap was mainly constituted of spindle-shaped cells positive for the anti-SMC monoclonal antibodies
410 (anti-desmin, whereas most of the lipid and necrotic core cells including foamy cells were positive
411 for the anti-macrophage monoclonal antibody [173,189–192]. However, some of these studies pointed
412 at the limits of such methodology as many specific VSMC markers such as desmin and YPC 1/3.12
413 are not expressed on the entire VSMC population [173,190]. In addition, several investigations
414 revealed that VSMC can also express myeloid and lymphoid origin cell markers such as CD68 and

HLA-DR [64,193,194] leading to probable misinterpretations of histological sections of atherosclerotic plaques in the past. Recently, the development of an elegant methodology for the lineage tracing of VSMCs in animal models allowed them to precisely investigate the fate and role of VSMCs throughout the different phases of atherosclerosis [81,195,196]. This methodology relies on labelled probes targeting VSMC-specific gene promoters such as MYH11 and TAGLN14 enabling an unambiguous in vivo tracing of both VSMCs and VSMC-derived cells during atherogenesis [195,197].

Unlike macrophages that stem from bone marrow, VSMC are naturally present in the intima of the artery wall. Consequently, most animal studies on VSMCs consist in investigating their behavior after a previous vascular injury-induced lesion. ApoE-deficient mice are the gold-standard model for the investigation of atherosclerosis in vivo. Despite mice arteries are not composed of DIT which mainly consists in VSMCs in humans' atherosclerosis prone arteries, a recent study showed that VSMCs contribute to the majority of total foam cells in both WT and apoE−/− SMC lineage-tracing mice, suggesting that despite structural differences between humans and mice arteries, VSMCs play a central role in atherosclerosis in humans and murine models [198]. However, further investigations are needed in order to evaluate the contributions of VSMCs in other in vivo models such as rabbits and rats.

Arterial remodelling after vascular injury such as in atherosclerotic plaques leads to VSMC migration and proliferation towards the intima [199]. In line with this observation, clinical interventions such as percutaneous angioplasty can sometimes lead to rapid restenosis due to damages on the arterial endothelium [200]. In 1972, Stemerman & Ross established an in vivo model in order to investigate the arterial remodelling after vascular injury [201]. Arteries of non-human primates were exposed and cannulated with an intravascular balloon catheter to induce endothelial denudation and were then analysed by electronic microscopy. The migration of VSMCs from the media to the intima as well as their subsequent proliferation were observed within 4 days after injury. After 28 days, the injured intima consisted of multiple layers of VSMCs surrounded by collagen and elastic fibres. The similarities of this in vivo model of vascular injury to the early stages of atherosclerosis have allowed the role of SMCs in the development of atherosclerosis to be further investigated [201].

The limits of experimentations on animal models

Animal experimentation presents a particular interest in the context of the study of atherosclerosis. It allows the study of different influential factors in atherosclerosis such as the impact of the mutation of several genes or the impact of a diet on a population sharing the same intestinal flora (limitation of the influences of the environment and dietary habits). In addition, it allows ex vivo analysis (for example immunohistology) at early stages of atherosclerosis and can also permit to approach atherosclerosis in different ways (accelerated atherosclerosis models by proximal middle cerebral artery occlusion MCAO, or carotid abrasion) [202,203]. The study of Yin *et al.,* was designed to determine and compare the lipid profile of different animal models to a common lipid profile of Human dyslipidemia (Figure 2) [204].

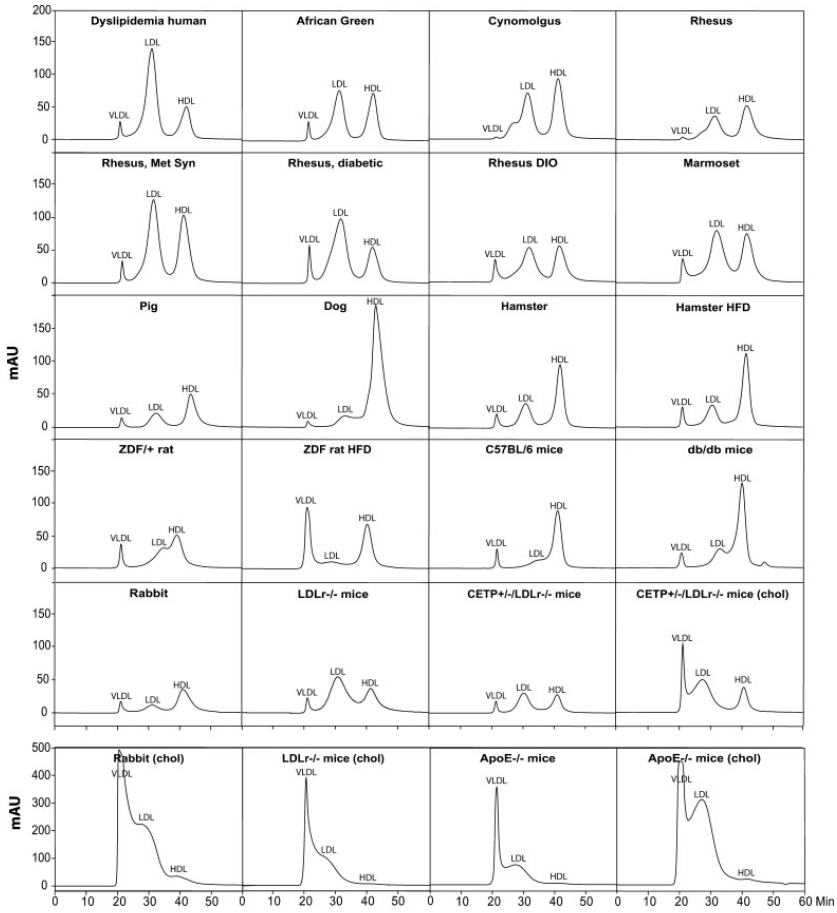


Figure 2. Lipid profiles of different animal models according to Yin *et al.*,

Among the profiles obtained, those of diabetic rhesus is the one that comes close to the human dyslipidemia profile. However, the rapid reproduction, the cost and the ability of the model to develop atherosclerosis are additional arguments in favor of the use of the murine model [205,206].

However, while the predominant circulating form of cholesterol in humans is LDLc, the major cholesterol-transporting lipoprotein in mice is HDL, likely owing to the absence of cholesteryl ester transfer protein (CETP) in mice. Beyond the strong differences between both humans and WT mice lipoprotein metabolism, other substantial differences between human and mice atherosclerosis are to be noted. Although in both humans and mice atherosclerosis appears to develop in regions with disturb blood flow, the primary sites of atherosclerosis in mice are the carotids and aorta, not the coronary arteries. Also, DIT is a major feature of pre-atherosclerosis in humans but is not present in mice. Plaque rupture followed by thrombosis is the main cause of heart attack in humans but is very rare in mouse models [207,208].

From formation to destruction of the fibrous cap: the crucial role of macrophages

During the necrotic core expansion, a second structure can be observed on the luminal side of the intima: the fibrous cap. Composed of macrophages and SMC extracellular matrix proteins (type I, III, IV and V collagen, elastin), this intimal thickening plays a determinant role in the atherosclerosis fate [209–211]. In fact, mechanical stress (shear stress, high lipid accumulation), and endogenous factors

493 (proteinases, abundance of macrophages, low population of SMC, low synthesis of collagen)
494 contributes to the thinning of the fibrous cap and promotes its rupture [212,213].
495 Macrophage-derived matrix metalloproteinases (MMPs) have long been observed in human
496 vulnerable atherosclerotic plaques and described as a factor promoting the destabilization of the
497 fibrous cap [214,215]. The type of secreted MMPs depends on macrophage phenotype and
498 environmental factors. For example, MMP-1 (collagenase-1), MMP-3 (stromelysin) and MMP-9
499 (gelatinase B) can be produced under the influence of ox-LDL, NF-κB activation or in response to
500 growth factors [216,217]. An imbalance between metalloproteinases production from macrophages
501 and levels in tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) dramatically leads to atherosclerosis aggravation
502 [218,219]. Furthermore, recent studies showed the implication of macrophages metalloproteinases
503 (MMP-8, MMP-9) on SMC proliferation and differentiation into osteoclasts suggesting that
504 macrophages would probably orchestrate SMC responses [220,221]. Macrophages and monocytes are
505 described as the major source of protease nexin-1 (PN-1) a serine protease inhibitor (serpin) that may
506 regulate the lesion fate [222,223].
507
508 The degradation of the fibrous cap is one of the elements at the origin of the rupture of the atheroma
509 plaque. This effect is largely due to the activity of metalloproteinases secreted by macrophages,
510 however, it should be noted that the type of macrophages is also a factor influencing plaque rupture.
511 For example, it has been shown that greater concentrations of macrophages expressing $CD68^+$,
512 $CD11c^+$ were found in patients suffering from symptomatic acute ischemic attack while
513 asymptomatic patients showed greater amounts of macrophages expressing $CD163^+$ [224]. Analysis
514 by Virmani *et al.*, demonstrated the influence of macrophages in the context of vulnerable plaques:
515 Thin Cap FibroAtheroma (TCFA) and ruptured plaques. Macrophages respectively constitute 14 +/-
516 10% and 26 +/- 20 % of TCFA (n=15) and ruptured plaques (n=25) whereas SMC represented 6.6 +/-
517 10.4 % and 0.002 +/- 0.004 % [225,226]. Furthermore, other studies put in light the correlation between
518 macrophages-derived-monocytes with the presence of ruptured plaques in patients suffering from
519 coronary artery disease [227,228].
520
521 **VSMCs are indissociable of fibrous cap formation and rupture**
522 The chronic deposition of LDLc into the intima results in pathological intimal thickening followed
523 by fribroatheroma characterized by the formation of the fibrous cap surrounding the necrotic core as
524 a protecting lid for plaque stability. A recent SMC lineage-tracing study in apoE-deficient mice
525 showed that in early stages of atherosclerosis the fibrous cap consists of 40 to 90% of VSMC-derived
526 cells and that a small but significant number of SMCs-derived cells expressed macrophage markers
527 after phenotype switching [229]. VSMCs located in the fibrous cap appear to maintain the fibrous cap
528 integrity and thickness by secreting proteoglycans and collagens [230]. In accordance with this
529 hypothesis Rheker *et al.* observed that VSMCs colocalize with collagen synthesis in fibrous caps in
530 human arteries [210]. Moreover, early evidence showed that a reduced number SMC results in plaque
531 thinning and vulnerability [231]. More recently, two SMC-lineage tracing studies highlighted that
532 both KLF4 and octamer-binding transcriptional factor 4 (OCT4), a key player involved in regulating
533 pluripotency in embryonic stem cells, respectively display pro- and anti-atherogenic properties due
534 to their effect on SMC phenotype and fibrous cap thickness. While KLF4 appears to decrease fibrous
535 cap thickness and plaque stability by promoting the phenotypic transition of SMC to mesenchymal 164

536 stem cells and macrophage like pro-inflammatory cells, OCT4 may activate SMC migration and
537 proliferation from the media to the lesion fibrous cap and therefore contribute to its consolidation
538 [196,232]. Intriguingly, Gomez *et al* showed that excessive inhibition of pro-inflammatory markers
539 such as IL-1 increases the number of macrophages, reduces both SMC and collagen content in fibrous
540 cap of apoE-deficient mice [233]. Interestingly, senescent VSMCs secret less collagen and can release
541 MMP-9 therefore contributing to the degradation of the structural matrix that normally strengthens
542 the fibrous cap. Although the role of VSMCs in the formation of fibrous plaque is undeniable, the
543 mechanisms by which they increase or decrease the fibrous cap thickness remains to be established.
544
545 **Intraplaque hemorrhage and neovascularization**

546 In the context of advanced atherosclerosis, intraplaque hemorrhage occurs. This emergence of fragile
547 vessels near the necrotic core enhances monocytes and macrophages invasion and promotes the red
548 blood cells deposition [234]. Finn et al., showed that intraplaque hemorrhage macrophages
549 (stimulated by hemoglobin) differ from necrotic core macrophages that tend to accumulate lipids.
550 Indeed, it has been observed that hemoglobin impacts macrophage differentiation and prevents foam
551 cell formation by downregulating the expression of scavenger receptors: a promising issue to
552 promote reverse cholesterol transport from the atheroma plaque [235].
553

554 It is well established that intraplaque neovessels originate from adventitial *vaso vasorum* close to the
555 vascular lesions [236]. Despite the structure of intraplaque neovessels lack VSMCs [237] a recent
556 evidence of a role of VSMCs in angiogenesis showed that both mRNA and protein levels of vascular
557 endothelial growth factor-A (VEGF-A) was upregulated in medial SMCs following PPARγ activation
558 by lipid mediators in early human atheromatous aorta [238,239]. Earlier in vitro studies have also
559 shown that VEGF-A can be expressed by SMCs and that endothelial cells cultured on collagen with
560 SMC-conditioned medium became spindle shaped, exhibited an increased proliferative activity and
561 organized a capillary-like branching cord structure in the collagen gel [240,241]. In addition, it has
562 been shown that SMCs can express angiopoietin-1, a glycoprotein promoting the formation of
563 tightened endothelial junctions, thereby reducing endothelial permeability and stabilizing vessels
564 [242]. Intriguingly, VSMCs can also express angiopoietin-2 [243]. In contrast with angiopoietin-1,
565 angiopoietin-2 may be associated with unstable plaque microvessels due to its association with an
566 increased MMP-2 activity [243].

567 Although further investigations are needed to understand precisely how VSMCs stimulate
568 intraplaque neovascularization, the studies cited above demonstrate the essential role of VSMCs and
569 their angiogenic activity in the formation of neovessels. Also, whether VSMCs improve or impair
570 neovessel stabilization remains unclear.
571
572 **Towards the plaque calcification**

573 Calcification is one of the processes that occurs in advanced plaques. Macrophages cytokines and
574 bone morphogenetic proteins contribute to plaque calcification by promoting osteogenic
575 differentiation of VSMC [244–246]. In addition, the presence of cholesterol crystals associated with
576 calcifications can be a potential marker of plaque vulnerability. Indeed, studies showed macrophages

accumulation associated with cholesterol crystals and calcifications in atherosclerotic lesions of patients suffering from acute coronary syndrome or myocardial infarction [247–249].

VSMCs are closely linked to both medial and intimal calcification [250]. Indeed, VSMCs can adopt a number of cell types besides macrophage-like cells, including osteogenic, chondrocytic, and osteoclastic cells, resulting in downregulation of contractile proteins such as smooth muscle protein-22α (SM22α) and αSMA [251,252] and gain of osteochondrogenic markers including osteopontin, osteocalcin, and alkaline phosphatase [250]. Osteogenesis is controlled by many cell regulatory proteins themselves regulated by physiological and mechanical stimuli. For example, Runx2, BMP2 are osteogenic markers inducing drive changes in VSMC phenotype and subsequent calcification [253,254]. Consistent with this, patients with a rare autosomal recessive disorder caused by a loss of MGP, an inhibitor of BMP2-mediated calcification, display more cartilage and vascular calcification than controls [255]. Among all physiological and mechanical changes promoting VSMC phenotypic switching toward osteogenic, chondrocytic and osteoclastic-like cellular phenotypes, ROS-induced oxidative stress [256,257], VSMCS senescence [258], mechanical stress [259,260] and apoptosis [261,262] appear as the most detrimental.

Conclusion

As described in this study, macrophages and smooth muscle cells play key roles in atherosclerosis. Recent studies suggest that the contribution of smooth muscle cells in atherosclerosis is explained in particular by their ability to change phenotype to form foamy cells or by their ability to weaken the fibrous cap. These elements are confirmed by older observations highlighting the contribution of VSMCs to the diffuse thickening of the intima in the early stages of atherosclerosis. At the end of this study, it is not really a competition between macrophages and VSMCs but rather complementary effects favoring atherosclerosis.

Author Contributions: For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used "Conceptualization, X.X. and Y.Y.; methodology, X.X.; validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.; formal analysis, X.X.; investigation, X.X.; resources, X.X.; data curation, X.X.; writing—original draft preparation, X.X.; writing—review and editing, X.X.; visualization, X.X.; supervision, X.X.; project administration, X.X.; funding acquisition, Y.Y. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript."

Funding: Please add: "This research received no external funding" or "This research was funded by NAME OF FUNDER, grant number XXX" and "The APC was funded by XXX". Check carefully that the details given are accurate and use the standard spelling of funding agency names at https://search.crossref.org/funding, any errors may affect your future funding.

Acknowledgments: In this section you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

621 **References**

622 1. Cardiovascular diseases Available online: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-
623 diseases/#tab=tab_1 (accessed on Dec 8, 2020).
624 2. Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature* **2000**, *407*, 233–241, doi:10.1038/35025203.
625 3. Bennett, M.R.; Sinha, S.; Owens, G.K. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. **2016**, 12.
626 4. Basatemur, G.L.; Jørgensen, H.F.; Clarke, M.C.H.; Bennett, M.R.; Mallat, Z. Vascular smooth muscle cells in
627 atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* **2019**, *16*, 727–744, doi:10.1038/s41569-019-0227-9.
628 5. Chatzizisis, Y.S.; Coskun, A.U.; Jonas, M.; Edelman, E.R.; Feldman, C.L.; Stone, P.H. Role of Endothelial
629 Shear Stress in the Natural History of Coronary Atherosclerosis and Vascular Remodeling: Molecular, Cellular,
630 and Vascular Behavior. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2007**, *49*, 2379–2393, doi:10.1016/j.jacc.2007.02.059.
631 6. Reidy, M.; Bowyer, D. Scanning electron microscopy of arteries The morphology of aortic endothelium in
632 haemodynamically stressed areas associated with branches. *Atherosclerosis* **1977**, *26*, 181–194, doi:10.1016/0021-
633 9150(77)90101-0.
634 7. Huang, R.B.; Gonzalez, A.L.; Eniola-Adefeso, O. Laminar shear stress elicit distinct endothelial cell E-
635 selectin expression pattern via TNFα and IL-1β activation. *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 999–1003,
636 doi:10.1002/bit.24746.
637 8. Sterpetti, A.V.; Cucina, A.; Morena, A.R.; Di Donna, S.; D'Angelo, L.S.; Cavalarro, A.; Stipa, S. Shear stress
638 increases the release of interleukin-1 and interleukin-6 by aortic endothelial cells. *Surgery* **1993**, *114*, 911–914.
639 9. Maus, U.; Henning, S.; Wenschuh, H.; Mayer, K.; Seeger, W.; Lohmeyer, J. Role of endothelial MCP-1 in
640 monocyte adhesion to inflamed human endothelium under physiological flow. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*
641 **2002**, *283*, H2584-2591, doi:10.1152/ajpheart.00349.2002.
642 10. Ylä-Herttuala, S.; Lipton, B.A.; Rosenfeld, M.E.; Särkioja, T.; Yoshimura, T.; Leonard, E.J.; Witztum, J.L.;
643 Steinberg, D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit
644 atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 5252–5256, doi:10.1073/pnas.88.12.5252.
645 11. Imaizumi, T.; Yoshida, H.; Satoh, K. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J.*
646 *Atheroscler. Thromb.* **2004**, *11*, 15–21, doi:10.5551/jat.11.15.
647 12. Chappell, D.C.; Varner, S.E.; Nerem, R.M.; Medford, R.M.; Alexander, R.W. Oscillatory shear stress
648 stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circ. Res.* **1998**, *82*, 532–539,
649 doi:10.1161/01.res.82.5.532.
650 13. Olivares, R.; Ducimetière, P.; Claude, J.R. Monocyte count: a risk factor for coronary heart disease? *Am. J.*
651 *Epidemiol.* **1993**, *137*, 49–53, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a116601.
652 14. Nielsen, L.B. Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and risk of atherosclerosis.
653 *Atherosclerosis* **1996**, *123*, 1–15, doi:10.1016/0021-9150(96)05802-9.
654 15. Swirski, F.K.; Libby, P.; Aikawa, E.; Alcaide, P.; Luscinskas, F.W.; Weissleder, R.; Pittet, M.J. Ly-6Chi
655 monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata.
656 *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 195–205, doi:10.1172/JCI29950.
657 16. Cookson, F.B. The Origin of Foam Cells in Atherosclerosis. *Br. J. Exp. Pathol.* **1971**, *52*, 62–69.
658 17. Gerrity, R.G. The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic
659 lesions. *Am. J. Pathol.* **1981**, *103*, 191–200.
660 18. Taylor, R.G.; Lewis, J.C. Endothelial cell proliferation and monocyte adhesion to atherosclerotic lesions of
661 white carneau pigeons. *Am. J. Pathol.* **1986**, *125*, 152–160.

662 19. Dragoljevic, D.; Kraakman, M.J.; Nagareddy, P.R.; Ngo, D.; Shihata, W.; Kammoun, H.L.; Whillas, A.; Lee,
663 M.K.S.; Al-Sharea, A.; Pernes, G.; et al. Defective cholesterol metabolism in haematopoietic stem cells promotes
664 monocyte-driven atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Eur. Heart J.* **2018**, *39*, 2158–2167,
665 doi:10.1093/eurheartj/ehy119.
666 20. Tolani, S.; Pagler, T.A.; Murphy, A.J.; Bochem, A.E.; Abramowicz, S.; Welch, C.; Nagareddy, P.R.; Holleran,
667 S.; Hovingh, G.K.; Kuivenhoven, J.A.; et al. Hypercholesterolemia and reduced HDL-C promote hematopoietic
668 stem cell proliferation and monocytosis: studies in mice and FH children. *Atherosclerosis* **2013**, *229*, 79–85,
669 doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.031.
670 21. Tall, A.R.; Yvan-Charvet, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*,
671 104–116, doi:10.1038/nri3793.
672 22. Hilgendorf, I.; Swirski, F.K.; Robbins, C.S. Monocyte Fate in Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*
673 **2015**, *35*, 272–279, doi:10.1161/ATVBAHA.114.303565.
674 23. Cappellari, R.; D'Anna, M.; Bonora, B.M.; Rigato, M.; Cignarella, A.; Avogaro, A.; Fadini, G.P. Shift of
675 monocyte subsets along their continuum predicts cardiovascular outcomes. *Atherosclerosis* **2017**, *266*, 95–102,
676 doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.09.032.
677 24. Imhof, B.A.; Jemelin, S.; Ballet, R.; Vesin, C.; Schapira, M.; Karaca, M.; Emre, Y. CCN1/CYR61-mediated
678 meticulous patrolling by Ly6Clow monocytes fuels vascular inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**,
679 *113*, E4847-4856, doi:10.1073/pnas.1607710113.
680 25. Thomas, G.; Tacke, R.; Hedrick, C.C.; Hanna, R.N. Nonclassical patrolling monocyte function in the
681 vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2015**, *35*, 1306–1316, doi:10.1161/ATVBAHA.114.304650.
682 26. Horckmans, M.; Ring, L.; Duchene, J.; Santovito, D.; Schloss, M.J.; Drechsler, M.; Weber, C.; Soehnlein, O.;
683 Steffens, S. Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a
684 reparative phenotype. *Eur. Heart J.* **2017**, *38*, 187–197, doi:10.1093/eurheartj/ehw002.
685 27. Lessard, A.-J.; LeBel, M.; Egarnes, B.; Préfontaine, P.; Thériault, P.; Droit, A.; Brunet, A.; Rivest, S.; Gosselin,
686 J. Triggering of NOD2 Receptor Converts Inflammatory Ly6Chigh into Ly6Clow Monocytes with Patrolling
687 Properties. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 1830–1843, doi:10.1016/j.celrep.2017.08.009.
688 28. Polletti, S.; Natoli, G. Understanding Spontaneous Conversion: The Case of the Ly6C− Monocyte. *Immunity*
689 **2017**, *46*, 764–766, doi:10.1016/j.immuni.2017.04.010.
690 29. Yang, W.; Tao, Y.; Wu, Y.; Zhao, X.; Ye, W.; Zhao, D.; Fu, L.; Tian, C.; Yang, J.; He, F.; et al. Neutrophils
691 promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nat. Commun.*
692 **2019**, *10*, 1076, doi:10.1038/s41467-019-09046-8.
693 30. Rahman, K.; Vengrenyuk, Y.; Ramsey, S.A.; Vila, N.R.; Girgis, N.M.; Liu, J.; Gusarova, V.; Gromada, J.;
694 Weinstock, A.; Moore, K.J.; et al. Inflammatory Ly6Chi monocytes and their conversion to M2 macrophages
695 drive atherosclerosis regression. *J. Clin. Invest.* **2017**, *127*, 2904–2915, doi:10.1172/JCI75005.
696 31. Geissmann, F.; Jung, S.; Littman, D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct
697 migratory properties. *Immunity* **2003**, *19*, 71–82, doi:10.1016/s1074-7613(03)00174-2.
698 32. Green, S.R.; Han, K.H.; Chen, Y.; Almazan, F.; Charo, I.F.; Miller, Y.I.; Quehenberger, O. The CC chemokine
699 MCP-1 stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1
700 via p38 MAPK. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2006**, *176*, 7412–7420, doi:10.4049/jimmunol.176.12.7412.
701 33. Serbina, N.V.; Pamer, E.G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires
702 signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* **2006**, *7*, 311–317, doi:10.1038/ni1309.

34. O, S.; Y, D.; M, B.-N.; G, H.; If, C.; Y, S. In CCR2-/- mice monocyte recruitment and egress of LDL cholesterol in vivo is impaired. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *300*, 477–481, doi:10.1016/s0006-291x(02)02862-0.
35. Landsman, L.; Bar-On, L.; Zernecke, A.; Kim, K.-W.; Krauthgamer, R.; Shagdarsuren, E.; Lira, S.A.; Weissman, I.L.; Weber, C.; Jung, S. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* **2009**, *113*, 963–972, doi:10.1182/blood-2008-07-170787.
36. Combadière, C.; Potteaux, S.; Rodero, M.; Simon, T.; Pezard, A.; Esposito, B.; Merval, R.; Proudfoot, A.; Tedgui, A.; Mallat, Z. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* **2008**, *117*, 1649–1657, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.745091.
37. Aiello, R.J.; Bourassa, P.A.; Lindsey, S.; Weng, W.; Natoli, E.; Rollins, B.J.; Milos, P.M. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1999**, *19*, 1518–1525, doi:10.1161/01.atv.19.6.1518.
38. Gu, L.; Okada, Y.; Clinton, S.K.; Gerard, C.; Sukhova, G.K.; Libby, P.; Rollins, B.J. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell* **1998**, *2*, 275–281, doi:10.1016/s1097-2765(00)80139-2.
39. Huo, Y.; Xia, L. P-selectin glycoprotein ligand-1 plays a crucial role in the selective recruitment of leukocytes into the atherosclerotic arterial wall. *Trends Cardiovasc. Med.* **2009**, *19*, 140–145, doi:10.1016/j.tcm.2009.07.006.
40. Yusuf-Makagiansar, H.; Anderson, M.E.; Yakovleva, T.V.; Murray, J.S.; Siahaan, T.J. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 146–167, doi:10.1002/med.10001.
41. Ronald, J.A.; Ionescu, C.V.; Rogers, K.A.; Sandig, M. Differential regulation of transendothelial migration of THP-1 cells by ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4. *J. Leukoc. Biol.* **2001**, *70*, 601–609.
42. Zhang, J.; Liu, Y.; Deng, X.; Chen, L.; Yang, X.; Yu, C. ST6GAL1 negatively regulates monocyte transendothelial migration and atherosclerosis development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *500*, 249–255, doi:10.1016/j.bbrc.2018.04.053.
43. Fatigati, V.; Murphy, R.A. Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 14383–14388.
44. Kargacin, G.J.; Cooke, P.H.; Abramson, S.B.; Fay, F.S. Periodic organization of the contractile apparatus in smooth muscle revealed by the motion of dense bodies in single cells. *J. Cell Biol.* **1989**, *108*, 1465–1475, doi:10.1083/jcb.108.4.1465.
45. Nakashima, Y.; Fujii, H.; Sumiyoshi, S.; Wight, T.N.; Sueishi, K. Early Human Atherosclerosis: Accumulation of Lipid and Proteoglycans in Intimal Thickenings Followed by Macrophage Infiltration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 1159–1165, doi:10.1161/ATVBAHA.106.134080.
46. Ikari, Y.; McManus, B.M.; Kenyon, J.; Schwartz, S.M. Neonatal intima formation in the human coronary artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1999**, *19*, 2036–2040, doi:10.1161/01.atv.19.9.2036.
47. Wilens, S.L. The nature of diffuse intimal thickening of arteries. *Am. J. Pathol.* **1951**, *27*, 825–839.
48. Pryma, C.S.; Ortega, C.; Dubland, J.A.; Francis, G.A. Pathways of smooth muscle foam cell formation in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **2019**, *30*, 117–124, doi:10.1097/MOL.0000000000000574.
49. Rensen, S.S.M.; Doevendans, P. a. F.M.; van Eys, G.J.J.M. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth. Heart J. Mon. J. Neth. Soc. Cardiol. Neth. Heart Found.* **2007**, *15*, 100–108,

744 doi:10.1007/BF03085963.
745 50. Mosse, P.R.; Campbell, G.R.; Wang, Z.L.; Campbell, J.H. Smooth muscle phenotypic expression in human
746 carotid arteries. I. Comparison of cells from diffuse intimal thickenings adjacent to atheromatous plaques with
747 those of the media. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **1985**, *53*, 556–562.
748 51. Stary, H.C.; Chandler, A.B.; Glagov, S.; Guyton, J.R.; Insull, W.; Rosenfeld, M.E.; Schaffer, S.A.; Schwartz,
749 C.J.; Wagner, W.D.; Wissler, R.W. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis.
750 A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart
751 Association. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.* **1994**, *14*, 840–856, doi:10.1161/01.atv.14.5.840.
752 52. Skålén, K.; Gustafsson, M.; Rydberg, E.K.; Hultén, L.M.; Wiklund, O.; Innerarity, T.L.; Borén, J.
753 Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* **2002**, *417*, 750–754,
754 doi:10.1038/nature00804.
755 53. Ji, Z.S.; Dichek, H.L.; Miranda, R.D.; Mahley, R.W. Heparan sulfate proteoglycans participate in hepatic
756 lipaseand apolipoprotein E-mediated binding and uptake of plasma lipoproteins, including high density
757 lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 31285–31292, doi:10.1074/jbc.272.50.31285.
758 54. O'Brien, K.D.; Olin, K.L.; Alpers, C.E.; Chiu, W.; Ferguson, M.; Hudkins, K.; Wight, T.N.; Chait, A.
759 Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques:
760 colocalization of biglycan with apolipoproteins. *Circulation* **1998**, *98*, 519–527, doi:10.1161/01.cir.98.6.519.
761 55. Campbell, J.H.; Reardon, M.F.; Campbell, G.R.; Nestel, P.J. Metabolism of atherogenic lipoproteins by
762 smooth muscle cells of different phenotype in culture. *Arterioscler. Dallas Tex* **1985**, *5*, 318–328,
763 doi:10.1161/01.atv.5.4.318.
764 56. Campbell, J.H.; Popadynec, L.; Nestel, P.J.; Campbell, G.R. Lipid accumulation in arterial smooth muscle
765 cells. Influence of phenotype. *Atherosclerosis* **1983**, *47*, 279–295, doi:10.1016/0021-9150(83)90059-x.
766 57. Rudijanto, A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Medica*
767 *Indones.* **2007**, *39*, 86–93.
768 58. Allahverdian, S.; Chaabane, C.; Boukais, K.; Francis, G.A.; Bochaton-Piallat, M.-L. Smooth muscle cell fate
769 and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **2018**, *114*, 540–550, doi:10.1093/cvr/cvy022.
770 59. Andreeva, E.R.; Pugach, I.M.; Orekhov, A.N. Collagen-synthesizing cells in initial and advanced
771 atherosclerotic lesions of human aorta. *Atherosclerosis* **1997**, *130*, 133–142, doi:10.1016/s0021-9150(96)06056-x.
772 60. Wang, D.; Chang, P.S.; Wang, Z.; Sutherland, L.; Richardson, J.A.; Small, E.; Krieg, P.A.; Olson, E.N.
773 Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell*
774 **2001**, *105*, 851–862, doi:10.1016/s0092-8674(01)00404-4.
775 61. Pipes, G.C.T.; Creemers, E.E.; Olson, E.N. The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile
776 regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1545–1556, doi:10.1101/gad.1428006.
777 62. Liu, Y.; Sinha, S.; McDonald, O.G.; Shang, Y.; Hoofnagle, M.H.; Owens, G.K. Kruppel-like factor 4 abrogates
778 myocardin-induced activation of smooth muscle gene expression. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 9719–9727,
779 doi:10.1074/jbc.M412862200.
780 63. Pidkovka, N.A.; Cherepanova, O.A.; Yoshida, T.; Alexander, M.R.; Deaton, R.A.; Thomas, J.A.; Leitinger,
781 N.; Owens, G.K. Oxidized phospholipids induce phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vivo
782 and in vitro. *Circ. Res.* **2007**, *101*, 792–801, doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.152736.
783 64. Rong, J.X.; Shapiro, M.; Trogan, E.; Fisher, E.A. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to
784 a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 13531–13536,

785 doi:10.1073/pnas.1735526100.
786 65. Alexander, M.R.; Murgai, M.; Moehle, C.W.; Owens, G.K. Interleukin-1β modulates smooth muscle cell
787 phenotype to a distinct inflammatory state relative to PDGF-DD via NF-κB-dependent mechanisms. *Physiol.*
788 *Genomics* **2012**, *44*, 417–429, doi:10.1152/physiolgenomics.00160.2011.
789 66. Owens, G.K.; Kumar, M.S.; Wamhoff, B.R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell
790 differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 767–801, doi:10.1152/physrev.00041.2003.
791 67. Moiseeva, E.P. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc. Res.*
792 **2001**, *52*, 372–386, doi:10.1016/s0008-6363(01)00399-6.
793 68. Orr, A.W.; Lee, M.Y.; Lemmon, J.A.; Yurdagul, A.; Gomez, M.F.; Bortz, P.D.S.; Wamhoff, B.R. Molecular
794 mechanisms of collagen isotype-specific modulation of smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc.*
795 *Biol.* **2009**, *29*, 225–231, doi:10.1161/ATVBAHA.108.178749.
796 69. Kappert, K.; Blaschke, F.; Meehan, W.P.; Kawano, H.; Grill, M.; Fleck, E.; Hsueh, W.A.; Law, R.E.; Graf, K.
797 Integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 mediate VSMC migration and are elevated during neointima formation
798 in the rat aorta. *Basic Res. Cardiol.* **2001**, *96*, 42–49, doi:10.1007/s003950170076.
799 70. Hamilton, J.A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*,
800 533–544, doi:10.1038/nri2356.
801 71. Fuhrman, B.; Partoush, A.; Volkova, N.; Aviram, M. Ox-LDL induces monocyte-to-macrophage
802 differentiation in vivo: Possible role for the macrophage colony stimulating factor receptor (M-CSF-R).
803 *Atherosclerosis* **2008**, *196*, 598–607, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.06.026.
804 72. Domschke, G.; Gleissner, C.A. CXCL4-induced macrophages in human atherosclerosis. *Cytokine* **2019**, *122*,
805 154141, doi:10.1016/j.cyto.2017.08.021.
806 73. Chistiakov, D.A.; Bobryshev, Y.V.; Orekhov, A.N. Changes in transcriptome of macrophages in
807 atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* **2015**, *19*, 1163–1173, doi:10.1111/jcmm.12591.
808 74. Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S.-A.; Mardani, F.; Seifi,
809 B.; Mohammadi, A.; Afshari, J.T.; Sahebkar, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and
810 disease. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 6425–6440, doi:10.1002/jcp.26429.
811 75. Orecchioni, M.; Ghosheh, Y.; Pramod, A.B.; Ley, K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in
812 M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS–) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front. Immunol.* **2019**, *10*,
813 doi:10.3389/fimmu.2019.01084.
814 76. Yu, T.; Gan, S.; Zhu, Q.; Dai, D.; Li, N.; Wang, H.; Chen, X.; Hou, D.; Wang, Y.; Pan, Q.; et al. Modulation
815 of M2 macrophage polarization by the crosstalk between Stat6 and Trim24. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4353,
816 doi:10.1038/s41467-019-12384-2.
817 77. Radhika, A.; Jacob, S.S.; Sudhakaran, P.R. Influence of oxidatively modified LDL on monocyte-macrophage
818 differentiation. *Mol. Cell. Biochem.* **2007**, *305*, 133–143, doi:10.1007/s11010-007-9536-0.
819 78. Wang, Y.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Zhang, J.; Qiao, R.R.; Xu, M.; Yang, N.; Gao, L.; Qiao, H.; Gao, M.; et al.
820 Optical/MRI dual-modality imaging of M1 macrophage polarization in atherosclerotic plaque with MARCO-
821 targeted upconversion luminescence probe. *Biomaterials* **2019**, *219*, 119378,
822 doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119378.
823 79. Mills, C.D.; Kincaid, K.; Alt, J.M.; Heilman, M.J.; Hill, A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2
824 paradigm. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2000**, *164*, 6166–6173, doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166.
825 80. Lin, J.-D.; Nishi, H.; Poles, J.; Niu, X.; Mccauley, C.; Rahman, K.; Brown, E.J.; Yeung, S.T.; Vozhilla, N.;

826 Weinstock, A.; et al. Single-cell analysis of fate-mapped macrophages reveals heterogeneity, including stem-like
827 properties, during atherosclerosis progression and regression. *JCI Insight* **2019**, *4*, doi:10.1172/jci.insight.124574.
828 81. Feil, S.; Fehrenbacher, B.; Lukowski, R.; Essmann, F.; Schulze-Osthoff, K.; Schaller, M.; Feil, R.
829 Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circ. Res.*
830 **2014**, *115*, 662–667, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.304634.
831 82. Nakashima, Y.; Chen, Y.-X.; Kinukawa, N.; Sueishi, K. Distributions of diffuse intimal thickening in human
832 arteries: preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.*
833 **2002**, *441*, 279–288, doi:10.1007/s00428-002-0605-1.
834 83. Allahverdian, S.; Chehroudi, A.C.; McManus, B.M.; Abraham, T.; Francis, G.A. Contribution of intimal
835 smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation*
836 **2014**, *129*, 1551–1559, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005015.
837 84. Zhao, D.; Li, J.; Xue, C.; Feng, K.; Liu, L.; Zeng, P.; Wang, X.; Chen, Y.; Li, L.; Zhang, Z.; et al. TL1A inhibits
838 atherosclerosis in apoE-deficient mice by regulating the phenotype of vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*
839 **2020**, *295*, 16314–16327, doi:10.1074/jbc.RA120.015486.
840 85. Oörni, K.; Posio, P.; Ala-Korpela, M.; Jauhiainen, M.; Kovanen, P.T. Sphingomyelinase induces aggregation
841 and fusion of small very low-density lipoprotein and intermediate-density lipoprotein particles and increases
842 their retention to human arterial proteoglycans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*, 1678–1683,
843 doi:10.1161/01.ATV.0000168912.42941.60.
844 86. Ismail, N.A.; Alavi, M.Z.; Moore, S. Lipoprotein-proteoglycan complexes from injured rabbit aortas
845 accelerate lipoprotein uptake by arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **1994**, *105*, 79–87, doi:10.1016/0021-
846 9150(94)90010-8.
847 87. Argmann, C.A.; Sawyez, C.G.; Li, S.; Nong, Z.; Hegele, R.A.; Pickering, J.G.; Huff, M.W. Human smooth
848 muscle cell subpopulations differentially accumulate cholesteryl ester when exposed to native and oxidized
849 lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24*, 1290–1296, doi:10.1161/01.ATV.0000131260.80316.37.
850 88. Klouche, M.; Rose-John, S.; Schmiedt, W.; Bhakdi, S. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces
851 human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation* **2000**, *101*,
852 1799–1805, doi:10.1161/01.cir.101.15.1799.
853 89. Chellan, B.; Rojas, E.; Zhang, C.; Hofmann Bowman, M.A. Enzyme-modified non-oxidized LDL (ELDL)
854 induces human coronary artery smooth muscle cell transformation to a migratory and osteoblast-like phenotype.
855 *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 11954, doi:10.1038/s41598-018-30073-w.
856 90. Vijayagopal, P.; Glancy, D.L. Macrophages stimulate cholesteryl ester accumulation in cocultured smooth
857 muscle cells incubated with lipoprotein-proteoglycan complex. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1996**, *16*, 1112–
858 1121, doi:10.1161/01.atv.16.9.1112.
859 91. Weinert, S.; Poitz, D.M.; Auffermann-Gretzinger, S.; Eger, L.; Herold, J.; Medunjanin, S.; Schmeisser, A.;
860 Strasser, R.H.; Braun-Dullaeus, R.C. The lysosomal transfer of LDL/cholesterol from macrophages into vascular
861 smooth muscle cells induces their phenotypic alteration. *Cardiovasc. Res.* **2013**, *97*, 544–552,
862 doi:10.1093/cvr/cvs367.
863 92. Niu, C.; Wang, X.; Zhao, M.; Cai, T.; Liu, P.; Li, J.; Willard, B.; Zu, L.; Zhou, E.; Li, Y.; et al. Macrophage
864 Foam Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Adhesion. *J. Am.*
865 *Heart Assoc.* **2016**, *5*, doi:10.1161/JAHA.116.004099.
866 93. Wolfbauer, G.; Glick, J.M.; Minor, L.K.; Rothblat, G.H. Development of the smooth muscle foam cell: uptake

867 of macrophage lipid inclusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 7760–7764, doi:10.1073/pnas.83.20.7760.
868 94. He, C.; Jiang, H.; Song, W.; Riezman, H.; Tontonoz, P.; Weston, T.A.; Guagliardo, P.; Kim, P.H.; Jung, R.;
869 Heizer, P.; et al. Cultured macrophages transfer surplus cholesterol into adjacent cells in the absence of serum
870 or high-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117*, 10476–10483, doi:10.1073/pnas.1922879117.
871 95. Napoli, C.; D'Armiento, F.P.; Mancini, F.P.; Postiglione, A.; Witztum, J.L.; Palumbo, G.; Palinski, W. Fatty
872 streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal
873 accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early
874 atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 2680–2690, doi:10.1172/JCI119813.
875 96. Brown, M.S.; Basu, S.K.; Falck, J.R.; Ho, Y.K.; Goldstein, J.L. The scavenger cell pathway for lipoprotein
876 degradation: Specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages.
877 *J. Supramol. Struct.* **1980**, *13*, 67–81, doi:10.1002/jss.400130107.
878 97. Brown, M.; Goldstein, J. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **1986**, *232*, 34–
879 47, doi:10.1126/science.3513311.
880 98. Kattoor, A.J.; Pothineni, N.V.K.; Palagiri, D.; Mehta, J.L. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr.*
881 *Atheroscler. Rep.* **2017**, *19*, 42, doi:10.1007/s11883-017-0678-6.
882 99. Tontonoz, P.; Nagy, L.; Alvarez, J.G.; Thomazy, V.A.; Evans, R.M. PPARgamma promotes
883 monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **1998**, *93*, 241–252, doi:10.1016/s0092-
884 8674(00)81575-5.
885 100. Diaz, S.; Higa, H.H.; Hayes, B.K.; Varki, A. O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids. 7- and 9-o-
886 acetylation of alpha 2,6-linked sialic acids on endogenous N-linked glycans in rat liver Golgi vesicles. *J. Biol.*
887 *Chem.* **1989**, *264*, 19416–19426.
888 101. Choi, S.-H.; Harkewicz, R.; Lee, J.H.; Boullier, A.; Almazan, F.; Li, A.C.; Witztum, J.L.; Bae, Y.S.; Miller, Y.I.
889 Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake. *Circ. Res.* **2009**,
890 *104*, 1355–1363, doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.192880.
891 102. Gao, L.-N.; Zhou, X.; Lu, Y.-R.; Li, K.; Gao, S.; Yu, C.-Q.; Cui, Y.-L. Dan-Lou Prescription Inhibits Foam Cell
892 Formation Induced by ox-LDL via the TLR4/NF-κB and PPARγ Signaling Pathways. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 590,
893 doi:10.3389/fphys.2018.00590.
894 103. Oiknine, J.; Aviram, M. Increased susceptibility to activation and increased uptake of low density
895 lipoprotein by cholesterol-loaded macrophages. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.* **1992**, *12*, 745–753,
896 doi:10.1161/01.atv.12.6.745.
897 104. Di Pietro, N.; Formoso, G.; Pandolfi, A. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall
898 cells in atherosclerosis. *Vascul. Pharmacol.* **2016**, *84*, 1–7, doi:10.1016/j.vph.2016.05.013.
899 105. Chistiakov, D.A.; Melnichenko, A.A.; Orekhov, A.N.; Bobryshev, Y.V. How do macrophages sense
900 modified low-density lipoproteins? *Int. J. Cardiol.* **2017**, *230*, 232–240, doi:10.1016/j.ijcard.2016.12.164.
901 106. Kunjathoor, V.V.; Febbraio, M.; Podrez, E.A.; Moore, K.J.; Andersson, L.; Koehn, S.; Rhee, J.S.; Silverstein,
902 R.; Hoff, H.F.; Freeman, M.W. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible
903 for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J. Biol. Chem.* **2002**,
904 *277*, 49982–49988, doi:10.1074/jbc.M209649200.
905 107. Zhou, F.; Pan, Y.; Huang, Z.; Jia, Y.; Zhao, X.; Chen, Y.; Diao, J.; Wan, Q.; Cui, X. Visfatin induces cholesterol
906 accumulation in macrophages through up-regulation of scavenger receptor-A and CD36. *Cell Stress Chaperones*
907 **2013**, *18*, 643–652, doi:10.1007/s12192-013-0417-z.

108. Ben, J.; Zhu, X.; Zhang, H.; Chen, Q. Class A1 scavenger receptors in cardiovascular diseases. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 5523–5530, doi:10.1111/bph.13105.

109. Schreurs, M.P.H.; Hubel, C.A.; Bernstein, I.M.; Jeyabalan, A.; Cipolla, M.J. Increased oxidized low-density lipoprotein causes blood-brain barrier disruption in early-onset preeclampsia through LOX-1. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2013**, *27*, 1254–1263, doi:10.1096/fj.12-222216.

110. Pirillo, A.; Norata, G.D.; Catapano, A.L. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* **2013**, *2013*, 152786, doi:10.1155/2013/152786.

111. Nan, J.; Xing, Y.-F.; Hu, B.; Tang, J.-X.; Dong, H.-M.; He, Y.-M.; Ruan, D.-Y.; Ye, Q.-J.; Cai, J.-R.; Ma, X.-K.; et al. Endoplasmic reticulum stress induced LOX-1+ CD15+ polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma. *Immunology* **2018**, *154*, 144–155, doi:10.1111/imm.12876.

112. Wang, X.; Ding, Z.; Lin, J.; Guo, Z.; Mehta, J.L. LOX-1 in macrophage migration in response to ox-LDL and the involvement of calpains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *467*, 135–139, doi:10.1016/j.bbrc.2015.09.100.

113. Podrez, E.A.; Poliakov, E.; Shen, Z.; Zhang, R.; Deng, Y.; Sun, M.; Finton, P.J.; Shan, L.; Febbraio, M.; Hajjar, D.P.; et al. A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 38517–38523, doi:10.1074/jbc.M205924200.

114. Liu, Q.; Fan, J.; Bai, J.; Peng, L.; Zhang, T.; Deng, L.; Wang, G.; Zhao, Y.; Nong, J.; Zhang, M.; et al. IL-34 promotes foam cell formation by enhancing CD36 expression through p38 MAPK pathway. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 17347, doi:10.1038/s41598-018-35485-2.

115. Ramprasad, M.P.; Terpstra, V.; Kondratenko, N.; Quehenberger, O.; Steinberg, D. Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 14833–14838, doi:10.1073/pnas.93.25.14833.

116. Amanzada, A.; Malik, I.A.; Blaschke, M.; Khan, S.; Rahman, H.; Ramadori, G.; Moriconi, F. Identification of CD68(+) neutrophil granulocytes in in vitro model of acute inflammation and inflammatory bowel disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2013**, *6*, 561–570.

117. Luo, Y.; Duan, H.; Qian, Y.; Feng, L.; Wu, Z.; Wang, F.; Feng, J.; Yang, D.; Qin, Z.; Yan, X. Macrophagic CD146 promotes foam cell formation and retention during atherosclerosis. *Cell Res.* **2017**, *27*, 352–372, doi:10.1038/cr.2017.8.

118. Rao, X.; Zhao, S.; Braunstein, Z.; Mao, H.; Razavi, M.; Duan, L.; Wei, Y.; Toomey, A.C.; Rajagopalan, S.; Zhong, J. Oxidized LDL upregulates macrophage DPP4 expression via TLR4/TRIF/CD36 pathways. *EBioMedicine* **2019**, *41*, 50–61, doi:10.1016/j.ebiom.2019.01.065.

119. Guha, M.; Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* **2001**, *13*, 85–94, doi:10.1016/s0898-6568(00)00149-2.

120. Rocha, D.M.; Caldas, A.P.; Oliveira, L.L.; Bressan, J.; Hermsdorff, H.H. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis* **2016**, *244*, 211–215, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.015.

121. Han, J.; Nicholson, A.C. Lipoproteins modulate expression of the macrophage scavenger receptor. *Am. J. Pathol.* **1998**, *152*, 1647–1654.

122. Dai, Y.; Su, W.; Ding, Z.; Wang, X.; Mercanti, F.; Chen, M.; Raina, S.; Mehta, J.L. Regulation of MSR-1 and CD36 in macrophages by LOX-1 mediated through PPAR-γ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *431*, 496–500, doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.029.

123. Mietus-Snyder, M.; Gowri, M.S.; Pitas, R.E. Class A scavenger receptor up-regulation in smooth muscle

949 cells by oxidized low density lipoprotein. Enhancement by calcium flux and concurrent cyclooxygenase-2 up-
950 regulation. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17661–17670, doi:10.1074/jbc.275.23.17661.
951 124. Zingg, J.-M.; Ricciarelli, R.; Andorno, E.; Azzi, A. Novel 5′ exon of scavenger receptor CD36 is expressed in
952 cultured human vascular smooth muscle cells and atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**,
953 *22*, 412–417, doi:10.1161/hq0302.104517.
954 125. Ma, S.; Yang, D.; Li, D.; Tang, B.; Yang, Y. Oleic acid induces smooth muscle foam cell formation and
955 enhances atherosclerotic lesion development via CD36. *Lipids Health Dis.* **2011**, *10*, 53, doi:10.1186/1476-511X-10-
956 53.
957 126. Yeh, Y.C.; Hwang, G.Y.; Liu, I.P.; Yang, V.C. Identification and expression of scavenger receptor SR-BI in
958 endothelial cells and smooth muscle cells of rat aorta in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* **2002**, *161*, 95–103,
959 doi:10.1016/s0021-9150(01)00642-6.
960 127. Ishikawa, Y.; Kimura-Matsumoto, M.; Murakami, M.; Murakami, M.; Yamamoto, K.; Akasaka, Y.; Uzuki,
961 M.; Yuri, Y.; Inomata, N.; Yokoo, T.; et al. Distribution of smooth muscle cells and macrophages expressing
962 scavenger receptor BI/II in atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* **2009**, *16*, 829–839, doi:10.5551/jat.1941.
963 128. Mehta, J.L.; Chen, J.; Hermonat, P.L.; Romeo, F.; Novelli, G. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein
964 receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc. Res.*
965 **2006**, *69*, 36–45, doi:10.1016/j.cardiores.2005.09.006.
966 129. Xu, X.; Yuan, X.; Li, N.; Dewey, W.L.; Li, P.-L.; Zhang, F. Lysosomal cholesterol accumulation in
967 macrophages leading to coronary atherosclerosis in CD38(-/-) mice. *J. Cell. Mol. Med.* **2016**, *20*, 1001–1013,
968 doi:10.1111/jcmm.12788.
969 130. Chistiakov, D.A.; Melnichenko, A.A.; Myasoedova, V.A.; Grechko, A.V.; Orekhov, A.N. Mechanisms of
970 foam cell formation in atherosclerosis. *J. Mol. Med.* **2017**, *95*, 1153–1165, doi:10.1007/s00109-017-1575-8.
971 131. Chistiakov, D.A.; Bobryshev, Y.V.; Orekhov, A.N. Macrophage-mediated cholesterol handling in
972 atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* **2016**, *20*, 17–28, doi:10.1111/jcmm.12689.
973 132. Hoppe, G.; O'Neil, J.; Hoff, H.F. Inactivation of lysosomal proteases by oxidized low density lipoprotein is
974 partially responsible for its poor degradation by mouse peritoneal macrophages. *J. Clin. Invest.* **1994**, *94*, 1506–
975 1512.
976 133. Feng, B.; Yao, P.M.; Li, Y.; Devlin, C.M.; Zhang, D.; Harding, H.P.; Sweeney, M.; Rong, J.X.; Kuriakose, G.;
977 Fisher, E.A.; et al. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat.*
978 *Cell Biol.* **2003**, *5*, 781–792, doi:10.1038/ncb1035.
979 134. Gonzalez, L.; Trigatti, B.L. Macrophage Apoptosis and Necrotic Core Development in Atherosclerosis: A
980 Rapidly Advancing Field with Clinical Relevance to Imaging and Therapy. *Can. J. Cardiol.* **2017**, *33*, 303–312,
981 doi:10.1016/j.cjca.2016.12.010.
982 135. Kolodgie, F.D.; Gold, H.K.; Burke, A.P.; Fowler, D.R.; Kruth, H.S.; Weber, D.K.; Farb, A.; Guerrero, L.J.;
983 Hayase, M.; Kutys, R.; et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N. Engl. J. Med.*
984 **2003**, *349*, 2316–2325, doi:10.1056/NEJMoa035655.
985 136. Virmani, R.; Kolodgie, F.D.; Burke, A.P.; Finn, A.V.; Gold, H.K.; Tulenko, T.N.; Wrenn, S.P.; Narula, J.
986 Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque
987 hemorrhage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*, 2054–2061, doi:10.1161/01.ATV.0000178991.71605.18.
988 137. Beppu, M.; Hayashi, T.; Hasegawa, T.; Kikugawa, K. Recognition of sialosaccharide chains of glycophorin
989 on damaged erythrocytes by macrophage scavenger receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1268*, 9–19,

990 doi:10.1016/0167-4889(95)00040-y.
991 138. Pasterkamp, G.; Virmani, R. The erythrocyte: a new player in atheromatous core formation. *Heart Br. Card.*
992 *Soc.* **2002**, *88*, 115–116, doi:10.1136/heart.88.2.115.
993 139. Matsumoto, K.; Hirano, K.; Nozaki, S.; Takamoto, A.; Nishida, M.; Nakagawa-Toyama, Y.; Janabi, M.Y.;
994 Ohya, T.; Yamashita, S.; Matsuzawa, Y. Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured
995 human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-
996 gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype in vitro, and its implication in atherogenesis. *Arterioscler.*
997 *Thromb. Vasc. Biol.* **2000**, *20*, 1027–1032, doi:10.1161/01.atv.20.4.1027.
998 140. Ricciarelli, R.; Zingg, J.M.; Azzi, A. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36
999 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation* **2000**, *102*, 82–87,
1000 doi:10.1161/01.cir.102.1.82.
1001 141. Xue, J.; Yuan, Z.; Wu, Y.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Zhang, W.; Tian, Y.; Liu, W.; Liu, Y.; Kishimoto, C. High glucose
1002 promotes intracellular lipid accumulation in vascular smooth muscle cells by impairing cholesterol influx and
1003 efflux balance. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *86*, 141–150, doi:10.1093/cvr/cvp388.
1004 142. Li, H.; Freeman, M.W.; Libby, P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo
1005 by atherogenic diets and in vitro by cytokines. *J. Clin. Invest.* **1995**, *95*, 122–133, doi:10.1172/JCI117628.
1006 143. Gough, P.J.; Greaves, D.R.; Suzuki, H.; Hakkinen, T.; Hiltunen, M.O.; Turunen, M.; Herttuala, S.Y.; Kodama,
1007 T.; Gordon, S. Analysis of macrophage scavenger receptor (SR-A) expression in human aortic atherosclerotic
1008 lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1999**, *19*, 461–471, doi:10.1161/01.atv.19.3.461.
1009 144. Gong, Q.; Pitas, R.E. Synergistic effects of growth factors on the regulation of smooth muscle cell scavenger
1010 receptor activity. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 21672–21678, doi:10.1074/jbc.270.37.21672.
1011 145. Mietus-Snyder, M.; Friera, A.; Glass, C.K.; Pitas, R.E. Regulation of scavenger receptor expression in smooth
1012 muscle cells by protein kinase C: a role for oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1997**, *17*, 969–978,
1013 doi:10.1161/01.atv.17.5.969.
1014 146. Mietus-Snyder, M.; Glass, C.K.; Pitas, R.E. Transcriptional activation of scavenger receptor expression in
1015 human smooth muscle cells requires AP-1/c-Jun and C/EBPbeta: both AP-1 binding and JNK activation are
1016 induced by phorbol esters and oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1998**, *18*, 1440–1449,
1017 doi:10.1161/01.atv.18.9.1440.
1018 147. Luechtenborg, B.; Hofnagel, O.; Weissen-Plenz, G.; Severs, N.J.; Robenek, H. Function of scavenger receptor
1019 class A type I/II is not important for smooth muscle foam cell formation. *Eur. J. Cell Biol.* **2008**, *87*, 91–99,
1020 doi:10.1016/j.ejcb.2007.08.004.
1021 148. Kataoka, H.; Kume, N.; Miyamoto, S.; Minami, M.; Moriwaki, H.; Murase, T.; Sawamura, T.; Masaki, T.;
1022 Hashimoto, N.; Kita, T. Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human
1023 atherosclerotic lesions. *Circulation* **1999**, *99*, 3110–3117, doi:10.1161/01.cir.99.24.3110.
1024 149. Eto, H.; Miyata, M.; Kume, N.; Minami, M.; Itabe, H.; Orihara, K.; Hamasaki, S.; Biro, S.; Otsuji, Y.; Kita, T.;
1025 et al. Expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in smooth muscle cells after vascular injury. *Biochem.*
1026 *Biophys. Res. Commun.* **2006**, *341*, 591–598, doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.211.
1027 150. Chen, H.; Li, D.; Sawamura, T.; Inoue, K.; Mehta, J.L. Upregulation of LOX-1 expression in aorta of
1028 hypercholesterolemic rabbits: modulation by losartan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *276*, 1100–1104,
1029 doi:10.1006/bbrc.2000.3532.
1030 151. Nagase, M.; Hirose, S.; Fujita, T. Unique repetitive sequence and unexpected regulation of expression of rat

1031 endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1). *Biochem. J.* **1998**, *330 (Pt 3)*, 1417–1422,
1032 doi:10.1042/bj3301417.
1033 152. Mukai, E.; Kume, N.; Hayashida, K.; Minami, M.; Yamada, Y.; Seino, Y.; Kita, T. Heparin-binding EGF-like
1034 growth factor induces expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells.
1035 *Atherosclerosis* **2004**, *176*, 289–296, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.03.028.
1036 153. Hofnagel, O.; Luechtenborg, B.; Plenz, G.; Robenek, H. Expression of the novel scavenger receptor SR-PSOX
1037 in cultured aortic smooth muscle cells and umbilical endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*,
1038 710–711, doi:10.1161/01.atv.0000012402.85056.45.
1039 154. Wågsäter, D.; Olofsson, P.S.; Norgren, L.; Stenberg, B.; Sirsjö, A. The chemokine and scavenger receptor
1040 CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by interferon gamma.
1041 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *325*, 1187–1193, doi:10.1016/j.bbrc.2004.10.160.
1042 155. Bao, Z.; Li, L.; Geng, Y.; Yan, J.; Dai, Z.; Shao, C.; Sun, Z.; Jing, L.; Pang, Q.; Zhang, L.; et al. Advanced
1043 Glycation End Products Induce Vascular Smooth Muscle Cell-Derived Foam Cell Formation and
1044 Transdifferentiate to a Macrophage-Like State. *Mediators Inflamm.* **2020**, *2020*, 6850187, doi:10.1155/2020/6850187.
1045 156. Pi, S.; Mao, L.; Chen, J.; Shi, H.; Liu, Y.; Guo, X.; Li, Y.; Zhou, L.; He, H.; Yu, C.; et al. The P2RY12 receptor
1046 promotes VSMC-derived foam cell formation by inhibiting autophagy in advanced atherosclerosis. *Autophagy*
1047 **2020**, 1–21, doi:10.1080/15548627.2020.1741202.
1048 157. Costales, P.; Fuentes-Prior, P.; Castellano, J.; Revuelta-Lopez, E.; Corral-Rodríguez, M.Á.; Nasarre, L.;
1049 Badimon, L.; Llorente-Cortes, V. K Domain CR9 of Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein 1
1050 (LRP1) Is Critical for Aggregated LDL-induced Foam Cell Formation from Human Vascular Smooth Muscle
1051 Cells. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 14852–14865, doi:10.1074/jbc.M115.638361.
1052 158. Llorente-Cortés, V.; Royo, T.; Juan-Babot, O.; Badimon, L. Adipocyte differentiation-related protein is
1053 induced by LRP1-mediated aggregated LDL internalization in human vascular smooth muscle cells and
1054 macrophages. *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 2133–2140, doi:10.1194/jlr.M700039-JLR200.
1055 159. Seimon, T.; Tabas, I. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J. Lipid*
1056 *Res.* **2009**, *50*, S382–S387, doi:10.1194/jlr.R800032-JLR200.
1057 160. Kojima, Y.; Weissman, I.L.; Leeper, N.J. The Role of Efferocytosis in Atherosclerosis. *Circulation* **2017**, *135*,
1058 476–489, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025684.
1059 161. Muñoz-Espín, D.; Serrano, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
1060 **2014**, *15*, 482–496, doi:10.1038/nrm3823.
1061 162. Childs, B.G.; Baker, D.J.; Wijshake, T.; Conover, C.A.; Campisi, J.; van Deursen, J.M. Senescent intimal foam
1062 cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science* **2016**, *354*, 472–477, doi:10.1126/science.aaf6659.
1063 163. Matthews, C.; Gorenne, I.; Scott, S.; Figg, N.; Kirkpatrick, P.; Ritchie, A.; Goddard, M.; Bennett, M. Vascular
1064 smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and
1065 oxidative stress. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 156–164, doi:10.1161/01.RES.0000233315.38086.bc.
1066 164. Grootaert, M.O.J.; Moulis, M.; Roth, L.; Martinet, W.; Vindis, C.; Bennett, M.R.; De Meyer, G.R.Y. Vascular
1067 smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **2018**, *114*, 622–634,
1068 doi:10.1093/cvr/cvy007.
1069 165. Wang, J.; Uryga, A.K.; Reinhold, J.; Figg, N.; Baker, L.; Finigan, A.; Gray, K.; Kumar, S.; Clarke, M.; Bennett,
1070 M. Vascular Smooth Muscle Cell Senescence Promotes Atherosclerosis and Features of Plaque Vulnerability.
1071 *Circulation* **2015**, *132*, 1909–1919, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016457.

1072 166. Tumurkhuu, G.; Shimada, K.; Dagvadorj, J.; Crother, T.R.; Zhang, W.; Luthringer, D.; Gottlieb, R.A.; Chen,
1073 S.; Arditi, M. Ogg1-Dependent DNA Repair Regulates NLRP3 Inflammasome and Prevents Atherosclerosis.
1074 *Circ. Res.* **2016**, *119*, e76-90, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308362.
1075 167. Shah, A.; Gray, K.; Figg, N.; Finigan, A.; Starks, L.; Bennett, M. Defective Base Excision Repair of Oxidative
1076 DNA Damage in Vascular Smooth Muscle Cells Promotes Atherosclerosis. *Circulation* **2018**, *138*, 1446–1462,
1077 doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.033249.
1078 168. Clarke, M.C.H.; Figg, N.; Maguire, J.J.; Davenport, A.P.; Goddard, M.; Littlewood, T.D.; Bennett, M.R.
1079 Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat. Med.*
1080 **2006**, *12*, 1075–1080, doi:10.1038/nm1459.
1081 169. Clarke, M.C.H.; Littlewood, T.D.; Figg, N.; Maguire, J.J.; Davenport, A.P.; Goddard, M.; Bennett, M.R.
1082 Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and
1083 medial degeneration. *Circ. Res.* **2008**, *102*, 1529–1538, doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.175976.
1084 170. Stoneman, V.; Braganza, D.; Figg, N.; Mercer, J.; Lang, R.; Goddard, M.; Bennett, M. Monocyte/macrophage
1085 suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and
1086 established plaques. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 884–893, doi:10.1161/01.RES.0000260802.75766.00.
1087 171. Vengrenyuk, Y.; Nishi, H.; Long, X.; Ouimet, M.; Savji, N.; Martinez, F.O.; Cassella, C.P.; Moore, K.J.;
1088 Ramsey, S.A.; Miano, J.M.; et al. Cholesterol loading reprograms the microRNA-143/145-myocardin axis to
1089 convert aortic smooth muscle cells to a dysfunctional macrophage-like phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*
1090 **2015**, *35*, 535–546, doi:10.1161/ATVBAHA.114.304029.
1091 172. Clarke, M.C.H.; Talib, S.; Figg, N.L.; Bennett, M.R. Vascular smooth muscle cell apoptosis induces
1092 interleukin-1-directed inflammation: effects of hyperlipidemia-mediated inhibition of phagocytosis. *Circ. Res.*
1093 **2010**, *106*, 363–372, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.208389.
1094 173. Jonasson, L.; Holm, J.; Skalli, O.; Bondjers, G.; Hansson, G.K. Regional accumulations of T cells,
1095 macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arterioscler. Dallas Tex* **1986**, *6*, 131–
1096 138, doi:10.1161/01.atv.6.2.131.
1097 174. Goldstein, J.L.; Hoff, H.F.; Ho, Y.K.; Basu, S.K.; Brown, M.S. Stimulation of cholesteryl ester synthesis in
1098 macrophages by extracts of atherosclerotic human aortas and complexes of albumin/cholesteryl esters.
1099 *Arterioscler. Dallas Tex* **1981**, *1*, 210–226, doi:10.1161/01.atv.1.3.210.
1100 175. Fernandez, D.M.; Rahman, A.H.; Fernandez, N.F.; Chudnovskiy, A.; Amir, E.-A.D.; Amadori, L.; Khan,
1101 N.S.; Wong, C.K.; Shamailova, R.; Hill, C.A.; et al. Single-cell immune landscape of human atherosclerotic
1102 plaques. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1576–1588, doi:10.1038/s41591-019-0590-4.
1103 176. Willemsen, L.; de Winther, M.P. Macrophage subsets in atherosclerosis as defined by single-cell
1104 technologies. *J. Pathol.* **2020**, *250*, 705–714, doi:10.1002/path.5392.
1105 177. Classics in arteriosclerosis research: On experimental cholesterin steatosis and its significance in the origin
1106 of some pathological processes by N. Anitschkow and S. Chalatow, translated by Mary Z. Pelias, 1913.
1107 *Arterioscler. Dallas Tex* **1983**, *3*, 178–182.
1108 178. Herijgers, N.; Van Eck, M.; Groot, P.H.; Hoogerbrugge, P.M.; Van Berkel, T.J. Effect of bone marrow
1109 transplantation on lipoprotein metabolism and atherosclerosis in LDL receptor-knockout mice. *Arterioscler.*
1110 *Thromb. Vasc. Biol.* **1997**, *17*, 1995–2003, doi:10.1161/01.atv.17.10.1995.
1111 179. Kennedy, A.; Gruen, M.L.; Gutierrez, D.A.; Surmi, B.K.; Orr, J.S.; Webb, C.D.; Hasty, A.H. Impact of
1112 macrophage inflammatory protein-1α deficiency on atherosclerotic lesion formation, hepatic steatosis, and

1113 adipose tissue expansion. *PloS One* **2012**, *7*, e31508, doi:10.1371/journal.pone.0031508.
1114 180. Kubo, N.; McCurdy, S.; Boisvert, W.A. Defective Fas Expression on Bone Marrow Derived Cells Alters
1115 Atherosclerotic Plaque Morphology in Hyperlipidemic Mice. *Discov. Craiova Rom.* **2015**, *3*,
1116 doi:10.15190/d.2015.29.
1117 181. Nong, Z.; Gonzalez-Navarro, H.; Amar, M.; Freeman, L.; Knapper, C.; Neufeld, E.B.; Paigen, B.J.; Hoyt,
1118 R.F.; Fruchart-Najib, J.; Santamarina-Fojo, S. Hepatic lipase expression in macrophages contributes to
1119 atherosclerosis in apoE-deficient and LCAT-transgenic mice. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 367–378,
1120 doi:10.1172/JCI16484.
1121 182. S, F.; Mf, L. Interplay between apolipoprotein E and scavenger receptor class B type I controls coronary
1122 atherosclerosis and lifespan in the mouse. *Circulation* **2005**, *111*, 3349–3351,
1123 doi:10.1161/circulationaha.105.545996.
1124 183. Cochain, C.; Vafadarnejad, E.; Arampatzi, P.; Pelisek, J.; Winkels, H.; Ley, K.; Wolf, D.; Saliba, A.-E.;
1125 Zernecke, A. Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic
1126 Macrophages in Murine Atherosclerosis. *Circ. Res.* **2018**, *122*, 1661–1674, doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312509.
1127 184. Lessner, S.M.; Prado, H.L.; Waller, E.K.; Galis, Z.S. Atherosclerotic lesions grow through recruitment and
1128 proliferation of circulating monocytes in a murine model. *Am. J. Pathol.* **2002**, *160*, 2145–2155, doi:10.1016/S0002-
1129 9440(10)61163-7.
1130 185. Pease, D.C.; Paule, W.J. Electron microscopy of elastic arteries; the thoracic aorta of the rat. *J. Ultrastruct.*
1131 *Res.* **1960**, *3*, 469–483, doi:10.1016/s0022-5320(60)90023-x.
1132 186. Parker, F. An Electron Microscopic Study of Experimental Atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* **1960**, *36*, 19–53.
1133 187. Imai, H.; Lee, K.T.; Pastori, S.; Panlilio, E.; Florentin, R.; Thomas, W.A. Atherosclerosis in rabbits.
1134 Architectural and subcellular alterations of smooth muscle cells of aortas in response to hyperlipemia. *Exp. Mol.*
1135 *Pathol.* **1966**, *5*, 273–310, doi:10.1016/0014-4800(66)90036-0.
1136 188. Wissler, R.W. The arterial medial cell, smooth muscle, or multifunctional mesenchyme? *Circulation* **1967**,
1137 *36*, 1–4, doi:10.1161/01.cir.36.1.1.
1138 189. Aqel, N.M.; Ball, R.Y.; Waldmann, H.; Mitchinson, M.J. Monocytic origin of foam cells in human
1139 atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **1984**, *53*, 265–271, doi:10.1016/0021-9150(84)90127-8.
1140 190. Aqel, N.M.; Ball, R.Y.; Waldmann, H.; Mitchinson, M.J. Identification of macrophages and smooth muscle
1141 cells in human atherosclerosis using monoclonal antibodies. *J. Pathol.* **1985**, *146*, 197–204,
1142 doi:10.1002/path.1711460306.
1143 191. Watanabe, T.; Hirata, M.; Yoshikawa, Y.; Nagafuchi, Y.; Toyoshima, H.; Watanabe, T. Role of macrophages
1144 in atherosclerosis. Sequential observations of cholesterol-induced rabbit aortic lesion by the immunoperoxidase
1145 technique using monoclonal antimacrophage antibody. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **1985**, *53*, 80–90.
1146 192. Roessner, A.; Herrera, A.; Höning, H.J.; Vollmer, E.; Zwadlo, G.; Schürmann, R.; Sorg, C.; Grundmann, E.
1147 Identification of macrophages and smooth muscle cells with monoclonal antibodies in the human atherosclerotic
1148 plaque. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **1987**, *412*, 169–174, doi:10.1007/BF00716190.
1149 193. Jonasson, L.; Holm, J.; Skalli, O.; Gabbiani, G.; Hansson, G.K. Expression of class II transplantation antigen
1150 on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **1985**, *76*, 125–131,
1151 doi:10.1172/JCI111934.
1152 194. Andreeva, E.R.; Pugach, I.M.; Orekhov, A.N. Subendothelial smooth muscle cells of human aorta express
1153 macrophage antigen in situ and in vitro. *Atherosclerosis* **1997**, *135*, 19–27, doi:10.1016/s0021-9150(97)00136-6.

1154 195. Gomez, D.; Shankman, L.S.; Nguyen, A.T.; Owens, G.K. Detection of histone modifications at specific gene
1155 loci in single cells in histological sections. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 171–177, doi:10.1038/nmeth.2332.
1156 196. Shankman, L.S.; Gomez, D.; Cherepanova, O.A.; Salmon, M.; Alencar, G.F.; Haskins, R.M.; Swiatlowska,
1157 P.; Newman, A.A.C.; Greene, E.S.; Straub, A.C.; et al. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle
1158 cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 628–637, doi:10.1038/nm.3866.
1159 197. Knight, K.L.; Schneiderman, R.D.; Burnett, R.C. Expression of rabbit IgA heavy chain genes in E. coli and
1160 in murine myeloma cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **1987**, *17*, 279–289, doi:10.1016/0165-2427(87)90147-4.
1161 198. Wang, Y.; Dubland, J.A.; Allahverdian, S.; Asonye, E.; Sahin, B.; Jaw, J.E.; Sin, D.D.; Seidman, M.A.; Leeper,
1162 N.J.; Francis, G.A. Smooth Muscle Cells Contribute the Majority of Foam Cells in ApoE (Apolipoprotein E)-
1163 Deficient Mouse Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2019**, *39*, 876–887,
1164 doi:10.1161/ATVBAHA.119.312434.
1165 199. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **1993**, *362*, 801–809,
1166 doi:10.1038/362801a0.
1167 200. Ohno, T.; Gordon, D.; San, H.; Pompili, V.J.; Imperiale, M.J.; Nabel, G.J.; Nabel, E.G. Gene therapy for
1168 vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science* **1994**, *265*, 781–784,
1169 doi:10.1126/science.8047883.
1170 201. Stemerman, M.B.; Ross, R. Experimental arteriosclerosis. I. Fibrous plaque formation in primates, an
1171 electron microscope study. *J. Exp. Med.* **1972**, *136*, 769–789, doi:10.1084/jem.136.4.769.
1172 202. Bart, R.D.; Sheng, H.; Laskowitz, D.T.; Pearlstein, R.D.; Warner, D.S. Regional CBF in apolipoprotein E-
1173 deficient and wild type mice during focal cerebral ischemia. *Neuroreport* **1998**, *9*, 2615–2620,
1174 doi:10.1097/00001756-199808030-00035.
1175 203. Lupieri, A.; Smirnova, N.F.; Solinhac, R.; Malet, N.; Benamar, M.; Saoudi, A.; Santos-Zas, I.; Zeboudj, L.;
1176 Ait-Oufella, H.; Hirsch, E.; et al. Smooth muscle cells-derived CXCL10 prevents endothelial healing through
1177 PI3Kγ-dependent T cells response. *Cardiovasc. Res.* **2020**, *116*, 438–449, doi:10.1093/cvr/cvz122.
1178 204. Yin, W.; Carballo-Jane, E.; McLaren, D.G.; Mendoza, V.H.; Gagen, K.; Geoghagen, N.S.; McNamara, L.A.;
1179 Gorski, J.N.; Eiermann, G.J.; Petrov, A.; et al. Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal
1180 animal models of human dyslipidemia. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 51–65, doi:10.1194/jlr.M019927.
1181 205. Emini Veseli, B.; Perrotta, P.; De Meyer, G.R.A.; Roth, L.; Van der Donckt, C.; Martinet, W.; De Meyer,
1182 G.R.Y. Animal models of atherosclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *816*, 3–13, doi:10.1016/j.ejphar.2017.05.010.
1183 206. Getz, G.S.; Reardon, C.A. Diet and Murine Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 242–
1184 249, doi:10.1161/01.ATV.0000201071.49029.17.
1185 207. von Scheidt, M.; Zhao, Y.; Kurt, Z.; Pan, C.; Zeng, L.; Yang, X.; Schunkert, H.; Lusis, A.J. Applications and
1186 Limitations of Mouse Models for Understanding Human Atherosclerosis. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 248–261,
1187 doi:10.1016/j.cmet.2016.11.001.
1188 208. Daugherty, A. Mouse Models of Atherosclerosis. *Am. J. Med. Sci.* **2002**, *323*, 3–10, doi:10.1097/00000441-
1189 200201000-00002.
1190 209. Katsuda, S.; Okada, Y.; Minamoto, T.; Oda, Y.; Matsui, Y.; Nakanishi, I. Collagens in human atherosclerosis.
1191 Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.* **1992**, *12*,
1192 494–502, doi:10.1161/01.atv.12.4.494.
1193 210. Rekhter, M.D.; Zhang, K.; Narayanan, A.S.; Phan, S.; Schork, M.A.; Gordon, D. Type I collagen gene
1194 expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions. *Am. J. Pathol.* **1993**, *143*, 1634–1648.

211. Korol, R.M.; Canham, P.B.; Liu, L.; Viswanathan, K.; Ferguson, G.G.; Hammond, R.R.; Finlay, H.M.; Baker, H.V.; Lopez, C.; Lucas, A.R. Detection of altered extracellular matrix in surface layers of unstable carotid plaque: an optical spectroscopy, birefringence and microarray genetic analysis. *Photochem. Photobiol.* **2011**, *87*, 1164–1172, doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00960.x.

212. Libby, P.; Sukhova, G.; Lee, R.T.; Liao, J.K. Molecular biology of atherosclerosis. *Int. J. Cardiol.* **1997**, *62 Suppl 2*, S23-29, doi:10.1016/s0167-5273(97)00238-6.

213. Libby, P.; Schoenbeck, U.; Mach, F.; Selwyn, A.P.; Ganz, P. Current concepts in cardiovascular pathology: the role of LDL cholesterol in plaque rupture and stabilization. *Am. J. Med.* **1998**, *104*, 14S-18S, doi:10.1016/s0002-9343(98)00041-2.

214. Galis, Z.S.; Sukhova, G.K.; Kranzhöfer, R.; Clark, S.; Libby, P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 402–406, doi:10.1073/pnas.92.2.402.

215. Galis, Z.S.; Sukhova, G.K.; Lark, M.W.; Libby, P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **1994**, *94*, 2493–2503, doi:10.1172/JCI117619.

216. Chase, A.J.; Bond, M.; Crook, M.F.; Newby, A.C. Role of nuclear factor-kappa B activation in metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 765–771, doi:10.1161/01.atv.0000015078.09208.92.

217. Zhou, Z.-B.; Yang, B.; Li, X.; Liu, H.; Lei, G. Lysophosphatidic Acid Promotes Expression and Activation of Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) in THP-1 Cells via Toll-Like Receptor 4/Nuclear Factor-κB (TLR4/NF-κB) Signaling Pathway. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2018**, *24*, 4861–4868, doi:10.12659/MSM.906450.

218. Newby, A.C. Metalloproteinase production from macrophages - a perfect storm leading to atherosclerotic plaque rupture and myocardial infarction. *Exp. Physiol.* **2016**, *101*, 1327–1337, doi:10.1113/EP085567.

219. Chen, Y.; Waqar, A.B.; Nishijima, K.; Ning, B.; Kitajima, S.; Matsuhisa, F.; Chen, L.; Liu, E.; Koike, T.; Yu, Y.; et al. Macrophage-derived MMP-9 enhances the progression of atherosclerotic lesions and vascular calcification in transgenic rabbits. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 4261–4274, doi:10.1111/jcmm.15087.

220. Xiao, Q.; Zhang, F.; Grassia, G.; Hu, Y.; Zhang, Z.; Xing, Q.; Yin, X.; Maddaluno, M.; Drung, B.; Schmidt, B.; et al. Matrix metalloproteinase-8 promotes vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 90–98, doi:10.1161/ATVBAHA.113.301418.

221. Yang, F.; Chen, Q.; Yang, M.; Maguire, E.M.; Yu, X.; He, S.; Xiao, R.; Wang, C.S.; An, W.; Wu, W.; et al. Macrophage-derived MMP-8 determines smooth muscle cell differentiation from adventitia stem/progenitor cells and promotes neointima hyperplasia. *Cardiovasc. Res.* **2020**, *116*, 211–225, doi:10.1093/cvr/cvz044.

222. Mansilla, S.; Boulaftali, Y.; Venisse, L.; Arocas, V.; Meilhac, O.; Michel, J.-B.; Jandrot-Perrus, M.; Bouton, M.-C. Macrophages and platelets are the major source of protease nexin-1 in human atherosclerotic plaque. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 1844–1850, doi:10.1161/ATVBAHA.108.171389.

223. Ferroni, P.; Guadagni, F. Protease nexin-1: a regulator of vascular disease? *J. Thromb. Haemost. JTH* **2006**, *4*, 320–321, doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01785.x.

224. Cho, K.Y.; Miyoshi, H.; Kuroda, S.; Yasuda, H.; Kamiyama, K.; Nakagawara, J.; Takigami, M.; Kondo, T.; Atsumi, T. The Phenotype of Infiltrating Macrophages Influences Arteriosclerotic Plaque Vulnerability in the Carotid Artery. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **2013**, *22*, 910–918, doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.11.020.

225. Burke, A.P.; Farb, A.; Malcom, G.T.; Liang, Y.H.; Smialek, J.; Virmani, R. Coronary risk factors and plaque

1236 morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N. Engl. J. Med.* **1997**, *336*, 1276–1282,
1237 doi:10.1056/NEJM199705013361802.
1238 226. Virmani, R.; Burke, A.P.; Farb, A.; Kolodgie, F.D. Pathology of the Vulnerable Plaque. *J. Am. Coll. Cardiol.*
1239 **2006**, *47*, C13–C18, doi:10.1016/j.jacc.2005.10.065.
1240 227. Eligini, S.; Cosentino, N.; Fiorelli, S.; Fabbiocchi, F.; Niccoli, G.; Refaat, H.; Camera, M.; Calligaris, G.; De
1241 Martini, S.; Bonomi, A.; et al. Biological profile of monocyte-derived macrophages in coronary heart disease
1242 patients: implications for plaque morphology. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8680, doi:10.1038/s41598-019-44847-3.
1243 228. Shaikh, S.; Brittenden, J.; Lahiri, R.; Brown, P. a. J.; Thies, F.; Wilson, H.M. Macrophage subtypes in
1244 symptomatic carotid artery and femoral artery plaques. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.*
1245 **2012**, *44*, 491–497, doi:10.1016/j.ejvs.2012.08.005.
1246 229. Chappell, J.; Harman, J.L.; Narasimhan, V.M.; Yu, H.; Foote, K.; Simons, B.D.; Bennett, M.R.; Jørgensen,
1247 H.F. Extensive Proliferation of a Subset of Differentiated, yet Plastic, Medial Vascular Smooth Muscle Cells
1248 Contributes to Neointimal Formation in Mouse Injury and Atherosclerosis Models. *Circ. Res.* **2016**, *119*, 1313–
1249 1323, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309799.
1250 230. Bentzon, J.F.; Otsuka, F.; Virmani, R.; Falk, E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ. Res.* **2014**,
1251 *114*, 1852–1866, doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.
1252 231. Davies, M.J.; Richardson, P.D.; Woolf, N.; Katz, D.R.; Mann, J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic
1253 plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br. Heart J.* **1993**, *69*, 377–381,
1254 doi:10.1136/hrt.69.5.377.
1255 232. Cherepanova, O.A.; Gomez, D.; Shankman, L.S.; Swiatlowska, P.; Williams, J.; Sarmento, O.F.; Alencar,
1256 G.F.; Hess, D.L.; Bevard, M.H.; Greene, E.S.; et al. Activation of the pluripotency factor OCT4 in smooth muscle
1257 cells is atheroprotective. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 657–665, doi:10.1038/nm.4109.
1258 233. Gomez, D.; Baylis, R.A.; Durgin, B.G.; Newman, A.A.C.; Alencar, G.F.; Mahan, S.; St Hilaire, C.; Müller, W.;
1259 Waisman, A.; Francis, S.E.; et al. Interleukin-1β has atheroprotective effects in advanced atherosclerotic lesions
1260 of mice. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1418–1429, doi:10.1038/s41591-018-0124-5.
1261 234. Michel, J.-B.; Virmani, R.; Arbustini, E.; Pasterkamp, G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque
1262 vulnerability. *Eur. Heart J.* **2011**, *32*, 1977–1985, 1985a, 1985b, 1985c, doi:10.1093/eurheartj/ehr054.
1263 235. Finn, A.V.; Nakano, M.; Polavarapu, R.; Karmali, V.; Saeed, O.; Zhao, X.; Yazdani, S.; Otsuka, F.; Davis, T.;
1264 Habib, A.; et al. Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human
1265 atherosclerotic plaques. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2012**, *59*, 166–177, doi:10.1016/j.jacc.2011.10.852.
1266 236. Higginbotham, A.C.; Higginbotham, F.H. The relation of plaque composition and of the vasa vasorum to
1267 vascularization of atheromatous plaques in rabbits and man. *J. Atheroscler. Res.* **1961**, *1*, 283–295,
1268 doi:10.1016/s0368-1319(61)80002-1.
1269 237. Pelisek, J.; Well, G.; Reeps, C.; Rudelius, M.; Kuehnl, A.; Culmes, M.; Poppert, H.; Zimmermann, A.; Berger,
1270 H.; Eckstein, H.-H. Neovascularization and angiogenic factors in advanced human carotid artery stenosis. *Circ.*
1271 *J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* **2012**, *76*, 1274–1282, doi:10.1253/circj.cj-11-0768.
1272 238. Ho-Tin-Noé, B.; Le Dall, J.; Gomez, D.; Louedec, L.; Vranckx, R.; El-Bouchtaoui, M.; Legrès, L.; Meilhac, O.;
1273 Michel, J.-B. Early atheroma-derived agonists of peroxisome proliferator-activated receptor-γ trigger
1274 intramedial angiogenesis in a smooth muscle cell-dependent manner. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 1003–1014,
1275 doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.235390.
1276 239. Michel, J.-B.; Martin-Ventura, J.L.; Nicoletti, A.; Ho-Tin-Noé, B. Pathology of human plaque vulnerability:

1277 mechanisms and consequences of intraplaque haemorrhages. *Atherosclerosis* **2014**, *234*, 311–319,
1278 doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.020.
1279 240. Ferrara, N.; Winer, J.; Burton, T. Aortic smooth muscle cells express and secrete vascular endothelial growth
1280 factor. *Growth Factors Chur Switz.* **1991**, *5*, 141–148, doi:10.3109/08977199109000278.
1281 241. Kuzuya, M.; Satake, S.; Esaki, T.; Yamada, K.; Hayashi, T.; Naito, M.; Asai, K.; Iguchi, A. Induction of
1282 angiogenesis by smooth muscle cell-derived factor: possible role in neovascularization in atherosclerotic plaque.
1283 *J. Cell. Physiol.* **1995**, *164*, 658–667, doi:10.1002/jcp.1041640324.
1284 242. Camaré, C.; Pucelle, M.; Nègre-Salvayre, A.; Salvayre, R. Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox*
1285 *Biol.* **2017**, *12*, 18–34, doi:10.1016/j.redox.2017.01.007.
1286 243. Post, S.; Peeters, W.; Busser, E.; Lamers, D.; Sluijter, J.P.G.; Goumans, M.-J.; de Weger, R.A.; Moll, F.L.;
1287 Doevendans, P.A.; Pasterkamp, G.; et al. Balance between angiopoietin-1 and angiopoietin-2 is in favor of
1288 angiopoietin-2 in atherosclerotic plaques with high microvessel density. *J. Vasc. Res.* **2008**, *45*, 244–250,
1289 doi:10.1159/000112939.
1290 244. Tintut, Y.; Patel, J.; Territo, M.; Saini, T.; Parhami, F.; Demer, L.L. Monocyte/macrophage regulation of
1291 vascular calcification in vitro. *Circulation* **2002**, *105*, 650–655, doi:10.1161/hc0502.102969.
1292 245. Ikeda, K.; Souma, Y.; Akakabe, Y.; Kitamura, Y.; Matsuo, K.; Shimoda, Y.; Ueyama, T.; Matoba, S.; Yamada,
1293 H.; Okigaki, M.; et al. Macrophages play a unique role in the plaque calcification by enhancing the osteogenic
1294 signals exerted by vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *425*, 39–44,
1295 doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.045.
1296 246. Champagne, C.M.; Takebe, J.; Offenbacher, S.; Cooper, L.F. Macrophage cell lines produce osteoinductive
1297 signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone* **2002**, *30*, 26–31, doi:10.1016/s8756-3282(01)00638-x.
1298 247. Shi, X.; Cai, H.; Wang, F.; Liu, R.; Xu, X.; Li, M.; Han, Y.; Yin, Q.; Ye, R.; Liu, X. Cholesterol Crystals are
1299 Associated with Carotid Plaque Vulnerability: An Optical Coherence Tomography Study. *J. Stroke Cerebrovasc.*
1300 *Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* **2020**, *29*, 104579, doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.104579.
1301 248. Dai, J.; Tian, J.; Hou, J.; Xing, L.; Liu, S.; Ma, L.; Yu, H.; Ren, X.; Dong, N.; Yu, B. Association between
1302 cholesterol crystals and culprit lesion vulnerability in patients with acute coronary syndrome: An optical
1303 coherence tomography study. *Atherosclerosis* **2016**, *247*, 111–117, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.02.010.
1304 249. C, F.; J, D.; S, Z.; Y, W.; J, W.; L, L.; H, Y.; G, W.; X, Z.; N, F.; et al. Culprit lesion morphology in young
1305 patients with ST-segment elevated myocardial infarction: A clinical, angiographic and optical coherence
1306 tomography study. *Atherosclerosis* **2019**, *289*, 94–100, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2019.08.011.
1307 250. Durham, A.L.; Speer, M.Y.; Scatena, M.; Giachelli, C.M.; Shanahan, C.M. Role of smooth muscle cells in
1308 vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc. Res.* **2018**, *114*, 590–600,
1309 doi:10.1093/cvr/cvy010.
1310 251. Alexander, M.R.; Owens, G.K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic
1311 switching in vascular development and disease. *Annu. Rev. Physiol.* **2012**, *74*, 13–40, doi:10.1146/annurev-physiol-
1312 012110-142315.
1313 252. Gomez, D.; Swiatlowska, P.; Owens, G.K. Epigenetic Control of Smooth Muscle Cell Identity and Lineage
1314 Memory. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2015**, *35*, 2508–2516, doi:10.1161/ATVBAHA.115.305044.
1315 253. Zebboudj, A.F.; Imura, M.; Boström, K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic
1316 protein-2. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4388–4394, doi:10.1074/jbc.M109683200.
1317 254. Hruska, K.A.; Mathew, S.; Saab, G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ. Res.* **2005**,

1318 *97*, 105–114, doi:10.1161/01.RES.00000175571.53833.6c.
1319 255. Munroe, P.B.; Olgunturk, R.O.; Fryns, J.P.; Van Maldergem, L.; Ziereisen, F.; Yuksel, B.; Gardiner, R.M.;
1320 Chung, E. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat. Genet.*
1321 **1999**, *21*, 142–144, doi:10.1038/5102.
1322 256. Byon, C.H.; Javed, A.; Dai, Q.; Kappes, J.C.; Clemens, T.L.; Darley-Usmar, V.M.; McDonald, J.M.; Chen, Y.
1323 Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2
1324 by AKT signaling. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 15319–15327, doi:10.1074/jbc.M800021200.
1325 257. Yamada, S.; Taniguchi, M.; Tokumoto, M.; Toyonaga, J.; Fujisaki, K.; Suehiro, T.; Noguchi, H.; Iida, M.;
1326 Tsuruya, K.; Kitazono, T. The antioxidant tempol ameliorates arterial medial calcification in uremic rats:
1327 important role of oxidative stress in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *J. Bone*
1328 *Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **2012**, *27*, 474–485, doi:10.1002/jbmr.539.
1329 258. Nakano-Kurimoto, R.; Ikeda, K.; Uraoka, M.; Nakagawa, Y.; Yutaka, K.; Koide, M.; Takahashi, T.; Matoba,
1330 S.; Yamada, H.; Okigaki, M.; et al. Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the
1331 calcification through initiating the osteoblastic transition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, *297*, H1673-
1332 1684, doi:10.1152/ajpheart.00455.2009.
1333 259. Ye, G.J.C.; Nesmith, A.P.; Parker, K.K. The role of mechanotransduction on vascular smooth muscle
1334 myocytes' [corrected] cytoskeleton and contractile function. *Anat. Rec. Hoboken NJ 2007* **2014**, *297*, 1758–1769,
1335 doi:10.1002/ar.22983.
1336 260. Pepper, J. Differential aspects of the disease and treatment of Thoracic Acute Aortic Dissection (TAAD)-the
1337 European experience. *Ann. Cardiothorac. Surg.* **2016**, *5*, 360–367, doi:10.21037/acs.2016.06.05.
1338 261. Shroff, R.C.; McNair, R.; Figg, N.; Skepper, J.N.; Schurgers, L.; Gupta, A.; Hiorns, M.; Donald, A.E.;
1339 Deanfield, J.; Rees, L.; et al. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle
1340 cell apoptosis. *Circulation* **2008**, *118*, 1748–1757, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.783738.
1341 262. Reynolds, J.L.; Joannides, A.J.; Skepper, J.N.; McNair, R.; Schurgers, L.J.; Proudfoot, D.; Jahnen-Dechent,
1342 W.; Weissberg, P.L.; Shanahan, C.M. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated
1343 calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential
1344 mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **2004**, *15*, 2857–2867,
1345 doi:10.1097/01.ASN.0000141960.01035.28.
1346

© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1347

Article 2

Date de soumission : 13 Décembre 2020 – Date de publication : 19 Janvier 2021

Objectifs

Lors d'une première approche visant à évaluer le potentiel antioxydant de différentes préparations de plantes médicinales, nous avons observé que les décoctions de plantes médicinales constituaient une source de polyphénols plus importante que les infusions avec des capacités antioxydantes comparables. Notre hypothèse est que l'utilisation de décoctions de plantes médicinales pourrait être envisagée dans la prévention ou l'identification de molécules actives utilisables dans le traitement de l'athérosclérose.

Les recherches bibliographiques menées lors de la rédaction de la revue ont souligné l'importance des macrophages dans le développement de l'athérosclérose.

L'objectif de ces travaux est d'évaluer les potentiels effets protecteurs des décoctions de plantes médicinales sur un modèle de macrophage murin RAW 264.7 exposé à différents phénomènes liés au contexte d'athérosclérose :

- La cytotoxicité induite par les LDL oxydées
- L'activation de la voie NF-κB sous l'influence du LPS d'*E. coli*
- La captation de LDL oxydées marquées

- *Le stress oxydant (data non présentées dans l'article)*

nutrients

MDPI

Article

Protective Effects of Medicinal Plant Decoctions on Macrophages in the Context of Atherosclerosis

Eloïse Checkouri [1,2], Stéphane Ramin-Mangata [1], Nicolas Diotel [1], Wildriss Viranaicken [3], Claude Marodon [4], Franck Reignier [2], Christine Robert-Da Silva [1] and Olivier Meilhac [1,5,*]

1 Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète Athérothrombose Thérapies Réunion Océan Indien (DéTROI), 97490 Sainte-Clotilde, La Réunion, France; eloise.checkouri@gmail.com (E.C.); stephane.ramin-mangata@univ-reunion.fr (S.R.-M.); nicolas.diotel@univ-reunion.fr (N.D.); christine.robert@univ-reunion.fr (C.R.-D.S.)
2 Habemus Papam, Food Industry, 97470 Saint-Benoit, La Réunion, France; franck.reignier@hotmail.com
3 Université de La Réunion, UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT) INSERM 1187, CNRS 9192, 97490 Sainte-Clotilde, La Réunion, France; wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr
4 APLAMEDOM Réunion, 1, rue Emile Hugot, Batiment B, Parc Technologique de Saint Denis, 97490 Sainte Clotilde, La Réunion, France; claude.marodon@wanadoo.fr
5 CHU de La Réunion, CIC 1410, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France
* Correspondence: olivier.meilhac@inserm.fr; Tel.: +33-262-262-938811

Abstract: Atherosclerosis is a hallmark of most cardiovascular diseases. The implication of macrophages in this pathology is widely documented, notably for their contribution to lipid accumulation within the arterial wall, associated with oxidative stress and inflammation processes. In order to prevent or limit the atherosclerosis damage, nutritional approaches and medicinal plant-based therapies need to be considered. In Reunion Island, medicinal plant-based beverages are traditionally used for their antioxidant, lipid-lowering and anti-inflammatory properties. The aim of our study was to assess the protective effects of eight medicinal plant decoctions in an in vitro model of RAW 264.7 murine macrophages exposed to pro-atherogenic conditions (oxidized low-density lipoproteins—ox-LDL—*E. coli* Lipopolysaccharides—LPS). The impact of polyphenol-rich medicinal plant decoctions on cell viability was evaluated by Neutral Red assay. Fluorescent ox-LDL uptake was assessed by flow cytometry and confocal microscopy. Activation of NF-κB was evaluated by quantification of secreted alkaline phosphatase in RAW-Blue™ macrophages. Our results show that medicinal plant decoctions limited the cytotoxicity induced by ox-LDL on macrophages. Flow cytometry analysis in macrophages demonstrated that medicinal plant decoctions from *S. cumini* and *P. mauritianum* decreased ox-LDL uptake and accumulation by more than 70%. In addition, medicinal plant decoctions also inhibited NF-κB pathway activation in the presence of pro-inflammatory concentrations of *E. coli* LPS. Our data suggest that medicinal plant decoctions exert protective effects on ox-LDL-induced cytotoxicity and limited macrophage lipid uptake. Moreover, herbal preparations displayed anti-inflammatory properties on macrophages that can be of interest for limiting the atherosclerotic process.

Keywords: medicinal plant decoction; atherosclerosis; polyphenols; Reunion Island

check for updates

Citation: Checkouri, E.; Ramin-Mangata, S.; Diotel, N.; Viranaicken, W.; Marodon, C.; Reignier, F.; Robert-Da Silva, C.; Meilhac, O. Protective Effects of Medicinal Plant Decoctions on Macrophages in the Context of Atherosclerosis. *Nutrients* **2021**, *13*, 280. https://doi.org/10.3390/nu13010280

Received: 14 December 2020
Accepted: 18 January 2021
Published: 19 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Cardiovascular diseases are among the leading causes of death worldwide [1]. Atherosclerosis is considered to be one of the main pathophysiological causes leading to a cardiovascular event. This process, causing progressive obstruction and stiffening of the arteries is favored by several risk factors such as smoking, hypertension, diabetes and dyslipidemia [2].

The first steps of atherosclerosis involve endothelial shear stress and low-density lipoprotein (LDL) deposits in the subendothelial space [3]. LDL oxidation takes place

within the intimal compartment and promotes monocyte attraction, leading to their differentiation into macrophages [4–6]. The excessive and unregulated uptake of oxidized low-density lipoproteins (ox-LDLs) by macrophages triggers their transformation into foam cells and induces cell death (contributing to the necrotic core formation) [7–11]. Mechanisms of oxidative stress triggered by ox-LDLs and inflammation (cytokine secretion, apoptosis and necrosis) participate in the aggravation of atherosclerosis [12,13]. Macrophages play a crucial role in the development and the potential resolution of atherosclerosis, by participating in all steps of atherogenesis, from the initial lipid accumulation to the plaque rupture that leads to clinical events [14,15]. Targeting macrophage metabolism and response to oxidative stress and inflammation in atherosclerosis could thus represent a therapeutic option in the management of this pathology [16,17].

Polyphenols are the most abundant antioxidants in human diet. More than 8000 polyphenols have been identified and several studies highlight their bioavailability and bioactivity [18–20]. Moreover, numerous studies underline the beneficial effects of dietary polyphenols (notably flavonoids) and medicinal plant components in atherosclerosis [21–23]. In addition, polyphenols are extensively described in the literature for their potential protective effects on cytotoxicity, foam cell formation and cholesterol efflux in the context of atherosclerosis [24,25].

Reunion Island is a hotspot of biodiversity with 22 plants listed in the French Pharmacopeia, widely used by the population for antioxidant, lipid-lowering and anti-inflammatory properties [26]. Our previous study on eight medicinal plants used in Reunion Island revealed the presence of bioactive polyphenols (such as quercetin, gallic acid, mangiferin) and antioxidant properties on in vitro models (human red blood cells and murine preadipocytes 3T3-L1) [27]. Ethnopharmacological studies support the interest of medicinal plant antioxidant and anti-inflammatory activities in the management of different pathologies including atherosclerosis [28–31].

In this study, eight medicinal plant decoctions used in Reunion Island were evaluated for their possible contribution to atherosclerosis prevention and treatment: *Aphloia theiformis*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa*, *Hubertia ambavilla*, *Hypericum lanceolatum*, *Pelargonium x graveolens*, *Psiloxylon mauritianum* and *Syzygium cumini*. Based on our previous study [27] reporting the composition and antioxidant effects of infusions and decoction of these eight plants, we hypothesized that the variety of polyphenols contained in these extracts could confer them interesting properties to limit the processes underlying atherogenesis. Medicinal plants with a higher polyphenol content, especially those containing quercetin, isorhamnetin, chlorogenic acid or kaempferol, could have an interesting bioactivity in this context [32–36]. The impact of the medicinal plant decoctions on macrophage cytotoxicity induced by ox-LDL and inflammation-induced NF-κB signaling pathway as well as on ox-LDL uptake was also investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Raw Material

All raw material was provided by HABEMUS PAPAM Industry proceeded with the following industrial process: trimming, microwave dehydration, grinding and packaging in tea bags containing 1 g of plant powder. Industrial lots and corresponding GPS coordinates are described in our previous study [27].

2.2. Preparation of the Decoctions

Decoctions were prepared by adding one tea bag containing 1 g of plant to 1 L of room temperature (RT) distilled water and kept boiling for 30 min. The tea bags were removed and the decoctions were cooled at RT before storage at −80 °C until analysis. Characterization of the polyphenol contents and antioxidant activity of the decoctions are reported in our previous study [27].

2.3. LDL Isolation

LDLs were extracted from a pool of plasma from 5 healthy subjects obtained from the "French Blood Agency", according to an agreement signed between Inserm and "Etablissement Français du Sang", which governs the supply of blood-derived products, in compliance with the French Ethical laws. Plasma was adjusted to a density of 1.063 g/mL by addition of solid KBr (Bio basic Inc., Markham, ON, Canada), with gentle stirring. Beckman Ultra-ClearTM sealing ultracentrifuge tubes (Beckman Coulter, Villepinte, France) were filled with an aqueous solution of KBr (d = 1.063) and the plasma (15 mL) was added underneath to obtain a discontinuous density gradient. Finally, 3 mL of distilled water were added before sealing. Samples underwent an ultracentrifugation at 252,000 *g* for 20 h, at 10 °C. Yellow LDL fractions were collected with a 10 mL syringe and followed a desalting step using centrifugal devices (50 mL centricon, 10 kDa cutoff, Millipore, Merk, Darmstadt, Germany) with 5 washed with PBS after successive centrifugations (4000× *g*/20 min). The purity of LDL was assessed by SDS-PAGE followed by Coomassie staining in order to detect potential protein contaminants. LDL protein concentration was quantified by using DC Protein Assay kit (Life Science, Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France). LDL were stored at 4 °C in the dark and sterilized by filtration on a 0.2 µm membrane before use in cell culture.

2.4. LDL Oxidation

LDLs were diluted in 1X PBS to reach the concentration of 2 mg/mL and 5 µM final of $CuSO_4$ (Thermo Fisher Scientific, Dardilly, France) was added before UV-C exposure for 2 h at RT, in order to obtain mildly oxidized LDL [37]. The degree of oxidation was assessed by quantifying thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to Ohkawa et al. [38].The samples reached 18.07 ± 0.5 nmol/mg proteins [38]. Ox-LDL were stored at 4 °C in the dark and sterilized by filtration on a 0.2 µm membrane before use for cell culture.

2.5. Dil-ox-LDL Production

LDLs were first oxidized and then labelled with $DilC_{18}$ (3,3′-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate) (Thermo Fisher Scientific, Dardilly, France), a lipophilic fluorescent probe that interacts with phospholipid layer membranes, leading to the formation of fluorescent Dil-LDL detectable at excitation and emission wavelengths of respectively 549 nm and 565 nm. Dil-ox-LDL production was done according to Xu et al., with slight modifications [39]. Ox-LDL were incubated overnight at 37 °C under gentle agitation with of Dil stock solution (3 mg/mL in DMSO) to reach a final concentration of 0.1 mg/mL. The excess of the unbound probe was filtered through a 0.2 µm membrane to discard undissolved crystals and then re-isolated by ultracentrifugation as described above (in KBr at 252,000 *g* for 20 h at 10 °C). The pink Dil-ox-LDL layer was recovered and desalted as described above. Filtered sterilized Dil-ox-LDL were added to cells at a final concentration of 100 µg/mL.

2.6. Cell Culture

RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) murine macrophages were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC©, Manassas, VA, USA). The culture medium included Dulbecco's modified Eagle's medium with 25 mM glucose, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 5 mM L-glutamine, 2 µg/mL streptomycin and 0.03 µg/mL penicillin (Pan Biotech, Dutscher, Brumath, France). Cells were maintained in a humidified 5% CO_2 incubator at 37 °C for 4 days before the assay when a 70–80% confluency was reached.

2.7. Neutral Red Assay

Cell viability was assessed by measuring the intake of neutral red as described by Repetto et al., with slight modifications [40]. This test is based on the capacity of viable cell lysosomes to incorporate neutral red dye solution. Cells were first seeded at 250×10^3 cells/mL in a 96-well plate for 24 h. Before incubation with LDL (native of oxidized), cells

were serum-starved for 16 h. Stimulation with medicinal plant decoctions (40 μg/mL) and/or with native or oxidized LDL (50 μg/mL to 300 μg/mL) was carried out for 8, 16 and 24 h. The medium was removed and cells were washed twice with PBS. 100 μL of neutral red solution (40 μg/mL) was added and the cells were then incubated for 2 h at 37 °C. After 2 washes with PBS, neutral red destain solution (49.5% water, 49.5% ethanol, 1% glacial acetic acid) was added and the absorbance was read at 540 nm. Triton X100 (1%) was used as positive control for cytotoxicity (100% of cell death). Results are expressed as percentages of the control untreated cells.

2.8. Fluorescence and Confocal Microscopy

RAW 264.7 macrophages were seeded at 200 × 10^3 cells/mL on coverslips in a 24-well plate and FBS-starved for 16 h before stimulation. Cells were washed with 500 μL of PBS and incubated for 4 h at 37 °C/5% CO_2 with cell culture medium supplemented with Dil-ox-LDL. After the incubation, cells were rinsed 3 times with PBS and fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min. Cells were rinsed twice with PBS, incubated with DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindol, 1 ng/mL, Life Technologies) for 10 min and rinsed twice with PBS. The coverslips were then recovered and sealed before analysis using a Nanozoomer scanner (Hamamatsu, Iwata City, Japan) and a Nikon C2Si confocal microscope (Nikon, Melville, IL, USA).

2.9. Flow Cytometry

RAW 264.7 cells were seeded at 250 × 10^3 cells/mL in a 96-well plate. After 24 h, cells were serum-starved for 16 h. Cells were then stimulated with cell culture medium supplemented with Dil-ox-LDL for 4 h, lifted with Accutase™ (400 units/mL, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Dardilly, France) for 15 min at 37 °C and transferred into a 96-well plate with U-bottom. Cells were fixed with 4% PFA for 15 min at RT and centrifuged at 700× *g* for 1 min. The supernatant was discarded and PBS was added. Cells were centrifuged at 700× *g* for 1 min and re-suspended in 100 μL PBS. Cellular uptake of Dil-ox-LDL was evaluated by measuring the mean phycoerythrin (PE-A) fluorescence on flow cytometer CYTOFLEX (Beckman Coulter, Villepinte, France). Fluorescence was expressed as percent of control.

2.10. Evaluation of NF-κB Activation

RAW-Blue™ cells (monocyte-macrophages) obtained from Invivogen cell culture collection (Invivogen, San Diego, CA, USA), were seeded at a density of 100 × 10^3 cells/well in a 96-well plate. 20 μL of medium supplemented with decoctions (reaching 40 μg plant mash/mL of cell culture medium) was added to the cells. Cells were then immediately treated with *E. coli* lipopolysaccharides (LPS) Ultrapure (Invivogen, San Diego, CA, USA) at a final concentration of 0.5 μg/mL. After 24 h of incubation, 20 μL of medium was recovered and 80 μL of Quantiblue reagent (Invivogen, San Diego, CA, USA) was added. RAW-Blue™ cells stably express secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) inducible by NF-κB. NF-κB activation was evaluated by the measure of the absorbance at 620 nm. Results were expressed as percentages of the control.

2.11. Statistics

Data were expressed as means ± SD of three independent experiments performed in triplicate. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism software (Version 6.01, © 1992–2012 GraphPad Prism Software, Inc., San Diego, CA, USA). Differences between the means were determined by the Bonferroni test and were considered as statistically significant for a p value < 0.05.

3. Results and Discussion

3.1. Medicinal Plant Decoctions Reduce ox-LDL Cytotoxic Conditions

Macrophages are involved in the different steps of atherogenesis from the initial accumulation of foam cells (forming fatty streaks) to more advanced atherosclerotic lesions in the necrotic core. Modulation of macrophage inflammation represents a potential target for the prevention of atherosclerotic plaque development and for limiting plaque rupture leading to clinical events [41,42].

In order to assess the influence of medicinal plant decoctions on macrophage viability, medicinal plant decoctions (40 µg plant mash/mL) were incubated with RAW 264.7 for 24 h (Figure 1a). Cells were first incubated with different concentrations of ox-LDLs (from 50 to 300 µg/mL) (Figure 1b). Once the cytotoxic concentration of ox-LDL was determined, the cytotoxicity was assessed at 8, 16 and 24 h (Figure 1c).

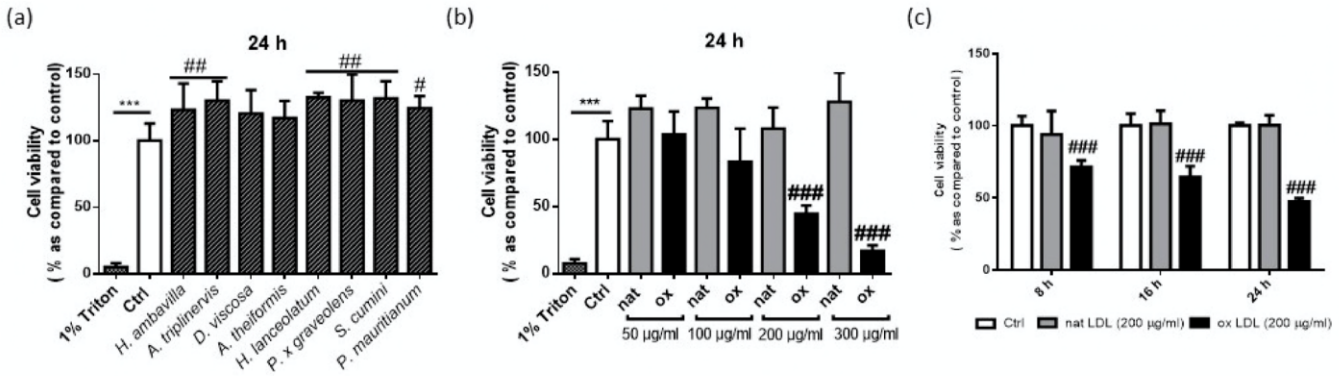


Figure 1. Cell viability of RAW 264.7 macrophages incubated with medicinal plant decoctions (40 µg plant mash/mL) (**a**), different concentrations of native (white) or oxidized low-density lipoproteins (LDL) (black) (**b**), cytotoxic concentration of ox-LDL (200 µg/mL) (**c**). Data shown are means ± SD of three independent experiments. *** $p < 0.005$ as compared to 1% Triton X-100; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.005$ as compared to control (Ctrl).

As presented in Figure 1a, medicinal plant decoctions alone did not significantly decrease cell viability (Figure 1a). In contrast, the significant increase of viable cells incubated with *H. ambavilla*, *A. triplinervis*, *H. lanceolatum*, *P. x graveolens* and *S cumini* could suggest an effect on cell proliferation. Figure 1b shows that incubation with 50 µg/mL ox-LDLs did not induce any cytotoxic effect; the cell viability was comparable to control non-stimulated cells. Using the same concentration of ox-LDLs (50 µg/mL), Ding et al. reported vascular smooth muscle cell proliferation as measured by the MTT assay [43]. This effect was not found in our experimental conditions, using macrophages. A significant decrease in cell viability was observed after the incubation with 200 and 300 µg/mL of ox-LDL (Figure 1b). The concentration of 200 µg/mL of ox-LDL leading to 50% of cell death was selected to assess the potential protective effect of medicinal plant decoctions.

Figure 2 shows the cell viability at 8, 16 and 24 h with cytotoxic concentration of ox-LDL (200 µg/mL) in the presence of medicinal plant decoctions.

Incubation with cytotoxic concentrations of ox-LDL for 8, 16 and 24 h resulted in decreased number of viable cells by 28.52 ± 4.40%, 35.47 ± 7.40% and 52.53 ± 2.43%, respectively. More than 80% of cell viability was observed in co-incubation with *A. theiformis*, *H. lanceolatum*, and *P. x graveolens,* maintaining 83.78 ± 10.91, 81.73 ± 2.60 and 80.98 ± 4.66% of viable cells at 24 h. The presence of polyphenols in the different decoctions may explain this bioactivity. As shown in Figure 2, most of the medicinal plant decoctions tested significantly decreased the cytotoxicity induced by ox-LDL at 8, 16 and 24 h. *H. ambavilla* and *A. triplinervis* displayed moderate effects that were only significant at 24 h and question the physiological relevance of this protection. An interesting aspect that should be taken into account is that *A. theiformis* which contains more than 98% of mangiferin and derivatives showed the higher protective effect. Several studies on mangiferin revealed its

protective effects on cell survival both in vivo and *in vitro*, in models involving oxidative stress [44–46].

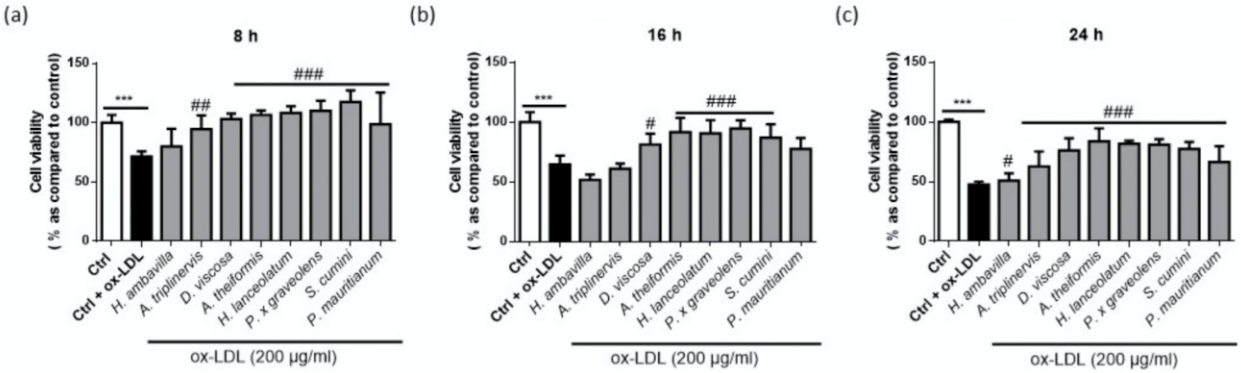


Figure 2. Cell viability of RAW 264.7 macrophages incubated with medicinal plant decoctions and cytotoxic concentration of ox-LDL for 8 (**a**), 16 (**b**) and 24 h (**c**). Data shown are means ± SD of three independent experiments. *** $p < 0.005$ as compared to control untreated cells (0 in white); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.005$ as compared to cells treated with ox LDL (0 in black).

3.2. Medicinal Plant Decoctions Reduce the Dil-ox-LDL Uptake by RAW 264.7 Macrophages

Fatty streak formation is defined by the presence of lipid accumulation within the arterial subendothelial space (intima). In response to excessive accumulation of ox-LDL in the intima, macrophages take up modified LDL (including ox-LDL) in an uncontrolled fashion, leading to their transformation into foam cells. In contrast to native LDL endocytosis by the canonical LDL receptor, oxidized LDL uptake by scavenger receptors is not downregulated by a negative feedback loop [47]. Furthermore, lysosomal degradation of ox-LDL is partial and leads to intracellular lipid peroxide accumulation [48]. When foam cells are unable to accumulate more lipids, they trigger apoptosis and secondary necrosis processes. Several studies also showed the contribution of foam cells in inflammation, notably by secretion of cytokines and the release of cell debris [49,50]. Indeed, preventing foam cell formation is a therapeutic strategy to slow down the atherosclerosis process and some components such as quercetin and curcumin showed encouraging inhibitory effects [7,25,51].

As presented in Figure 3, quantitative analysis by flow cytometry (Figure 3a,b) showed that *H. lanceolatum*, *P. x graveolens*, *S. cumini* and *P. mauritianum* significantly decreased the Dil-ox-LDL uptake. Interestingly, *S. cumini* and *P. mauritianum* respectively inhibited Dil-ox-LDL uptake by 71.4 ± 8.67% and 74.3 ± 7.01%. Cells incubated with *A. triplinervis* showed similar profiles to that of control cells + Dil-ox-LDL, whereas *P. mauritianum* decoction, traditionally described for cholesterol lowering properties [26], was associated with a decreased abundance of intracellular Dil-ox-LDL (Figure 3c,d show immunocytofluorescence analyses of RAW 264.7 macrophages incubated with fluorescent Dil-ox-LDL with *A. triplinervis*, *P. mauritianum* decoctions or PBS). This property could support the traditionally described beneficial effect of *P. mauritianum* in cardiovascular diseases. However, this should be tested in vivo in order to assess its capacity to lower cholesterol levels (as suggested by ethnopharmacological data) and potentially to prevent foam cell formation. Our results suggest that medicinal plant decoctions could constitute a therapeutic option to prevent or reduce atherosclerosis progression, that would deserve in vivo experiments in pre-clinical models.

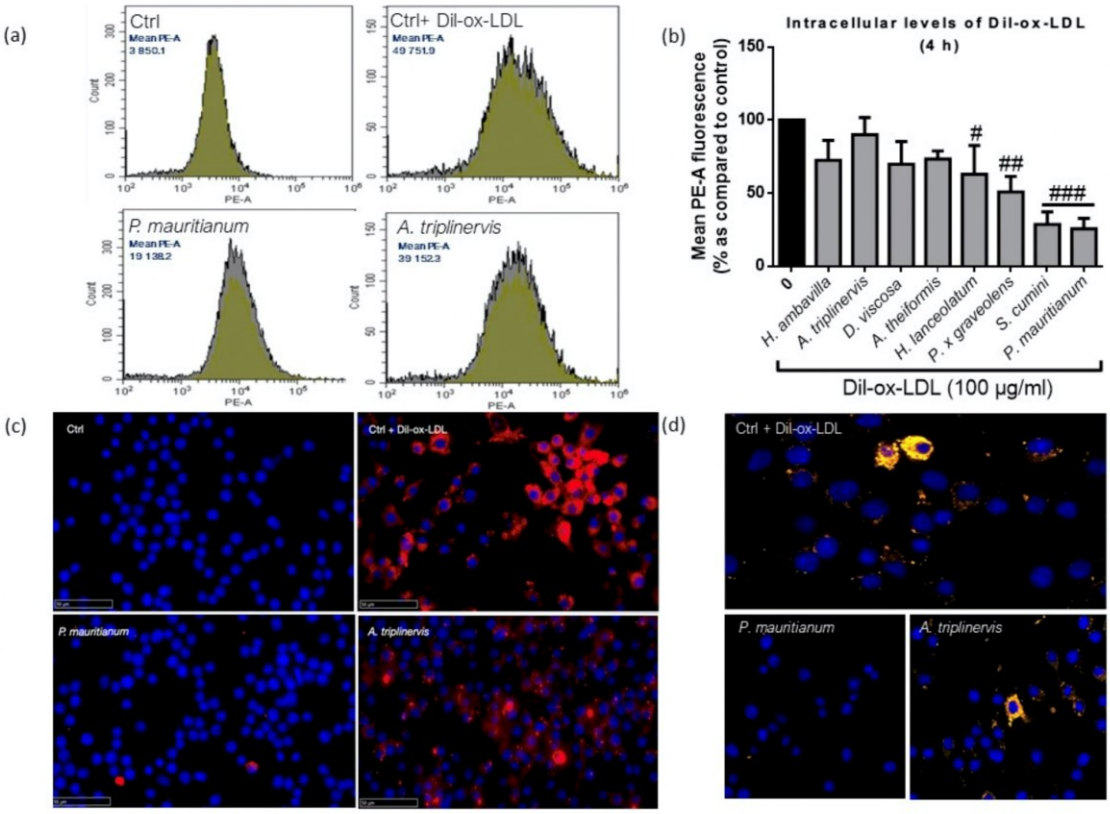


Figure 3. Dil-ox-LDL uptake by RAW 264.7 macrophages in the presence of medicinal plant decoctions analyzed by flow cytometry (**a**,**b**), nanozoomer scanner (**c**) and confocal microscopy (**d**), data shown in (**b**) are means ± SD of three independent experiments. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.005$ as compared to cells treated with Dil-ox-LDL (0 in black). Blue color refers to DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindol) nuclear staining and red/yellow colors refer to Dil-ox-LDL, respectively, observed by fluorescence and confocal microscopy.

3.3. Medicinal Plant Decoctions Reduce Lipopolysaccharide-Induced NFkB Activation in RAW-Blue™ Macrophages

NF-κB signaling orchestrates different transcription pathways that regulate gene expression implicated in cytokine, chemokine and adhesion molecule production, cell survival and differentiation [52]. Atherosclerosis is associated with increased production of pro-inflammatory biomarkers such as C-reactive protein (CRP), Interleukin-6 (IL-6) or Interleukin-1β (IL-1β) [53]. Moreover, increased cytokine secretion by pro-inflammatory macrophages favors atherosclerosis progression. RAW-Blue™ macrophages were stimulated with different concentrations of ox-LDL in the presence of medicinal plant decoctions in order to assess their capacity to modulate NF-κB activation (monitored by the detection of secreted embryonic phosphatase alkaline -SEAP- in the medium, induced by NF-κB activation). In our experimental conditions, we were unable to show a significant increase in NF-κB activation after incubation with 100–200 µg/mL ox-LDL. Indeed, only ox-LDL stimulation at the cytotoxic concentration of 300 µg/mL (83% cell death) led to a significant increase of 61.1 ± 5.48% of SEAP release whereas 0.5 µg/mL LPS led to an increase of 165 ± 19.82% without altering cell viability. Because lipopolysaccharides (LPS) from bacteria such as *P. gingivalis* or *E. coli* are also known to exacerbate inflammation (IL-6, TNF-a secretion, NF-κB activation) and may be associated with atherosclerosis [30,54], we tested the macrophage response to LPS in the presence of medicinal plant decoctions. Our results presented in Figure 4, showed that *E. coli* LPS triggers SEAP levels to 209.1 ± 45.92% as

compared to control. Medicinal plant decoctions (40 µg/mL) significantly reduced NF-κB activation induced by *E. coli* LPS (0.5 µg/mL).

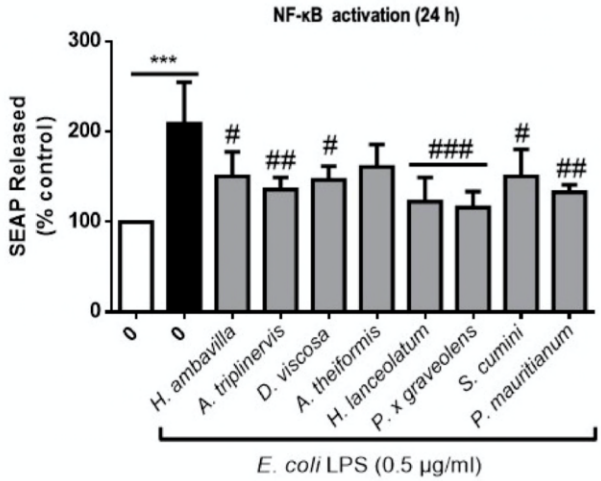


Figure 4. Modulation of NF-κB activation by medicinal plant decoctions (24 h). Data shown are means ± SD of three independent experiments. *** $p < 0.005$ as compared to cells untreated with lipopolysaccharides (LPS) (0 in white); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.005$ compared to cells treated with LPS (black bar).

The greatest inhibition of LPS NF-κB activation was observed for *P. x graveolens*, *H. lanceolatum* and *P. mauritianum* with, respectively, 93.0 ± 17.84, 86.4 ± 27.06 and 76.1 ± 8.33% of inhibition. Surprisingly, even if our results confirmed *H. lanceolatum* anti-inflammatory properties that were traditionally described, *P. x graveolens* showed stronger effects. Our results also underline the potential of most of our selected medicinal plant decoctions in the management of inflammation. Indeed, seven out of eight medicinal plant preparations significantly reduced SEAP release. A decrease of SEAP release was also observed for *A. theiformis* even if it was not statistically significant relative to the control (48.0 ± 24.99%; $p < 0.08$).

4. Conclusions

Medicinal plant decoctions traditionally used in Reunion Island could represent the basis of new therapeutic strategies aimed at preventing or limiting the progression of atherosclerosis [27,31]. Many medicinal plants from Reunion Island are rich in polyphenols, and their composition is described in our previous study [27]. Among these compounds, flavonoids such as quercetin could be, at least in part, responsible for the bioactivity of these plant-based herbal teas. Different studies also highlighted other polyphenols such as chlorogenic acid, kaempferol or mangiferin, reported to limit the cytotoxicity induced by fatty acids and oxidative stress [55–60]. This is consistent with the beneficial effects of decoctions from the eight selected plants from Reunion Island tested in this study, traditionally used for their antioxidant, anti-inflammatory and lipid-lowering properties. It cannot be excluded that these active ingredients act synergistically. The interest of the present study is to document the effects of complex mixtures of bioactive compounds (herbal teas rich in polyphenols) according to their traditional use in Reunion Island. Identification of the exact bioactive molecules in these plants is of interest and should be further investigated in complementary studies.

Our study has a number of limitations:

- Murine macrophages were used and stimulated by human LDLs. This experimental design is commonly used in the literature. In addition, this cellular model was chosen as we plan to carry out in vivo studies to assess the bioactivity of decoctions in a

mouse model of atherosclerosis. Furthermore, isolation of LDLs in mice is difficult to achieve due to limited blood volume [55].

- The precise compounds and mechanisms responsible for the inhibition of the uptake of ox-LDL by *P mauritianum* and *S cumini* decoctions would deserve further investigation but cannot be explained by the presence of a single compound. Each decoction constitutes a complex set of molecules that can exert their effects synergistically. In addition, mechanistic aspects could to be investigated (for example, the study of the impact of decoctions on the expression of scavengers' receptors).
- In a physiological context, polyphenols can be transformed into secondary metabolites by intestinal of hepatic enzymes (including both host and microbiota enzymes).
- In order to be able to evaluate the curative or preventive potential of the different decoctions tested, our in vitro study would benefit from being extended by studies on an in vivo model.
- In summary, we demonstrated the effects of eight medicinal plant decoctions on ox-LDL cytotoxicity; we then showed that certain medicinal plant decoctions were able to significantly limit ox-LDL uptake and subsequent foam cell formation. Finally, we report the potential of decoctions to inhibit NF-κB activation, suggesting that herbal teas may prevent the activation of inflammatory signaling pathways.

Author Contributions: Conceptualization, E.C., O.M., C.R.-D.S. and F.R.; methodology, E.C., O.M., S.R.-M., N.D. and W.V. validation, E.C., O.M. and C.R.-D.S.; formal analysis, E.C.; investigation, E.C., S.R.-M., N.D. and W.V., resources, F.R. and C.M.; data curation, E.C., O.M. and C.R.-D.S, writing—original draft preparation, E.C.; writing—review and editing, E.C., O.M. and C.R.-D.S.; supervision, O.M. and C.R.-D.S.; project administration, O.M.; funding acquisition, O.M. and F.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by FEDER RE0001897 (EU—Région Réunion—French State national counterpart), as well as the BIOST Fédération.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge HABEMUS PAPAM for providing plant material. EC is financially supported by the National Agency of Research and Technology (ANRT).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Roth, G.A.; Johnson, C.; Abajobir, A.; Abd-Allah, F.; Abera, S.F.; Abyu, G.; Ahmed, M.; Aksut, B.; Alam, T.; Alam, K.; et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *70*, 1–25. [CrossRef] [PubMed]
2. Yusuf, S.; Hawken, S.; Ôunpuu, S.; Dans, T.; Avezum, A.; Lanas, F.; McQueen, M.; Budaj, A.; Pais, P.; Varigos, J.; et al. Effect of Potentially Modifiable Risk Factors Associated with Myocardial Infarction in 52 Countries (the INTERHEART Study): Case-Control Study. *Lancet* **2004**, *364*, 937–952. [CrossRef]
3. Stary, H.C.; Chandler, A.B.; Glagov, S.; Guyton, J.R.; Insull, W.; Rosenfeld, M.E.; Schaffer, S.A.; Schwartz, C.J.; Wagner, W.D.; Wissler, R.W. A Definition of Initial, Fatty Streak, and Intermediate Lesions of Atherosclerosis. A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.* **1994**, *14*, 840–856. [CrossRef]
4. Chistiakov, D.A.; Melnichenko, A.A.; Orekhov, A.N.; Bobryshev, Y.V. How Do Macrophages Sense Modified Low-Density Lipoproteins? *Int. J. Cardiol.* **2017**, *230*, 232–240. [CrossRef] [PubMed]
5. Quinn, M.T.; Parthasarathy, S.; Fong, L.G.; Steinberg, D. Oxidatively Modified Low Density Lipoproteins: A Potential Role in Recruitment and Retention of Monocyte/Macrophages during Atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2995–2998. [CrossRef]
6. Gerrity, R.G. The Role of the Monocyte in Atherogenesis: II. Migration of Foam Cells from Atherosclerotic Lesions. *Am. J. Pathol.* **1981**, *103*, 191–200. [PubMed]
7. Maguire, E.M.; Pearce, S.W.A.; Xiao, Q. Foam Cell Formation: A New Target for Fighting Atherosclerosis and Cardiovascular Disease. *Vascul. Pharmacol.* **2019**, *112*, 54–71. [CrossRef]

8. Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature* **2000**, *407*, 233–241. [CrossRef] [PubMed]
9. Gonzalez, L.; Trigatti, B.L. Macrophage Apoptosis and Necrotic Core Development in Atherosclerosis: A Rapidly Advancing Field with Clinical Relevance to Imaging and Therapy. *Can. J. Cardiol.* **2017**, *33*, 303–312. [CrossRef] [PubMed]
10. Chistiakov, D.A.; Melnichenko, A.A.; Myasoedova, V.A.; Grechko, A.V.; Orekhov, A.N. Mechanisms of Foam Cell Formation in Atherosclerosis. *J. Mol. Med.* **2017**, *95*, 1153–1165. [CrossRef]
11. Tabas, I.; Bornfeldt, K.E. Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 653–667. [CrossRef] [PubMed]
12. Cicero, A.F.G.; Kuwabara, M.; Johnson, R.; Bove, M.; Fogacci, F.; Rosticci, M.; Giovannini, M.; D'Addato, S.; Borghi, C. Brisighella Heart Study group LDL-Oxidation, Serum Uric Acid, Kidney Function and Pulse-Wave Velocity: Data from the Brisighella Heart Study Cohort. *Int. J. Cardiol.* **2018**, *261*, 204–208. [CrossRef]
13. Ricci, C.; Ruscica, M.; Camera, M.; Rossetti, L.; Macchi, C.; Colciago, A.; Zanotti, I.; Lupo, M.G.; Adorni, M.P.; Cicero, A.F.G.; et al. PCSK9 Induces a Pro-Inflammatory Response in Macrophages. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2267. [CrossRef]
14. Barrett, T.J. Macrophages in Atherosclerosis Regression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2020**, *40*, 20–33. [CrossRef]
15. Bobryshev, Y.V.; Ivanova, E.A.; Chistiakov, D.A.; Nikiforov, N.G.; Orekhov, A.N. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
16. He, W.; Kapate, N.; Shields, C.W.; Mitragotri, S. Drug Delivery to Macrophages: A Review of Targeting Drugs and Drug Carriers to Macrophages for Inflammatory Diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, 165–166. [CrossRef] [PubMed]
17. Tiwari, R.L.; Singh, V.; Barthwal, M.K. Macrophages: An Elusive yet Emerging Therapeutic Target of Atherosclerosis. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 483–544. [CrossRef] [PubMed]
18. Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073S–2085S. [CrossRef]
19. Pérez-Jiménez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A. Identification of the 100 Richest Dietary Sources of Polyphenols: An Application of the Phenol-Explorer Database. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2010**, *64*, S112–S120. [CrossRef] [PubMed]
20. Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Humans. I. Review of 97 Bioavailability Studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 230S–242S. [CrossRef] [PubMed]
21. Liu, L.-K.; Lee, H.-J.; Shih, Y.-W.; Chyau, C.-C.; Wang, C.-J. Mulberry Anthocyanin Extracts Inhibit LDL Oxidation and Macrophage-Derived Foam Cell Formation Induced by Oxidative LDL. *J. Food Sci.* **2008**, *73*, H113–H121. [CrossRef] [PubMed]
22. Torres-Rodríguez, M.L.; García-Chávez, E.; Berhow, M.; de Mejia, E.G. Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Effect of Calea Urticifolia Lyophilized Aqueous Extract on Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *188*, 266–274. [CrossRef] [PubMed]
23. Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 287–306. [CrossRef]
24. Chang, Y.-C.; Lee, T.-S.; Chiang, A.-N. Quercetin Enhances ABCA1 Expression and Cholesterol Efflux through a P38-Dependent Pathway in Macrophages. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 1840–1850. [CrossRef] [PubMed]
25. Lin, X.; Liu, M.-H.; Hu, H.-J.; Feng, H.; Fan, X.-J.; Zou, W.; Pan, Y.; Hu, X.; Wang, Z. Curcumin Enhanced Cholesterol Efflux by Upregulating ABCA1 Expression through AMPK-SIRT1-LXRα Signaling in THP-1 Macrophage-Derived Foam Cells. *DNA Cell Biol.* **2015**, *34*, 561–572. [CrossRef]
26. Lavergne, R. *Plantes Médicinales Indigènes: Tisanerie et Tisaneurs de la Réunion*; Université Montpellier II—Sciences et Techniques du Languedoc: Montpellier, France, 1989.
27. Checkouri, E.; Reignier, F.; Robert-Da Silva, C.; Meilhac, O. Evaluation of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Aqueous Extracts from Eight Medicinal Plants from Reunion Island: Protection against Oxidative Stress in Red Blood Cells and Preadipocytes. *Antioxidants* **2020**, *9*, 959. [CrossRef] [PubMed]
28. Ghaddar, B.; Veeren, B.; Rondeau, P.; Bringart, M.; d'Hellencourt, C.L.; Meilhac, O.; Bascands, J.-L.; Diotel, N. Impaired Brain Homeostasis and Neurogenesis in Diet-Induced Overweight Zebrafish: A Preventive Role from A. Borbonica Extract. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 14496. [CrossRef]
29. Marimoutou, M.; Le Sage, F.; Smadja, J.; d'Hellencourt, C.L.; Gonthier, M.-P.; Robert-Da Silva, C. Antioxidant Polyphenol-Rich Extracts from the Medicinal Plants Antirhea Borbonica, Doratoxylon Apetalum and Gouania Mauritiana Protect 3T3-L1 Preadipocytes against H_2O_2, TNFα and LPS Inflammatory Mediators by Regulating the Expression of Superoxide Dismutase and NF-KB Genes. *J. Inflamm.* **2015**, *12*, 10. [CrossRef]
30. Le Sage, F.; Meilhac, O.; Gonthier, M.-P. Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Polyphenols Extracted from Antirhea Borbonica Medicinal Plant on Adipocytes Exposed to Porphyromonas Gingivalis and Escherichia Coli Lipopolysaccharides. *Pharmacol. Res.* **2017**, *119*, 303–312. [CrossRef]
31. Taïlé, J.; Arcambal, A.; Clerc, P.; Gauvin-Bialecki, A.; Gonthier, M.-P. Medicinal Plant Polyphenols Attenuate Oxidative Stress and Improve Inflammatory and Vasoactive Markers in Cerebral Endothelial Cells during Hyperglycemic Condition. *Antioxidants* **2020**, *9*, 573. [CrossRef]
32. Luo, Y.; Sun, G.; Dong, X.; Wang, M.; Qin, M.; Yu, Y.; Sun, X. Isorhamnetin Attenuates Atherosclerosis by Inhibiting Macrophage Apoptosis via PI3K/AKT Activation and HO-1 Induction. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120259. [CrossRef] [PubMed]
33. Zhang, F.; Feng, J.; Zhang, J.; Kang, X.; Qian, D. Quercetin Modulates AMPK/SIRT1/NF-KB Signaling to Inhibit Inflammatory/Oxidative Stress Responses in Diabetic High Fat Diet-Induced Atherosclerosis in the Rat Carotid Artery. *Exp. Ther. Med.* **2020**, *20*, 280. [CrossRef]

34. Romero, M.; Jiménez, R.; Sánchez, M.; López-Sepúlveda, R.; Zarzuelo, M.J.; O'Valle, F.; Zarzuelo, A.; Pérez-Vizcaíno, F.; Duarte, J. Quercetin Inhibits Vascular Superoxide Production Induced by Endothelin-1: Role of NADPH Oxidase, Uncoupled ENOS and PKC. *Atherosclerosis* **2009**, *202*, 58–67. [CrossRef] [PubMed]
35. Tsai, K.-L.; Hung, C.-H.; Chan, S.-H.; Hsieh, P.-L.; Ou, H.-C.; Cheng, Y.-H.; Chu, P.-M. Chlorogenic Acid Protects Against OxLDL-Induced Oxidative Damage and Mitochondrial Dysfunction by Modulating SIRT1 in Endothelial Cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62*, e1700928. [CrossRef] [PubMed]
36. Che, J.; Liang, B.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Tang, J.; Shi, G. Kaempferol Alleviates Ox-LDL-Induced Apoptosis by up-Regulation of Autophagy via Inhibiting PI3K/Akt/MTOR Pathway in Human Endothelial Cells. *Cardiovasc. Pathol.* **2017**, *31*, 57–62. [CrossRef]
37. Meilhac, O.; Escargueil-Blanc, I.; Thiers, J.-C.; Salvayre, R.; Nègre-Salvayre, A. Bcl-2 Alters the Balance between Apoptosis and Necrosis, but Does Not Prevent Cell Death Induced by Oxidized Low Density Lipoproteins. *FASEB J.* **1999**, *13*, 485–494. [CrossRef] [PubMed]
38. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351–358. [CrossRef]
39. Xu, S.; Huang, Y.; Xie, Y.; Lan, T.; Le, K.; Chen, J.; Chen, S.; Gao, S.; Xu, X.; Shen, X.; et al. Evaluation of Foam Cell Formation in Cultured Macrophages: An Improved Method with Oil Red O Staining and DiI-OxLDL Uptake. *Cytotechnology* **2010**, *62*, 473–481. [CrossRef]
40. Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J.L. Neutral Red Uptake Assay for the Estimation of Cell Viability/Cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125–1131. [CrossRef]
41. Stary Herbert, C.; Chandler, A.B.; Dinsmore, R.E.; Fuster, V.; Glagov, S.; Insull, W.; Rosenfeld, M.E.; Schwartz Colin, J.; Wagner William, D.; Wissler Robert, W. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. *Circulation* **1995**, *92*, 1355–1374. [CrossRef]
42. Jonasson, L.; Holm, J.; Skalli, O.; Bondjers, G.; Hansson, G.K. Regional Accumulations of T Cells, Macrophages, and Smooth Muscle Cells in the Human Atherosclerotic Plaque. *Arteriosclerosis* **1986**, *6*, 131–138. [CrossRef] [PubMed]
43. Ding, Z.; Liu, S.; Yang, B.; Fan, Y.; Deng, X. Effect of Oxidized Low-Density Lipoprotein Concentration Polarization on Human Smooth Muscle Cells' Proliferation, Cycle, Apoptosis and Oxidized Low-Density Lipoprotein Uptake. *J. R. Soc. Interface* **2011**, *9*, 1233–1240. [CrossRef] [PubMed]
44. Ding, L.-Z.; Teng, X.; Zhang, Z.-B.; Zheng, C.-J.; Chen, S.-H. Mangiferin Inhibits Apoptosis and Oxidative Stress via BMP2/Smad-1 Signaling in Dexamethasone-Induced MC3T3-E1 Cells. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *41*, 2517–2526. [CrossRef]
45. Jiang, T.; Han, F.; Gao, G.; Liu, M. Mangiferin Exert Cardioprotective and Anti-Apoptotic Effects in Heart Failure Induced Rats. *Life Sci.* **2020**, *249*, 117476. [CrossRef] [PubMed]
46. Xu, J.; Yao, H.; Wang, S.; Li, H.; Hou, X. Mangiferin Inhibits Apoptosis and Autophagy Induced by Staphylococcus Aureus in RAW264.7 Cells. *J. Inflamm. Res.* **2020**, *13*, 847–857. [CrossRef] [PubMed]
47. Brown, M.S.; Basu, S.K.; Falck, J.R.; Ho, Y.K.; Goldstein, J.L. The Scavenger Cell Pathway for Lipoprotein Degradation: Specificity of the Binding Site That Mediates the Uptake of Negatively-Charged LDL by Macrophages. *J. Supramol. Struct.* **1980**, *13*, 67–81. [CrossRef]
48. Hoppe, G.; O'Neil, J.; Hoff, H.F. Inactivation of Lysosomal Proteases by Oxidized Low Density Lipoprotein Is Partially Responsible for Its Poor Degradation by Mouse Peritoneal Macrophages. *J. Clin. Investig.* **1994**, *94*, 1506–1512. [CrossRef]
49. Chistiakov, D.A.; Bobryshev, Y.V.; Orekhov, A.N. Changes in Transcriptome of Macrophages in Atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* **2015**, *19*, 1163–1173. [CrossRef]
50. Cookson, F.B. The Origin of Foam Cells in Atherosclerosis. *Br. J. Exp. Pathol.* **1971**, *52*, 62–69.
51. Cao, H.; Jia, Q.; Yan, L.; Chen, C.; Xing, S.; Shen, D. Quercetin Suppresses the Progression of Atherosclerosis by Regulating MST1-Mediated Autophagy in Ox-LDL-Induced RAW264.7 Macrophage Foam Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6093. [CrossRef]
52. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.-C. NF-KB Signaling in Inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
53. Raggi, P.; Genest, J.; Giles, J.T.; Rayner, K.J.; Dwivedi, G.; Beanlands, R.S.; Gupta, M. Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Therapeutic Interventions. *Atherosclerosis* **2018**, *276*, 98–108. [CrossRef] [PubMed]
54. Carnevale, R.; Nocella, C.; Petrozza, V.; Cammisotto, V.; Pacini, L.; Sorrentino, V.; Martinelli, O.; Irace, L.; Sciarretta, S.; Frati, G.; et al. Localization of Lipopolysaccharide from Escherichia Coli into Human Atherosclerotic Plaque. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–8. [CrossRef]
55. Giovannini, C.; Masella, R. Role of Polyphenols in Cell Death Control. *Nutr. Neurosci.* **2012**, *15*, 134–149. [CrossRef] [PubMed]
56. Louis, X.L.; Thandapilly, S.J.; Kalt, W.; Vinqvist-Tymchuk, M.; Aloud, B.M.; Raj, P.; Yu, L.; Le, H.; Netticadan, T. Blueberry Polyphenols Prevent Cardiomyocyte Death by Preventing Calpain Activation and Oxidative Stress. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1785–1794. [CrossRef] [PubMed]
57. Yoo, K.M.; Lee, C.H.; Lee, H.; Moon, B.; Lee, C.Y. Relative Antioxidant and Cytoprotective Activities of Common Herbs. *Food Chem.* **2008**, *106*, 929–936. [CrossRef]
58. Cheng, D.; Zhang, X.; Tang, J.; Kong, Y.; Wang, X.; Wang, S. Chlorogenic Acid Protects against Aluminum Toxicity via MAPK/Akt Signaling Pathway in Murine RAW264.7 Macrophages. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *190*, 113–120. [CrossRef]

59. Varshney, R.; Gupta, S.; Roy, P. Cytoprotective Effect of Kaempferol against Palmitic Acid-Induced Pancreatic β-Cell Death through Modulation of Autophagy via AMPK/MTOR Signaling Pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2017**, *448*, 1–20. [CrossRef]
60. Tolosa, L.; Rodeiro, I.; Donato, M.T.; Herrera, J.A.; Delgado, R.; Castell, J.V.; Gómez-Lechón, M.J. Multiparametric Evaluation of the Cytoprotective Effect of the Mangifera Indica L. Stem Bark Extract and Mangiferin in HepG2 Cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65*, 1073–1082. [CrossRef]

Figure supplémentaire - Non présentée dans l'article

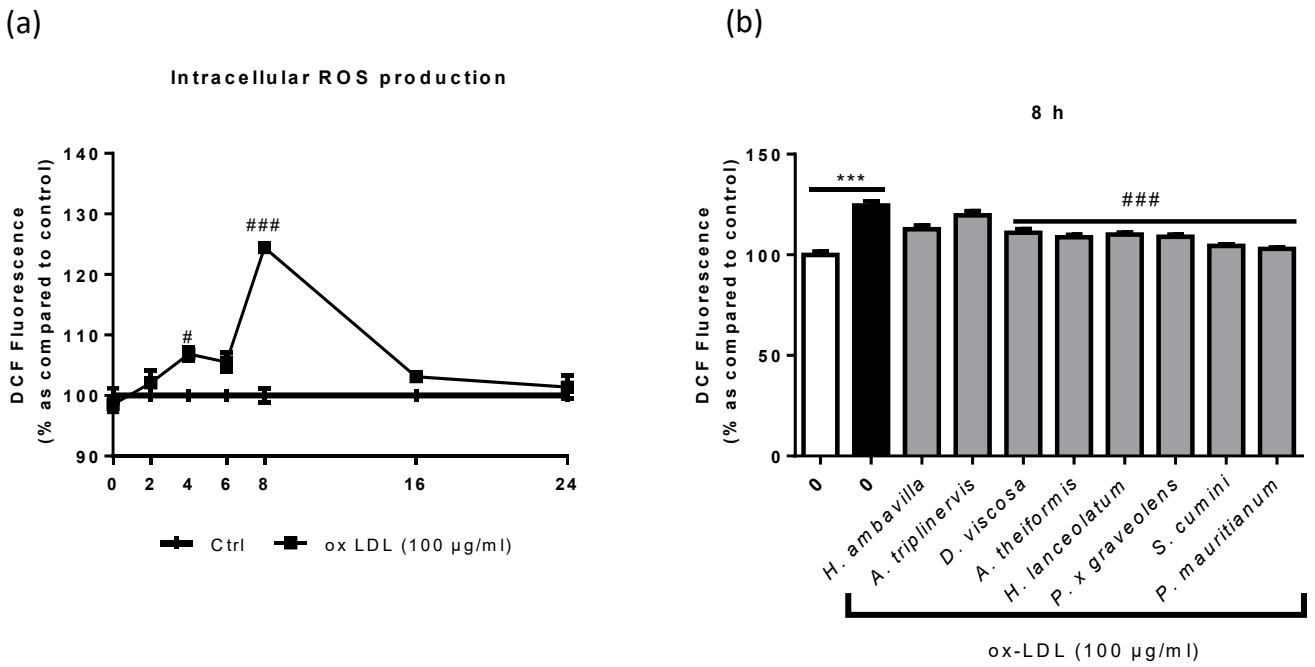


Figure supplémentaire : (a) Évolution de la production de radicaux libres intracellulaires (ROS) par des macrophages RAW 264.7 en présence de LDL oxydées (100 µg/ml). (b) Impact de la présence de décoctions de plantes médicinales sur la production de radicaux libres intracellulaires par des macrophages RAW 264.7 exposés à des LDL oxydées.

Discussion et perspectives

Les travaux ayant abouti à l'article 1 ont permis de mettre en évidence la présence de polyphénols dans les tisanes à base de plantes médicinales utilisées à La Réunion. Ces préparations de plantes ont des propriétés antioxydantes suggérant leur utilité dans le contexte de perturbations métaboliques. L'objectif de notre seconde étude est d'évaluer le potentiel des décoctions de plantes médicinales à prévenir ou réduire des phénomènes associés à l'athérosclérose : la cytotoxicité des LDL oxydées, la production de radicaux libres intracellulaires, la captation de LDL oxydées et l'activation de la voie pro-inflammatoire NF-κB. Dans le cadre de cette étude, la concentration en polyphénols n'a pas été standardisée afin de pouvoir comparer la bioactivité des décoctions pour une même concentration massique (1 g de plante / 1 L d'eau).

Premièrement, les expérimentations menées sur le modèle de macrophages murins RAW 264.7 ont mis en évidence l'effet protecteur des décoctions de plantes médicinales de La Réunion sur la mort cellulaire induite par des concentrations cytotoxiques de LDL oxydées. Au bout de 24 h en présence de 200 µg/ml de LDL oxydées, une diminution de l'ordre de 50 % du nombre de cellules viables est observée. En présence de décoctions de plantes médicinales (40 µg de broyat de plante /ml), l'effet cytotoxique des LDL oxydées est diminué. D'autres études ont montré des effets protecteurs dans les mêmes conditions en présence de quercétine et d'extraits de feuilles de mûrier (Cao et al., 2019; M.-Y. Yang et al., 2011).

De manière générale, la mortalité cellulaire engendrée par la présence de LDL oxydées répond à un ensemble de processus (surcharge métabolique associée à la captation des ox-LDL, stress du réticulum endoplasmique, autophagie, accumulation excessive de lipides, stress oxydant, activation de la voie NF-κB, pic calcique) (Bhansali et al., 2019; Nègre-Salvayre et al., 2006; Robbesyn et al., 2004).

Nos observations concernant la diminution de la mortalité cellulaire peuvent s'expliquer par :

- Une action antioxydante « directe » des décoctions de plantes médicinales limitant la peroxydation des LDL (oxydation dans le milieu de culture) ou leur conférant davantage de stabilité (par exemple par des réactions de transfert de proton). Ces effets limiteraient alors l'exposition des cellules à un stress oxydant délétère.

- Une inhibition de certains mécanismes associés à la captation excessive des LDL oxydées par les principes actifs de plantes (accumulation de lipides, production de radicaux libres intracellulaires, activation de la voie NF-κB)

Bien que notre première hypothèse soit confortée par des travaux comme ceux de Dos Santos et al., nous ne sommes pas parvenus à évaluer un potentiel effet protecteur des tisanes à base de plante médicinales sur l'oxydation des LDL (dos Santos et al., 2018).

Afin de comprendre comment les décoctions de plantes médicinales pourraient moduler la captation des LDL oxydées, nous avons choisi de nous placer à une concentration en LDL oxydées non cytotoxiques (100 µg/ml).

L'analyse de la production de ROS intracellulaires au cours du temps montre que cette dernière est significativement augmentée (+ 25 %) au bout de 8 h pour des macrophages ayant été incubés avec des LDL oxydées (100 µg/ml). Nos résultats montrent que la présence de décoctions de plantes médicinales réduit significativement cette production de radicaux libres intracellulaires. Ces résultats sont en accord avec les effets antioxydants précédemment observés sur un autre modèle cellulaire soumis à un stress oxydant mimé par l'ajout de peroxyde d'hydrogène. *Ces résultats ne sont pas présentés dans la version définitive de l'Article 2.*

Notre analyse de la captation de LDL oxydées marquées au DilC18 en présence de décoctions de plantes médicinales montre que les décoctions de *H. lanceolatum*, *P. x graveolens*, *S. cumini* et *P. mauritianum* diminuent significativement la captation de l'ordre de 31,9 à 67,2 %. Les résultats montrant la capacité de la décoction de *P. mauritianum* à moduler le métabolisme des LDL par un type cellulaire pourraient être en lien avec une utilisation traditionnelle dans le but de prévenir l'apparition de maladies cardiovasculaires. Traditionnellement, le mécanisme d'action de cette tisane serait expliqué par un potentiel effet hypolipémiant, cependant nos résultats suggèrent que la décoction de *P. mauritianum* pourrait également ralentir le processus d'athérosclérose notamment en inhibant la formation de cellules spumeuses (Lavergne, 2018).

D'autres études ont mis en évidence les effets inhibiteurs de polyphénols sur l'accumulation de lipides suite à une incubation avec des LDL oxydées. Par exemple, la curcumine retrouvée dans les racines de *Curcuma longa*, la chrysine pouvant être retrouvée dans la passiflore *Passiflora*

caerulea, le tanshindiol C extrait de la sauge de Chine *Salvia miltiorrhiza* ou encore la puerarine issue des racines de Kudzu *Pueraria lobata* (Quiles et al., 2002; S. Wang et al., 2015b; Y. Yang et al., 2018; Heng Zhang et al., 2015). La méthode principalement utilisée dans ces études, était la coloration à l'O Red Oil (permettant la coloration des lipides neutres). Cette méthode a été utilisée lors d'une première approche (données non présentées), cependant les limites de cette méthode sont d'une part, l'impossibilité de distinguer l'accumulation des triglycérides de celle du cholestérol estérifié et d'autre part la difficulté d'obtenir des informations quantitatives sur l'accumulation des lipides. L'utilisation d'une sonde fluorescente (DilC18) nous a permis en même temps de mettre en évidence l'internalisation des ox-LDL marquées et de quantifier par cytométrie l'accumulation intracellulaire des lipides.

Les résultats que nous avons obtenus sur la capacité des décoctions de plantes médicinales à réduire la captation de LDL oxydées constituent une information nouvelle. Ces observations nous soulignent l'intérêt que peut présenter l'utilisation des plantes médicinales dans le contexte d'athérosclérose. Des approches mécanistiques doivent par ailleurs être menées afin de comprendre quels sont les récepteurs impliqués (LDLR, récepteurs scavenger, CD36) et de comprendre comment leur expression peut être modulée par la présence des différentes décoctions.

L'effet des décoctions de plantes sur l'activation de la voie NF-κB a permis de mettre en évidence leur potentiel « anti-inflammatoire ». Dans nos conditions expérimentales nous avons sélectionné le LPS d'*E. coli* qui s'est révélé pertinent dans le contexte d'athérosclérose pour activer la voie NF-κB. Les observations apportées sur l'inhibition de la voie NF-κB par les décoctions d'*Ayapana triplinervis* et de *Dodonaea viscosa* sont en accord avec les données de la littérature. En effet, des études précédentes menées au sein du laboratoire ont montré que les extraits hydroacétoniques de ces deux plantes inhibaient la voie NF-κB dans des conditions d'hyperglycémie (mimant le diabète) sur un modèle murin de cellule endothéliale (bEnd3) (Taïlé et al., 2020).

La voie de signalisation NF-κB est à l'origine de nombreux phénomènes cellulaires comme la sécrétion de cytokines, la différenciation des macrophages, la production de molécules d'adhésion et la mort cellulaire (Taniguchi & Karin, 2018). Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que les plantes médicinales que nous avons étudiées pourraient exercer une bioactivité sur les points précédemment cités dans le contexte d'athérosclérose ou d'autres

pathologies impliquant l'activation de NF-κB. Nos résultats constituent une première avancée sur l'évaluation du potentiel antiathérogène des décoctions de plantes médicinales utilisées à La Réunion.

Cette seconde étude met en avant d'autres perspectives de recherche :

- Quelle est l'influence des tisanes sur les mécanismes associés à la survie cellulaire ?
- Quelle est l'influence des tisanes sur l'expression des récepteurs scavengers (captation) et des transporteurs du cholestérol (efflux) ?
- Quel est l'impact des décoctions de plantes médicinales sur l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines oxydées ?
- Quels mécanismes associés à l'activation de la voie NF-κB sont modulés par la présence des décoctions de plantes médicinales ?

Discussion générale et perspectives des travaux de thèse

L'athérosclérose est à l'origine d'une des causes majeures de la mortalité mondiale : les maladies cardiovasculaires. Certaines régions du monde sont davantage exposées aux maladies cardiovasculaires en raison de leur prévalence élevée en facteurs de risque (Yusuf et al., 2011). A l'île de La Réunion, un quart des décès est dû à un évènement cardiovasculaire et la population est fortement exposée aux facteurs de risque d'ordre métabolique (diabète, obésité, dyslipidémies) (Observatoire Régional de la Santé Océan Indien, 2017). Au-delà des stratégies médicamenteuses et/ou interventionnelles, il existe des approches nutritionnelles permettant de prévenir ou ralentir la progression de l'athérosclérose.

A La Réunion, l'utilisation de plantes médicinales pourrait avoir sa place parmi les stratégies d'ordre nutritionnel. En effet, la consommation de plantes médicinales remonte au peuplement de l'Ile, et leur préparation, principalement sous forme de tisanes, reste ancrée dans les traditions (Dutertre, 2011; Lavergne, 1989). Cette pratique n'est pas isolée ; il faut savoir que les plantes médicinales sont utilisées par 80 % de la population mondiale comme soins de santé primaire (Woo et al., 2012). Cependant, les propriétés décrites pour les plantes médicinales reposent majoritairement sur l'empirisme et il existe encore un manque de données scientifiques relatives à leur composition et à leur réelle bioactivité. Ces arguments constituent un frein à l'essor de la consommation de tisanes à des fins curatives. Des stratégies comme celle menée par l'OMS tendent à instaurer de nouvelles mesures afin d'encadrer la commercialisation et l'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques (Labbé, 2018; *OMS | Stratégie de l'OMS Pour La Médecine Traditionnelle Pour 2014-2023*, 2013). Actuellement, la filière des plantes médicinales semble avoir le vent en poupe et fait l'objet de nombreuses valorisations à l'échelle industrielle (sous forme de compléments alimentaires ou, d'extraits utilisés en cosmétique) (Gupta et al., 2012). A la Réunion, l'inscription des plantes médicinales à la Pharmacopée Française et la commercialisation de tisanes à destination du grand public sont des arguments confortant l'intérêt à porter aux plantes médicinales.

Ce contexte a été à l'origine d'un des premiers objectifs de ma thèse : déterminer (1) si les plantes médicinales utilisées à La Réunion contiennent des polyphénols ; (2) si ces composés sont présents dans les tisanes préparées de manière traditionnelle ; (3) si ces composés détectés peuvent être à l'origine de la bioactivité observée traditionnellement pour ces plantes médicinales

Des études majoritairement menées sur des extraits organiques ont mis en évidence la composition et la bioactivité de plantes utilisées en médecine traditionnelle à La Réunion : par exemple l'Ayapana (*Ayapana triplinervis*), le Bois d'Arnette (*Dodonaea viscosa*), le Fleur Jaune (*Hypericum lanceolatum*) et le Jamblon (*Syzygium cumini*) (Ayyanar et al., 2013; Haddad et al., 2019; Khan, 2013; Morel et al., 2017; Taïlé et al., 2020). Ces études, consistent à évaluer le potentiel des plantes médicinales dans un contexte non traditionnel et sont davantage adaptées à des valorisations sous forme de compléments alimentaires ou d'extraits purifiés à ajouter à des préparations cosmétiques ou pharmacologiques.

Notre méthodologie d'étude des plantes médicinales s'est démarquée en évaluant à la fois des extraits organiques et des extraits aqueux préparés de manière traditionnelle. Notre approche, se voulant plus concrète, a permis de découvrir le contenu en polyphénols des tisanes à base de plantes médicinales utilisées à La Réunion telles qu'elles sont consommées par la population.

Nous avons décrit pour la première fois, l'évolution des teneurs en polyphénols de huit plantes médicinales utilisées à La Réunion en fonction du mode de préparation qui leur est appliqué. L'analyse de la composition de nos extraits hydroacétoniques de plantes médicinales était en accord avec les données de la littérature. Par exemple :

- L'ayapanine et l'herniarine ont été détectés dans les extraits d'*Ayapana triplinervis* comme l'ont décrit les travaux menés par le Laboratoire LCSNSA (Gauvin-Bialecki & Marodon, 2008).
- Les tanins galliques et ellagiques ont aussi été détectés dans les extraits de Jamblon (*Syzygium cumini*) en accord avec les études de Tavares, *et al.,* (Tavares et al., 2016).
- La détection de la mangiférine et de ses dérivés dans les extraits de Change Ecorce (*Aphloia theiformis*) est en accord avec les travaux de Picot *et al.,* (Picot et al., 2017).
- Les extraits de Bois de Pêche Marron *P. mauritianum* présentent effectivement de l'acide asiatique, comme le décrit la littérature (Mahomoodally et al., 2014; Rangasamy et al.,

2014). Cependant, nous n'avons pas détecté d'acide corosolique. Cette différence de composition peut être due aux conditions environnementales et/ou expérimentales.

De manière générale, les polyphénols que nous avons identifiés dans nos différents extraits étaient décrits dans la littérature pour ces mêmes espèces. La **Figure 17** montre que pour certaines espèces, les polyphénols majoritaires détectés pouvaient différer d'une étude à l'autre. Cette différence peut s'expliquer par une variation des conditions environnementales (terroir, climat, présence de substrat, intempéries, compétitions inter-espèces), mais aussi par une influence des facteurs génétiques (mutations pour s'adapter à un nouvel environnement, changement phénotypique, convergence ou divergence évolutive).

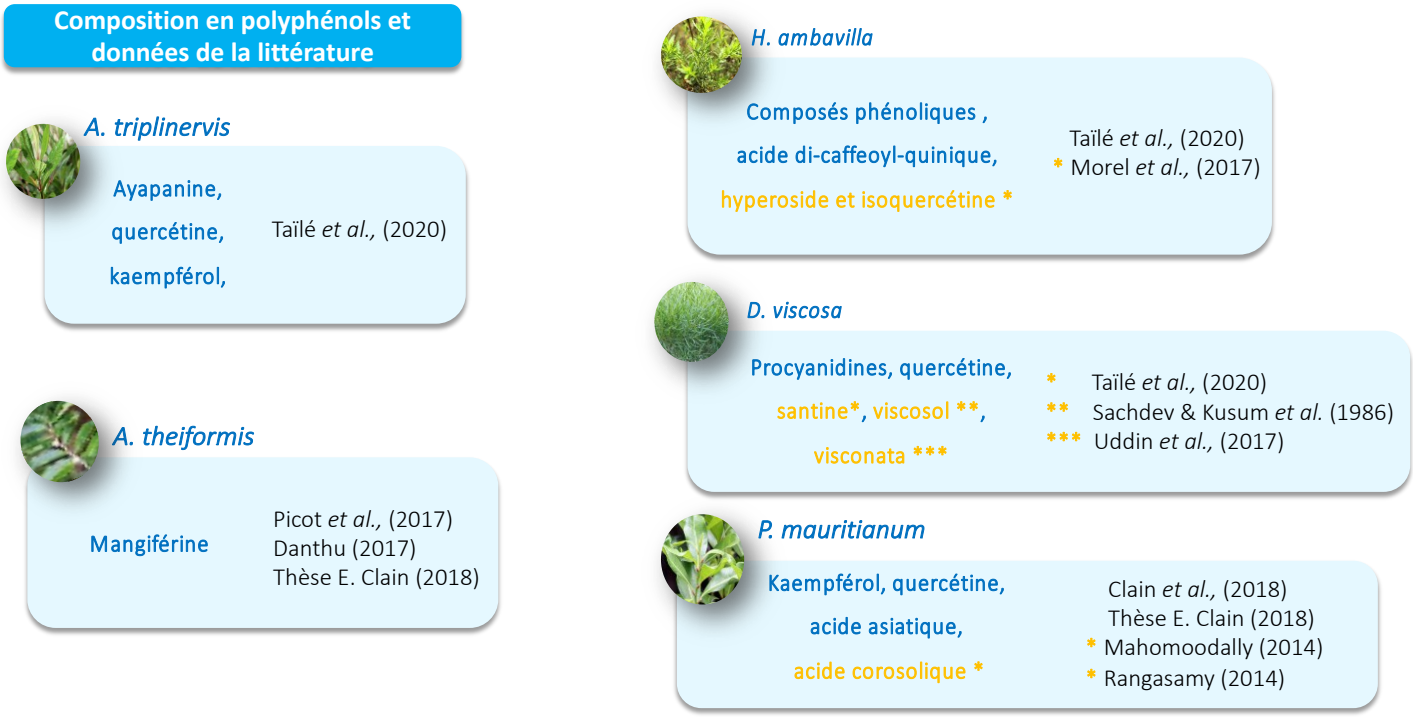


Figure 17 : Éléments de la littérature relatifs au contenu en polyphénols des espèces A. triplinervis, A theiformis, H. ambavilla, D. viscosa et P. mauritianum. Les composés détectés lors de l'analyse de nos échantillons par spectrométrie de masse et confirmés par la littérature sont présentés en bleu. Les composés décrits par la littérature et ne constituant pas des composés majoritaires dans nos conditions expérimentales ont été représentés en jaune.

Ainsi, une importance particulière doit être apportée aux conditions environnementales associées à la plante médicinale étudiée. Étant donné que le contenu en polyphénols varie en fonction des conditions environnementales, il est possible d'envisager qu'une plante médicinale puisse avoir des propriétés préventives ou curatives différentes selon son origine/terroir. Par

ailleurs, il aurait été intéressant d'étudier l'impact du terroir et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols et la bioactivité des huit plantes médicinales. Dans le cadre de notre projet CIFRE il aurait aussi été intéressant d'explorer l'évolution de la production de polyphénols en fonction de son âge et du nombre de récoltes effectuées. Nous pourrions émettre l'hypothèse qu'une récolte régulière des feuilles des différentes plantes médicinales constituerait un stress suffisant pour inciter la production de polyphénols par ces dernières.

Le fait d'avoir observé que la nature des polyphénols présents dans les préparations n'était pas modifiée par le procédé de transformation nous a permis de comparer la bioactivité de nos tisanes à celles d'extraits utilisés dans le cadre d'autres études. Par ailleurs, les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude de la capacité antioxydante des préparations de plantes médicinales étaient en accord avec les données de la littérature apportées par les travaux de Poullain *et al.,* (Poullain et al., 2004). Dans cette première approche nous avons comparé l'activité antioxydante des préparations de plantes médicinales en standardisant la concentration finale en polyphénols. Nous avons aussi observé une activité antioxydante à des concentrations physiologiques ≤ 25 µM GAE suggérant une bioactivité des composés suite à la consommation des tisanes.

Dans le cadre de notre premier article nous avons mis en avant le lien entre la composition en polyphénols de chaque plante médicinale et la bioactivité qui lui pouvait lui être attribuée. Nous avons ainsi confirmé les propriétés antioxydantes attribuées aux huit plantes médicinales que nous avons étudiées et avons mis en évidence pour la première l'activité antioxydante de tisanes utilisées à La Réunion.

Dans la seconde partie de notre étude nous avons voulu étudier l'impact de décoctions de plantes médicinales utilisées à La Réunion sur différents éléments concourant à l'athérosclérose.

Nous avons voulu savoir si des décoctions de plantes médicinales pouvaient (1) avoir un impact sur la viabilité de macrophages en présence de concentrations cytotoxiques de LDL oxydées ; (2) limiter le stress oxydant associé à la présence de LDL oxydées ; (3) avoir un impact sur la captation de LDL oxydées par les macrophages ; (4) moduler la voie de signalisation pro-inflammatoire NF-κB.

Afin de pouvoir comparer les différentes décoctions, la standardisation ne s'est pas faite par rapport à la concentration finale en polyphénols mais par rapport à l'extraction aqueuse (1 g/L d'eau) afin d'être en adéquation avec l'utilisation traditionnelle qui en est faite. La concentration de 40 µg de plante /mL a été choisie de façon à obtenir une quantité non cytotoxique de tisanes contenant au minimum 25 µM GAE (une concentration physiologique élevée permettant d'observer une éventuelle bioactivité).

Nous avons découvert que la présence de décoctions réduit la mortalité cellulaire engendrée par des concentrations trop élevées en LDL oxydées. Ces effets protecteurs peuvent être attribués à la présence de polyphénols dans les décoctions, comme le décrit la littérature (Cao et al., 2019). Nos travaux ont aussi montré que les décoctions de plantes médicinales réduit significativement la production de radicaux libres intracellulaires induite par la présence de LDL oxydées. Ces résultats sont en accord avec ce qui avait été observé lors de notre première étude (Checkouri et al., 2020). Nos résultats sur les effets inhibiteurs de *H. lanceolatum*, *P. x graveolens, S. cumini* et *P. mauritianum* sur la captation de LDL oxydées constituent des données encourageantes qui argumentent l'intérêt d'utiliser les plantes médicinales dans le contexte de l'athérosclérose. En effet, la capacité des plantes médicinales à prévenir ou limiter la formation de cellules spumeuses pourrait représenter une perspective intéressante pour prévenir / ralentir la progression de l'athérosclérose.

De plus, nous avons mis en évidence la capacité des décoctions de plantes à limiter l'activation de la voie NF-κB en présence de LPS d'*E. coli*. Ce résultat laisse présager une bioactivité des décoctions sur d'autres paramètres tels que : la sécrétion des cytokines (TNF-α ; IL-6 ; MCP-1), la production des enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydant, la différenciation des macrophages et la mortalité cellulaire.

Les travaux que nous avons apportés ne sont qu'une première étape dans l'exploration des propriétés des plantes médicinales. Des études plus poussées comme les expérimentations animales et études cliniques pourraient être envisagées dans un second temps.

Les modèles d'expérimentation animale adaptés au contexte athérosclérose

Il existe différents modèles murins reproduisant les conditions d'athérosclérose (dyslipidémies). Parmi elles, les souris apoE -/- et LDLR -/- offrent la possibilité de mimer une dyslipidémie (Emini Veseli et al., 2017). Dans nos conditions expérimentales, le modèle apoE-/- a été choisi car les souris apoE-/- présentent deux types de dyslipidémies : l'hypertriglycéridémie et l'hypercholestérolémie. Nous avons pu réaliser une étude pilote au sein du Laboratoire sur des souris de réforme (destinées à l'euthanasie) apo E-/- (n= 13) âgées de 9 à 24 mois afin d'étudier la bioactivité et la biodistribution des polyphénols du Bois de Pêche Marron, *P. mauritianum,* connue et utilisée en médecine traditionnelle pour des vertus hypocholestérolémiantes.

Nous souhaitions déterminer si ces molécules pouvaient atteindre les plaques d'athérome et éventuellement si la consommation de tisane à base de plante médicinale pouvait moduler le profil lipidique des souris apo E-/-soumises à un régime normal (non supplémenté). Pour cela deux décoctions de Bois de Pêche marron provenant de deux terroirs différents ont été administrées oralement à deux groupes de souris (G1 et G2) à une fréquence de 2 à 3 fois par semaine afin de reproduire un mode de consommation régulier de tisane sur une durée de 2 semaines. La concentration en plante médicinale pour l'élaboration de la décoction a été sélectionnée sur la base d'études ethnopharmacologiques (Dutertre, 2011; Lavergne, 1989, 2018). Le protocole expérimental qui a été utilisé est présenté en **Figure 18**.

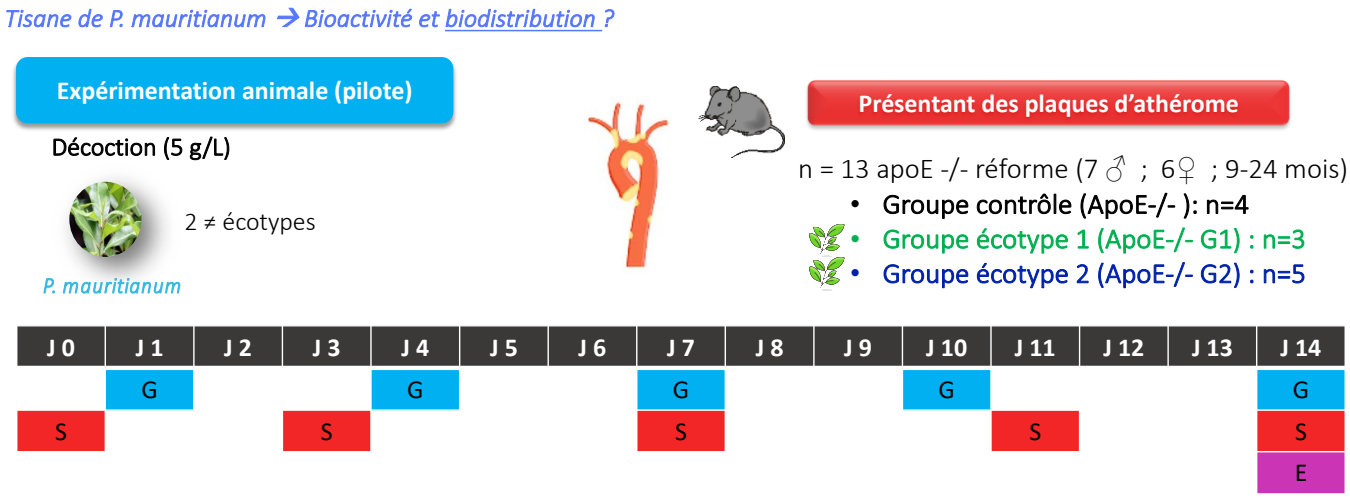


Figure 18 : Protocole utilisé pour l'expérimentation pilote. 13 souris ApoE-/- ont été utilisées pour l'expérimentation et ont été réparties en trois groupes : un groupe contrôle n'ayant pas consommé de tisane, un groupe G1 ayant consommé de la tisane de Bois de Pêche Marron (P. mauritianum) provenant du premier écotype et un groupe G2 ayant consommé une tisane provenant du second écotype. Le schéma présente le déroulement de l'expérimentation sur les 14 jours. Les gavages (G) ont été réalisés tous les deux à trois jours

et sont représentés en bleu tandis que les prélèvements sanguins (S) ont été représentés en rouge. L'euthanasie (E) par ponction cardiaque a été réalisée au bout des 14 jours et a été représentée en mauve.

Résultats préliminaires de notre étude de la bioactivité sur notre modèle in vivo

Dans notre étude, l'évaluation de la bioactivité de la tisane de *P.* mauritianum s'est limitée à la quantification des lipides circulants au début de l'expérimentation et à l'issue de cette dernière (après 5 gavages). Les résultats que nous avons obtenus (présentés en **Figure 19**) ne montrent pas de modulation particulière du profil lipidique des souris apoE-/- ayant consommé de façon régulière de la tisane régulière de tisane de Bois de Pêche Marron.

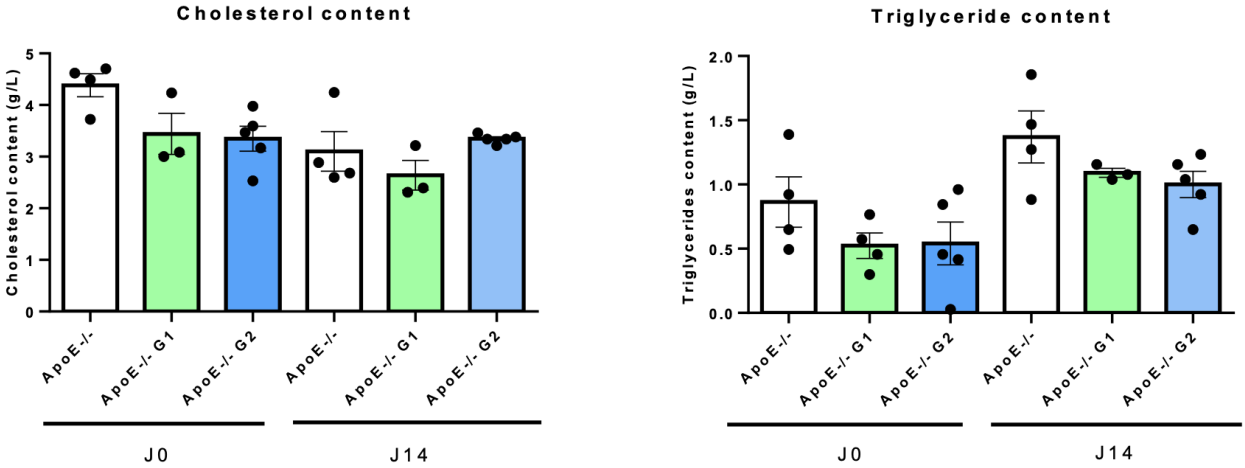


Figure 19 : Evaluation des teneurs en cholestérol et triglycérides plasmatiques

Nos conditions expérimentales présentent cependant des limites. L'influence de la consommation de tisane sur les paramètres lipidiques n'a pas pu être réalisée dans des conditions optimales. En effet, les souris ayant fait l'objet de cette étude étaient beaucoup trop âgées et présentaient déjà un stade avancé d'athérosclérose. De manière générale, les études menées sur les souris dyslipidémiques se font à l'âge de huit semaines car les souris apoE -/- peuvent avoir la particularité de former des plaques d'athérome sans nécessité de consommer un régime riche en graisses. D'autre part, le nombre de souris (n =12) n'était pas suffisant pour pouvoir observer une différence significative entre les teneurs en lipides circulants.

Ces arguments font qu'à l'issue de l'étude de la bioactivité sur notre modèle pilote, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer que la consommation de tisane n'a pas d'influence sur un modèle présentant une pathologie avancée. L'étude de la bioactivité des tisanes devra se faire sur des modèles plus « stables » (nombre de souris, jeunes, du même âge, du même sexe, ne présentant pas de plaques d'athérome en début d'expérimentation).

Au Laboratoire DéTROI, deux modèles d'étude de la bioactivité des tisanes en *in vivo* sont actuellement en phase de mise au point :

- Un modèle mimant un processus d'athérosclérose progressif (souris apoE-/- soumises à un régime riche en cholestérol associé ou non à une consommation régulière de tisane).
- Un modèle mimant un processus accéléré d'athérosclérose (souris LDLR-/- soumises à un régime riche en graisses et en cholestérol et ayant subi une intervention d'abrasion de la carotide).

Résultats préliminaires de notre étude de la biodisponibilité sur notre modèle in vivo

Nous avons voulu évaluer la biodisponibilité des composés issus de la tisane de Bois de Pêche Marron en recherchant des métabolites de la quercétine dans des organes cibles et dans le plasma.

En raison de la crise COVID-19, l'analyse des échantillons biologiques par spectrométrie de masse a été compromise et seuls le plasma et les broyats de foie des souris ont pu être analysés.

Une analyse métabolomique ciblée a été réalisée. Notre approche a été la suivante ; à partir de la composition en polyphénols de la tisane de *P. mauritianum* décrite dans notre Article 1, nous avons recherché les potentiels métabolites issus de ces polyphénols.

Les résultats que nous avons obtenus sont présentés en **Figure 20**. Dans nos conditions expérimentales nous avions observé que la tisane de *P. mauritianum* contenait majoritairement des flavonoïdes (kaempférol et quercétine) sous forme glycosylée. L'analyse du plasma des souris ayant consommé de la tisane a montré dans un premier temps que ces polyphénols (kaempférol et quercétine) étaient retrouvés sous forme aglycone.

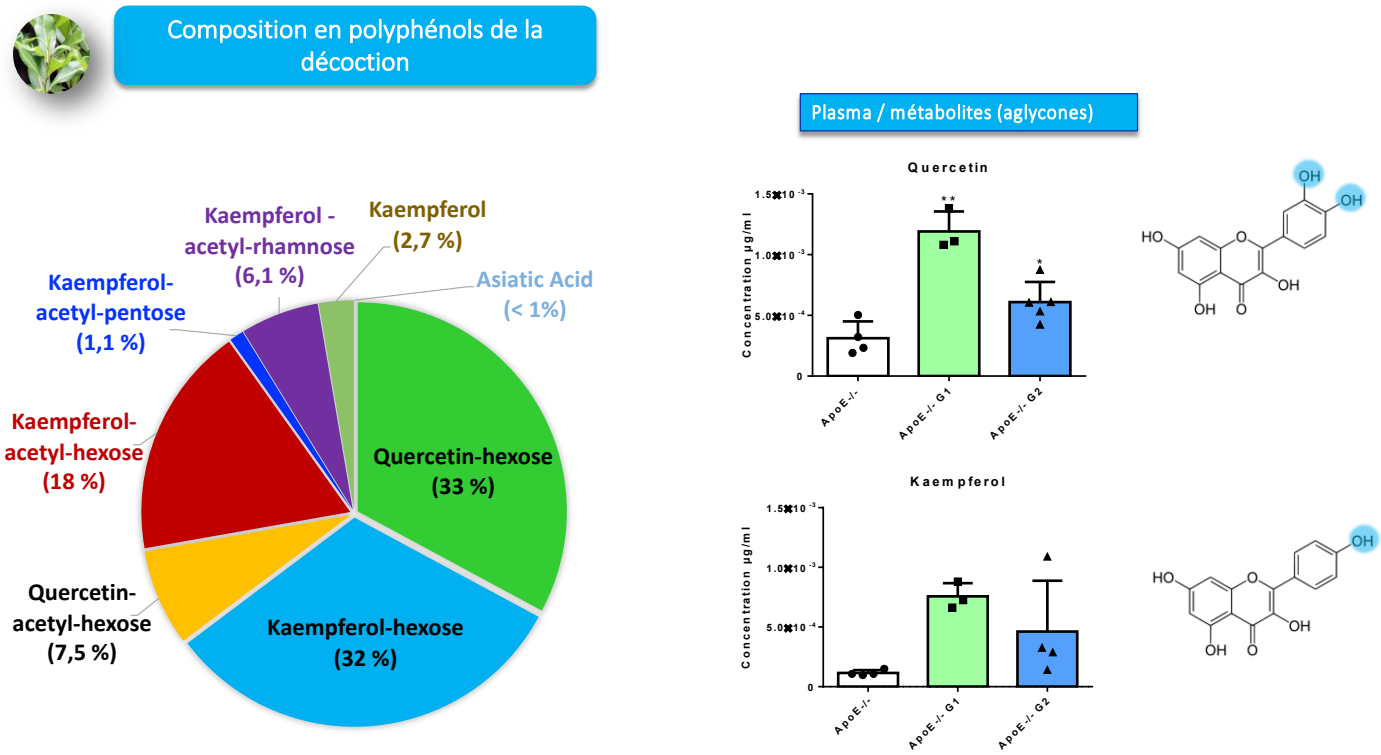


Figure 20 : Les polyphénols majoritaires de la tisane de P. mauritianum et les métabolites détectés et quantifiés dans le plasma de souris ayant consommé la décoction de P. mauritianum.

Une analyse des métabolites secondaires présents dans le plasma des souris ayant consommé de la tisane a montré la présence de formes glycosylées de la quercétine (hexosides de quercétine, myricétine, isorhamnétine, isorhamnétine -3-O-glucuronide) et desformes glycosylées du kaempférol (kaempférol -3-O-hexoside, kaemférol-3-O-pentoside, kaempférol -3-O-glucuronide, kaempférol-3-O-acétyl glucoside). Ces résultats sont présentés en **Figure 21**.

L'analyse des métabolites secondaires a mis en évidence deux origines possibles :

- Une faible transformation des métabolites primaires de polyphénols par les enzymes intestinales et leur absorption rapide par les cellules de **l'intestin grêle**.
- Une absorption plus tardive et des transformations plus importantes par les **enzymes du microbiote intestinal** et/ou par les **enzymes hépatiques**.

Dans nos conditions expérimentales, certains métabolites secondaires n'ont été retrouvés que dans les groupes de souris ayant consommé de la tisane et constituent des marqueurs de consommation de la décoction de *P. mauritianum*. De manière générale, la nature des métabolites n'a pas été influencée par le type de tisane (écotype). Concernant les teneurs en métabolites, une faible différence significative a été observée pour les concentrations d'isorhamnétine pour le groupe G1.

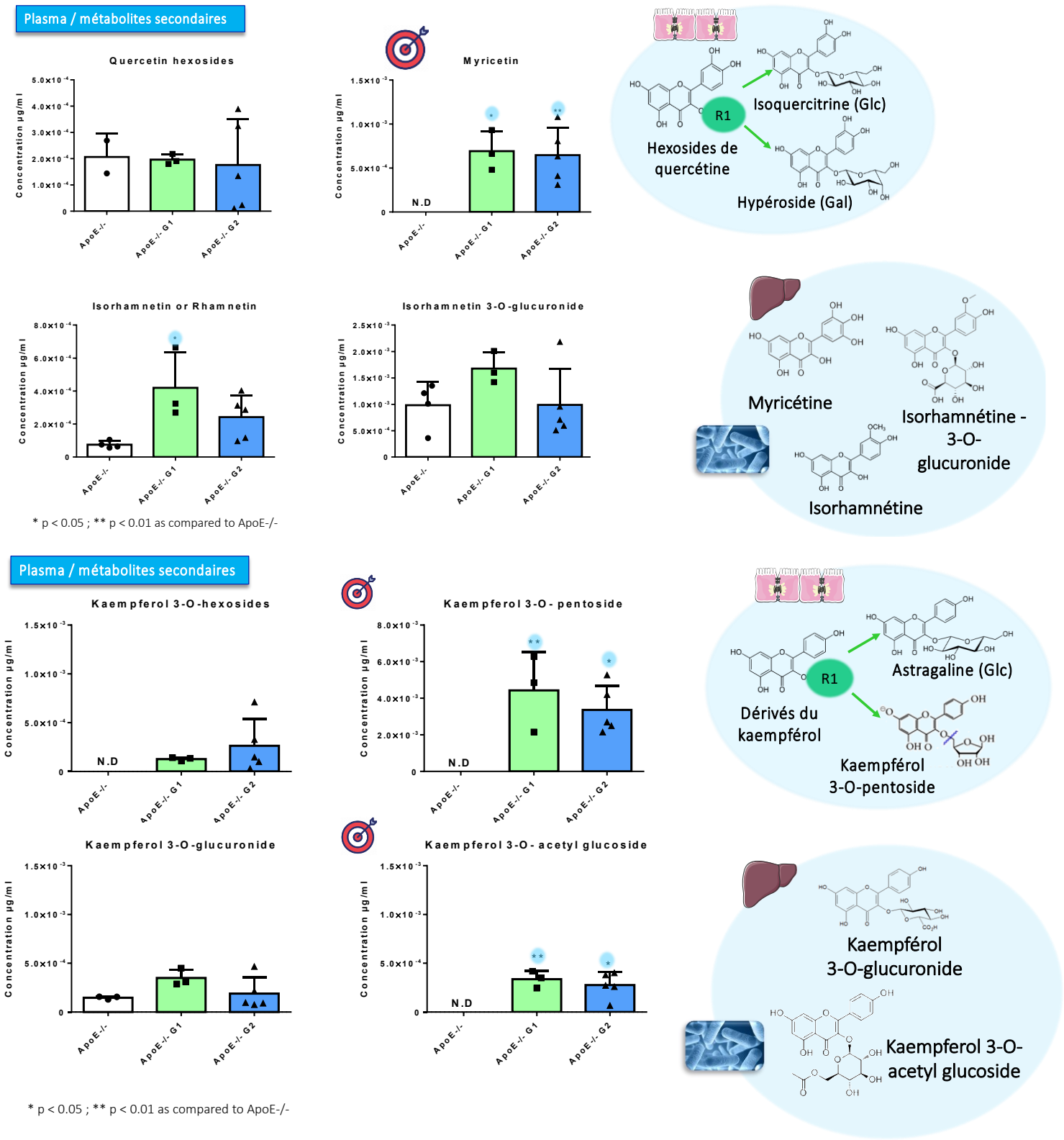


Figure 21 : Métabolites secondaires de quercétine et kaempférol détectés et quantifiés dans le plasma de souris ayant consommé de la tisane de P. mauritianum. Parmi les métabolites détectés certains d'entre eux comme l'isoquercitrine l'hypéroside, l'astragaline et le kaempférol-3-O-pentoside pourraient être issus de la faible transformation des hexoses de quercétine par les enzymes intestinales et de leur absorption rapide au niveau de l'intestin grêle. D'autres métabolites comme la myricétine et les formes d'isorhamnétine, kaempférol-3-O-glucuronide et kaempférol-3-O-acétyl glucoside, pourraient être issues de transformations plus tardives par le microbiote intestinal ou par les enzymes hépatiques. Dans nos conditions expérimentales, les éléments marqués par un symbole de cible rouge peuvent être considérés comme des marqueurs de consommation de tisane de P. mauritianum.

Les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude de biodisponibilité feront l'objet d'une valorisation sous forme de publication (short communication). Dans le cadre de ce travail de thèse, ces résultats préliminaires nous confortent dans l'intérêt d'explorer des paramètres comme la bioaccumulation des principes actifs dans les tissus (compartiments cellulaires) et dans les plaques d'athérome.

Vers des études cliniques chez l'Homme

Des études chez l'Homme pourraient être menées dans un premier temps chez des sujets sains pour identifier et quantifier des biomarqueurs de consommation de tisane (polyphénols et leurs métabolites). Dans un second temps, une étude clinique pourrait être envisagée afin d'étudier l'impact de la consommation de tisane sur l'évolution du profil lipidique de patients présentant une dyslipidémie. Cependant, l'étude de la bioactivité des tisanes chez des patients doit être confortée par des résultats probants obtenus préalablement sur des modèles animaux (bioactivité observée à l'échelle tissulaire et expliquée de façon mécanistique)

La valorisation des travaux de recherche dans le contexte de la thèse CIFRE

Au niveau industriel mes travaux ont apporté à l'Entreprise la possibilité d'effectuer des demandes pour des allégations nutritionnelles. Mes études ont été confortées par les perspectives de l'Entreprise visant à développer une filière pharmaceutique. Cette démarche est envisagée dans le but de valoriser les principes actifs de plantes médicinales par exemple sous la forme de compléments alimentaires. Certaines molécules pourront être extraites et valorisées dans le cadre pharmaceutique comme ça a pu être le cas pour l'ayapanine, l'acide corosolique ou encore l'acide asiatique qui ont fait l'objet de dépôts de brevets par d'autres Laboratoires (**Figure 22**).

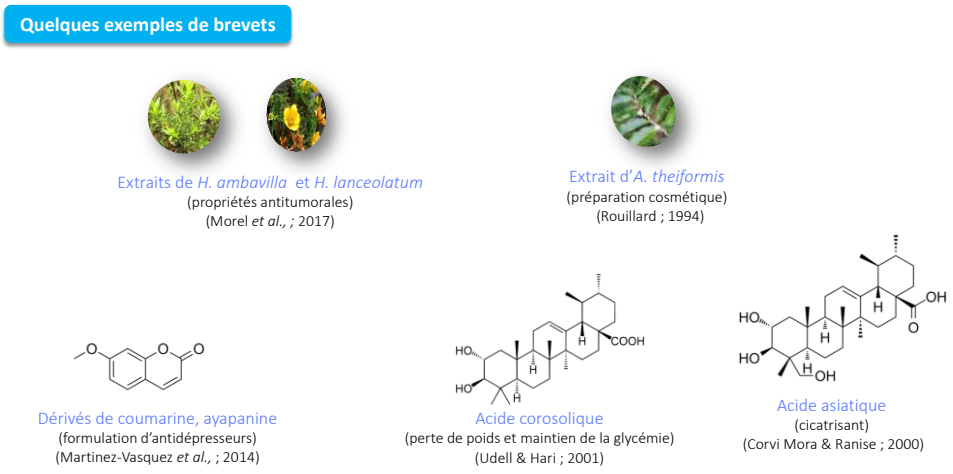


Figure 22 : Molécules issues de plantes médicinales ayant fait l'objet de valorisations sous forme de brevets.

Conclusion

Les travaux menés dans le cadre de mes travaux de thèse ont mis en avant le potentiel de huit plantes médicinales utilisées à La Réunion : Hubertia ambavilla, Ayapana triplinervis, Dodonaea viscosa, Aphloia theiformis, Hypericum lanceolatum, Pelargonium x graveolens, Syzygium cumini et Psiloxylon mauritianum. Mes résultats ont montré d'une part que huit plantes médicinales traditionnellement utilisées à La Réunion contiennent des polyphénols connus pour leur bioactivité et d'autre part que les tisanes et extraits hydro-acétoniques de ces plantes exercent une activité antioxydante. Nous nous sommes ensuite intéressés à un modèle cellulaire à la fois impliqué dans la progression et la résolution de l'athérosclérose : les macrophages. Mes expérimentations ont montré que les tisanes permettaient de protéger des macrophages murins soumis à une concentration cytotoxique en LDL oxydées. Mes travaux ont souligné les effets protecteurs des décoctions de plantes médicinales sur ce modèle cellulaire soumis à des facteurs aggravants de l'athérosclérose (LDL oxydées et lipopolysaccharide d'E. coli). Dans mes conditions expérimentales, la présence de décoctions de plantes médicinales a modulé la réponse au stress oxydant et la captation de LDL oxydées par des macrophages murins. De plus, mes résultats ont montré qu'en présence des différentes décoctions, la voie de signalisation cellulaire NF-κB régissant de nombreux mécanismes de défense et de survie cellulaire est modulée. Ces résultats suggèrent qu'au-delà de leurs propriétés antioxydantes, les principes actifs de plantes médicinales utilisées à La Réunion interviennent sur des mécanismes complexes de signalisation cellulaire.

Ces découvertes mettent en avant l'intérêt de l'utilisation traditionnelle et de la valorisation de ces huit plantes médicinales dans le cadre d'une stratégie de prévention ou de traitement de l'athérosclérose.

Mes travaux de thèse en une image – (Diapositive finale de ma soutenance de thèse)

Etude de la bioactivité des plantes médicinales utilisées à La Réunion dans le contexte de perturbations métaboliques

Composition

Richesse en polyphénols (extraits et tisanes)

1. *S. cumini*
2. *H. lanceolatum*
3. *P. mauritianum*

Bioactivité

Activité réductrice (DPPH)

1. *S. cumini*
2. *P. mauritianum*
3. *P. x graveolens*

Protection contre l'hémolyse

1. *D. viscosa*
2. *P. x graveolens*
3. *S. cumini*

Réduction des ROS intracellulaires

1. *A. theiformis*
2. *H. ambavilla*
3. *S. cumini*

Prévention de la mort cellulaire

1. *A. theiformis*
2. *H. lanceolatum*
3. *P. x graveolens*

Réduction de la captation des LDL-ox

1. *P. mauritianum*
2. *S. cumini*
3. *P. x graveolens*

Inhibition de la voie NF-κB

1. *P. x graveolens*
2. *H. lanceolatum*
3. *P. mauritianum*

Biodistribution

Détection de métabolites

- Détection de métabolites primaires et secondaires dans le plasma après consommation de tisane

Vers des études cliniques ?

Bioactivité ?

- Effets sur le profil lipidique ? Sur les plaques d'athéromes ?

Biodisponibilité

- Identification des métabolites spécifiques issus de la consommation de tisane par des sujets sains.

Figure 23 : Mes travaux de thèse en une image

Références

Aharoni, S., Lati, Y., Aviram, M., & Fuhrman, B. (2015). Pomegranate juice polyphenols induce a phenotypic switch in macrophage polarization favoring a M2 anti-inflammatory state. *BioFactors*, *41*(1), 44–51. https://doi.org/10.1002/biof.1199

Aiello, R. J., Brees, D., Bourassa, P.-A., Royer, L., Lindsey, S., Coskran, T., Haghpassand, M., & Francone, O. L. (2002). Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *22*(4), 630–637. https://doi.org/10.1161/01.atv.0000014804.35824.da

Ait-Oufella, H., Taleb, S., Mallat, Z., & Tedgui, A. (2011). Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207415

Alamgir, A. N. M. (2018). *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts: Volume 2: Phytochemistry and Bioactive Compounds*. Springer.

Aman, S., Moin, S., Owais, M., & Siddiqui, M. U. (2013). *Antioxidant activity of thymol: Protective role in AAPH-induced hemolysis in diabetic erythrocytes*. 6.

Andriantsitohaina, R., Auger, C., Chataigneau, T., Étienne-Selloum, N., Li, H., Martínez, M. C., Schini-Kerth, V. B., & Laher, I. (2012). Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *The British Journal of Nutrition*, *108*(9), 1532–1549. https://doi.org/10.1017/S0007114512003406

***ANSM**: Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé*. (2017). https://ansm.sante.fr/searchengine/general_search/(sort)/meta_published_dt?SearchText=plantes+pharmacop%C3%A9e

Aon, M., Stanley, B., Sivakumaran, V., Kembro, J., O'Rourke, B., Paolocci, N., & Cortassa, S. (2012). Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H2O2 emission: An experimental-computational study. *The Journal of General Physiology*, *139*, 479–491. https://doi.org/10.1085/jgp.201210772

APLAMEDOM. (2013). *Zerbaz Péi—Pratique et utilisation des tisanes à l'île de la Réunion*. Azalées éditions.

***Aplamedom Réunion**—Plantes aromatiques et Médicinales*. (n.d.). Aplamedom Réunion. Retrieved November 9, 2020, from https://aplamedom.org/

***Article L5112-1**—Code de la santé publique—Légifrance*. (2016). https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000032906637/

Asgary, S., Naderi, G., & Askari, N. (2005). *Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals*. *10*(2), 3.

Asgary, S., Naderi, G., Dashti, G., & Paknahad, Z. (2004). Effect of Amirkabiria odorastissima mozaffarian on the development and progression of fatty streaks in hypercholesterolemic rabbits. *Phytotherapy Research*, *18*(5), 370–372. https://doi.org/10.1002/ptr.1423

Ayyanar, M., Subash-Babu, P., & Ignacimuthu, S. (2013). Syzygium cumini (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: Folk medicinal and pharmacological evidences. *Complementary Therapies in Medicine*, *21*(3), 232–243. https://doi.org/10.1016/j.ctim.2013.03.004

Azul, L., Leandro, A., Boroumand, P., Klip, A., Seiça, R., & Sena, C. M. (2020). Increased inflammation, oxidative stress and a reduction in antioxidant defense enzymes in perivascular adipose tissue contribute to vascular dysfunction in type 2 diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, *146*, 264–274. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.002

Baba, S., Osakabe, N., Kato, Y., Natsume, M., Yasuda, A., Kido, T., Fukuda, K., Muto, Y., & Kondo, K. (2007). Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *85*(3), 709–717. https://doi.org/10.1093/ajcn/85.3.709

Bahceci, M., Gokalp, D., Bahceci, S., Tuzcu, A., Atmaca, S., & Arikan, S. (2007). The correlation

between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? *Journal of Endocrinological Investigation*, *30*(3), 210–214. https://doi.org/10.1007/bf03347427

Baigent, C., Koskinas, K. C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M. J., Backer, G. G. D., Delgado, V., Ference, B. A., Graham, I. M., Halliday, A., Mihaylova, B., Riccardi, G., Richter, D. J., & Sabatine, M. S. (2019). *2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk*. 78.

Bandyopadhyay, U., Das, D., & Banerjee, R. K. (1999). Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *CURRENT SCIENCE*, *77*(5), 9.

Barbehenn, R. V., & Peter Constabel, C. (2011). Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*, *72*(13), 1551–1565. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.040

Baron-Menguy, C., Bocquet, A., Guihot, A.-L., Chappard, D., Amiot, M.-J., Andriantsitohaina, R., Loufrani, L., & Henrion, D. (2007). Effects of red wine polyphenols on postischemic neovascularization model in rats: Low doses are proangiogenic, high doses anti-angiogenic. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *21*(13), 3511–3521. https://doi.org/10.1096/fj.06-7782com

Barrett, T. J. (2020). Macrophages in Atherosclerosis Regression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *40*(1), 20–33. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312802

Belguendouz, L., Frémont, L., & Gozzelino, M.-T. (1998). Interaction of Transresveratrol with Plasma Lipoproteins. *Biochemical Pharmacology*, *55*(6), 811–816. https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00544-3

Ben, J., Zhu, X., Zhang, H., & Chen, Q. (2015). Class A1 scavenger receptors in cardiovascular diseases. *British Journal of Pharmacology*, *172*(23), 5523–5530. https://doi.org/10.1111/bph.13105

Bennett, M. R., Sinha, S., & Owens, G. K. (2016). *Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis*. 12.

Berrougui, H., Isabelle, M., Cherki, M., & Khalil, A. (2006). Marrubium vulgare extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage. *Life Sciences*, *80*(2), 105–112. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.08.040

Beutler, B., & Rietschel, E. T. (2003). Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology*, *3*(2), 169–176. https://doi.org/10.1038/nri1004

Bhansali, S., Khatri, S., & Dhawan, V. (2019). Terminalia Arjuna bark extract impedes foam cell formation and promotes apoptosis in ox-LDL-stimulated macrophages by enhancing UPR-CHOP pathway. *Lipids in Health and Disease*, *18*(1), 195. https://doi.org/10.1186/s12944-019-1119-z

Bielinski, S. J., Berardi, C., Decker, P. A., Kirsch, P. S., Larson, N. B., Pankow, J. S., Sale, M., de Andrade, M., Sicotte, H., Tang, W., Hanson, N. Q., Wassel, C. L., Polak, J. F., & Tsai, M. Y. (2015). P-selectin and subclinical and clinical atherosclerosis: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*, *240*(1), 3–9. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.036

Biswas, A., Bhattacharya, S., Mahapatra, S. D., Debnath, M., & Biswas, M. (2012). *The Antioxidant Effects of Eupatorium triplinerve, Hygrophila triflora and Pterocarpus marsupium-A Comparative Study*. 4.

Björkerud, S., & Björkerud, B. (1996). Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *The American Journal of Pathology*, *149*(2), 367–380. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1865303/

Bobryshev, Y. V. (2006). Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*, *37*(3), 208–222. https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.10.007

Boissière, M. (2019). *Consommation des plantes médicinales par les patients suivis en cabinet de médecine générale à La Réunion: Expériences, représentations et ressentis des patients dans le cadre de la communication médecin-patient*.

Bondjers, G., & Camejo', G. (1990). Interaction of LDL with human arterial proteoglycans stimulates its uptake by human monocyte-derived macrophages. *Journal of Lipid Research*, *31*, 12.

Bonomini, F., Tengattini, S., Fabiano, A., Bianchi, R., & Rezzani, R. (2008). *Atherosclerosis and oxidative stress*. 10.

Boström, K., Watson, K. E., Stanford, W. P., & Demer, L. L. (1995). Atherosclerotic calcification: Relation to developmental osteogenesis. *The American Journal of Cardiology*, *75*(6), 88B-91B.

https://doi.org/10.1016/0002-9149(95)80020-s
Boukhris, M., Bouaziz, M., Feki, I., Jemai, H., El Feki, A., & Sayadi, S. (2012). Hypoglycemic and antioxidant effects of leaf essential oil of Pelargonium graveolens L'Hér. In alloxan induced diabetic rats. *Lipids in Health and Disease*, *11*(1), 81. https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-81
Bowey, E., Adlercreutz, H., & Rowland, I. (2003). Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: A study in germ-free and human flora associated rats. *Food and Chemical Toxicology*, *41*(5), 631–636. https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00324-1
Brånén, L., Hovgaard, L., Nitulescu, M., Bengtsson, E., Nilsson, J., & Jovinge, S. (2004). Inhibition of Tumor Necrosis Factor-α Reduces Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*(11), 2137–2142. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000143933.20616.1b
Brasset, M., Levet, L., & Stein, F. (2015). *Les comportements alimentaires des Réunionnais. Un excès d'huile et de riz, un déficit de fruits et légumes.* (INSEE Analyses No. 12; p. 4). INSEE.
Bravo, E., Amrani, S., Aziz, M., Harnafi, H., & Napolitano, M. (2008). Ocimum basilicum ethanolic extract decreases cholesterol synthesis and lipid accumulation in human macrophages. *Fitoterapia*, *79*(7), 515–523. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.05.002
Bravo, L. (2009). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, *56*(11), 317–333. https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x
Brown, M., & Goldstein, J. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, *232*(4746), 34–47. https://doi.org/10.1126/science.3513311
Brown, M S, & Goldstein, J. L. (1983). Lipoprotein Metabolism in the Macrophage: Implications for Cholesterol Deposition in Atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry*, *52*(1), 223–261. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.001255
Brown, Michael S., Basu, S. K., Falck, J. R., Ho, Y. K., & Goldstein, J. L. (1980). The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: Specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *Journal of Supramolecular Structure*, *13*(1), 67–81. https://doi.org/10.1002/jss.400130107
Burkon, A., & Somoza, V. (2008). Quantification of free and protein-bound trans-resveratrol metabolites and identification of trans-resveratrol-C/O-conjugated diglucuronides—Two novel resveratrol metabolites in human plasma. *Molecular Nutrition & Food Research*, *52*(5), 549–557. https://doi.org/10.1002/mnfr.200700290
Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *25*(3), 287–299. https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016
Buttari, B., Profumo, E., & Riganò, R. (2015). Crosstalk between Red Blood Cells and the Immune System and Its Impact on Atherosclerosis. *BioMed Research International*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/616834
Calabriso, N., Massaro, M., Scoditti, E., Pellegrino, M., Ingrosso, I., Giovinazzo, G., & Carluccio, M. A. (2016). Red Grape Skin Polyphenols Blunt Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Activity and Expression in Cell Models of Vascular Inflammation: Protective Role in Degenerative and Inflammatory Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *21*(9). https://doi.org/10.3390/molecules21091147
Calabriso, N., Scoditti, E., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Ingrosso, I., Giovinazzo, G., & Carluccio, M. A. (2016). Multiple anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties of red wine polyphenolic extracts: Differential role of hydroxycinnamic acids, flavonols and stilbenes on endothelial inflammatory gene expression. *European Journal of Nutrition*, *55*(2), 477–489. https://doi.org/10.1007/s00394-015-0865-6
Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., & Burcelin, R. (2008). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*, *57*(6), 1470–1481. https://doi.org/10.2337/db07-1403
Cani, Patrice D., & de Vos, W. M. (2017). Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of Akkermansia muciniphila. *Frontiers in Microbiology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01765
Cao, H., Jia, Q., Yan, L., Chen, C., Xing, S., & Shen, D. (2019). Quercetin Suppresses the Progression of Atherosclerosis by Regulating MST1-Mediated Autophagy in ox-LDL-Induced

RAW264.7 Macrophage Foam Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23). https://doi.org/10.3390/ijms20236093
Cappellari, R., D'Anna, M., Bonora, B. M., Rigato, M., Cignarella, A., Avogaro, A., & Fadini, G. P. (2017). Shift of monocyte subsets along their continuum predicts cardiovascular outcomes. *Atherosclerosis*, *266*, 95–102. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.09.032
Carnevale, R., Loffredo, L., Nocella, C., Bartimoccia, S., Bucci, T., De Falco, E., Peruzzi, M., Chimenti, I., Biondi-Zoccai, G., Pignatelli, P., Violi, F., & Frati, G. (2014). Epicatechin and catechin modulate endothelial activation induced by platelets of patients with peripheral artery disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2014*, 691015. https://doi.org/10.1155/2014/691015
Carnevale, Roberto, Nocella, C., Petrozza, V., Cammisotto, V., Pacini, L., Sorrentino, V., Martinelli, O., Irace, L., Sciarretta, S., Frati, G., Pastori, D., & Violi, F. (2018). Localization of lipopolysaccharide from Escherichia Coli into human atherosclerotic plaque. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–8. https://doi.org/10.1038/s41598-018-22076-4
Carr Anitra C., McCall Mark R., & Frei Balz. (2000). Oxidation of LDL by Myeloperoxidase and Reactive Nitrogen Species. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *20*(7), 1716–1723. https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.7.1716
Catan, A. (2018). *Marqueurs d'athérothrombose carotidienne chez le diabétique de type 2: Rôle du stress oxydant dans la vulnérabilité de la plaque* [These de doctorat, La Réunion]. http://www.theses.fr/2018LARE0022
Cecchi, E., Giglioli, C., Valente, S., Lazzeri, C., Gensini, G. F., Abbate, R., & Mannini, L. (2011). Role of hemodynamic shear stress in cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, *214*(2), 249–256. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.09.008
Chang, Y.-C., Lee, T.-S., & Chiang, A.-N. (2012). Quercetin enhances ABCA1 expression and cholesterol efflux through a p38-dependent pathway in macrophages. *Journal of Lipid Research*, *53*(9), 1840–1850. https://doi.org/10.1194/jlr.M024471
Chapman, M. J., Goldstein, S., Lagrange, D., & Laplaud, P. M. (1981). A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *Journal of Lipid Research*, *22*(2), 339–358. http://www.jlr.org/content/22/2/339
Chatzizisis, Y. S., Coskun, A. U., Jonas, M., Edelman, E. R., Feldman, C. L., & Stone, P. H. (2007). Role of Endothelial Shear Stress in the Natural History of Coronary Atherosclerosis and Vascular Remodeling: Molecular, Cellular, and Vascular Behavior. *Journal of the American College of Cardiology*, *49*(25), 2379–2393. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.02.059
Checkouri, E., Reignier, F., Robert-Da Silva, C., & Meilhac, O. (2020). Evaluation of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Aqueous Extracts from Eight Medicinal Plants from Reunion Island: Protection against Oxidative Stress in Red Blood Cells and Preadipocytes. *Antioxidants*, *9*(10), 959. https://doi.org/10.3390/antiox9100959
Chen, C.-H., Chan, H.-C., Chu, Y.-T., Ho, H.-Y., Chen, P.-Y., Lee, T.-H., & Lee, C.-K. (2009). Antioxidant activity of some plant extracts towards xanthine oxidase, lipoxygenase and tyrosinase. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *14*(8), 2947–2958. https://doi.org/10.3390/molecules14082947
Cheng, Y.-C., Sheen, J.-M., Hu, W. L., & Hung, Y.-C. (2017). Polyphenols and Oxidative Stress in Atherosclerosis-Related Ischemic Heart Disease and Stroke. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 1–16. https://doi.org/10.1155/2017/8526438
Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, *72*, 1–20. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009
Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V., & Orekhov, A. N. (2015). Changes in transcriptome of macrophages in atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *19*(6), 1163–1173. https://doi.org/10.1111/jcmm.12591
Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V., & Orekhov, A. N. (2017a). Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *95*(11), 1153–1165. https://doi.org/10.1007/s00109-017-1575-8
Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V., & Orekhov, A. N. (2017b). Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *95*(11), 1153–1165. https://doi.org/10.1007/s00109-017-1575-8
Cirico, Tatiana. L., & Omaye, S. T. (2006). Additive or synergetic effects of phenolic compounds

on human low density lipoprotein oxidation. *Food and Chemical Toxicology*, *44*(4), 510–516. https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.08.025
Clifford, M. N., van der Hooft, J. J., & Crozier, A. (2013). Human studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of tea polyphenols. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *98*(6), 1619S-1630S. https://doi.org/10.3945/ajcn.113.058958
Comment un médicament à base de plantes est-il autorisé? - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. (2017). https://www.ansm.sante.fr/Activites/Medicaments-a-base-de-plantes/Comment-un-medicament-a-base-de-plantes-est-il-autorise/(offset)/1
Couret, D. (2018). *Effet protecteur des HDL en phase aiguë d'AVC ischémique en condition d'hyperglycémie* [Phdthesis, Université de la Réunion]. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02059866
Crawford, D. R., & Davies, K. J. (1994). Adaptive response and oxidative stress. *Environmental Health Perspectives*, *102 Suppl 10*, 25–28. https://doi.org/10.1289/ehp.94102s1025
Croft, K. D. (2016). Dietary polyphenols: Antioxidants or not? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *595*, 120–124. https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.014
Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, *15*(10), 7313–7352. https://doi.org/10.3390/molecules15107313
D'Archivio, M., Annuzzi, G., Varì, R., Filesi, C., Giacco, R., Scazzocchio, B., Santangelo, C., Giovannini, C., Rivellese, A. A., & Masella, R. (2012). Predominant role of obesity/insulin resistance in oxidative stress development: OBESITY/INSULIN RESISTANCE AND OXIDATIVE STRESS. *European Journal of Clinical Investigation*, *42*(1), 70–78. https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2011.02558.x
de Ferranti, S., & Mozaffarian, D. (2008). The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences. *Clinical Chemistry*, *54*(6), 945–955. https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.100156
Delbosc, S., Bayles, R. G., Laschet, J., Ollivier, V., Ho-Tin-Noé, B., Touat, Z., Deschildre, C., **Morvan**, M., Louedec, L., Gouya, L., Guedj, K., Nicoletti, A., & Michel, J.-B. (2017). Erythrocyte Efferocytosis by the Arterial Wall Promotes Oxidation in Early-Stage Atheroma in Humans. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *4*. https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00043
Dietrich-Muszalska, A., & Olas, B. (2010). Inhibitory effects of polyphenol compounds on lipid peroxidation caused by antipsychotics (haloperidol and amisulpride) in human plasma in vitro. *The World Journal of Biological Psychiatry: The Official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, *11*(2 Pt 2), 276–281. https://doi.org/10.1080/15622970902718790
Directive 2004/27/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004. (2009). *Pharmaceuticals, Policy and Law*, *11*(4), 523–557. https://doi.org/10.3233/PPL-2009-0236
Dobi, A., Bravo, S. B., Veeren, B., Paradela-Dobarro, B., Álvarez, E., Meilhac, O., Viranaicken, W., Baret, P., Devin, A., & Rondeau, P. (2019). Advanced glycation end-products disrupt human endothelial cells redox homeostasis: New insights into reactive oxygen species production. *Free Radical Research*, *53*(2), 150–169. https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1529866
Doligé, E., & Vergoz, M. (2014). *Les niveaux de vie dans les outre-mer: Un rattrapage en panne ?* https://www.senat.fr/rap/r13-710/r13-7101.html
dos Santos, M. M., Prestes, A. S., de Macedo, G. T., Ecker, A., Barcelos, R. P., Boligon, A. A., **Souza**, D., de Bem, A. F., da Rocha, J. B. T., & Barbosa, N. V. (2018). Syzygium cumini leaf extract inhibits LDL oxidation, but does not protect the liproprotein from glycation. *Journal of Ethnopharmacology*, *210*, 69–79. https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.033
Dutertre, J.-M. (2011). *Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la Réunion: À propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste.* (BDSP/BIUSANTE : BORDEAUX-2011-66). Base documentaire BDSP - Banque de données en santé publique.
Ekstrand, M., Trajkovska, M. G., Perman-Sundelin, J., Fogelstrand, P., Adiels, M., Johansson, M., Mattsson-Hultén, L., Borén, J., & Levin, M. (2015). Imaging of Intracellular and Extracellular ROS Levels in Atherosclerotic Mouse Aortas Ex Vivo: Effects of Lipid Lowering by Diet or Atorvastatin. *PLOS ONE*, *10*(6), e0130898. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130898
Emini Veseli, B., Perrotta, P., De Meyer, G. R. A., Roth, L., Van der Donckt, C., Martinet, W., & De Meyer, G. R. Y. (2017). Animal models of atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology*,

816, 3–13. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.010
Espín, J. C., González-Sarrías, A., & Tomás-Barberán, F. A. (2017). The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochemical Pharmacology*, *139*, 82–93. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.033
Es-Safi, N.-E. (2012). Plant Polyphenols: Extraction, Structural Characterization, Hemisynthesis and Antioxidant Properties. In V. Rao (Ed.), *Phytochemicals as Nutraceuticals—Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. InTech. https://doi.org/10.5772/26832
Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., & Jürgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*, *13*(4), 341–390. https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90181-F
Fabricant D S, & Farnsworth N R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, *109*(suppl 1), 69–75. https://doi.org/10.1289/ehp.01109s169
Fan, J., & de Lannoy, I. A. M. (2014). Pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology*, *87*(1), 93–120. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.09.007
Fatkhullina, A. R., Peshkova, I. O., & Koltsova, E. K. (2016). The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis. *Biochemistry. Biokhimiia*, *81*(11), 1358–1370. https://doi.org/10.1134/S0006297916110134
Favier, F., Jaussent, I., Moullec, N. L., Debussche, X., Boyer, M.-C., Schwager, J.-C., & Papoz, L. (2005). Prevalence of Type 2 diabetes and central adiposity in La Réunion Island, the REDIA Study. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *67*(3), 234–242. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2004.07.013
Feingold, K. R., & Grunfeld, C. (2018). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In *Endotext [Internet]*. MDText.com, Inc. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/
Feliciano, R. P., Boeres, A., Massacessi, L., Istas, G., Ventura, M. R., Nunes dos Santos, C., Heiss, C., & Rodriguez-Mateos, A. (2016). Identification and quantification of novel cranberry-derived plasma and urinary (poly)phenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *599*, 31–41. https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.01.014
Felton C. V., Crook D., Davies M. J., & Oliver M. F. (1997). Relation of Plaque Lipid Composition and Morphology to the Stability of Human Aortic Plaques. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *17*(7), 1337–1345. https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.7.1337
Ference, B. A., Ginsberg, H. N., Graham, I., Ray, K. K., Packard, C. J., Bruckert, E., Hegele, R. A., Krauss, R. M., Raal, F. J., Schunkert, H., Watts, G. F., Borén, J., Fazio, S., Horton, J. D., Masana, L., Nicholls, S. J., Nordestgaard, B. G., van de Sluis, B., Taskinen, M.-R., … Catapano, A. L. (2017). Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European Heart Journal*, *38*(32), 2459–2472. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx144
Fielding, C. J., & Fielding, P. E. (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *Journal of Lipid Research*, *36*(2), 211–228. http://www.jlr.org/content/36/2/211
Figueroa Pérez, M. G., Rocha-Guzmán, N. E., Mercado-Silva, E., Loarca-Piña, G., & Reynoso-Camacho, R. (2014). Effect of chemical elicitors on peppermint (Mentha piperita) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. *Food Chemistry*, *156*, 273–278. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.101
Filipovic-Pierucci, A., Tuppin, P., Cuerq, A., Samson, S., Denis, P., & Fagot-Campagna, A. (2016). Repérage des pathologies prises en charge à partir du Sniiram: Étude des départements d'outremer et comparaison à la métropole. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*, *64*, S26. https://doi.org/10.1016/j.respe.2016.01.081
Förstermann, U., Xia, N., & Li, H. (2017). Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation Research*. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309326
Fuhrman, B., Rosenblat, M., Hayek, T., Coleman, R., & Aviram, M. (2000). Ginger Extract Consumption Reduces Plasma Cholesterol, Inhibits LDL Oxidation and Attenuates Development of Atherosclerosis in Atherosclerotic, Apolipoprotein E-Deficient Mice. *The Journal of Nutrition*, *130*(5), 1124–1131. https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1124

Gaceb, A., Martinez, M. C., & Andriantsitohaina, R. (2014). Extracellular vesicles: New players in cardiovascular diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *50*, 24–28. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.01.018
Galis, Z. S., Sukhova, G. K., Lark, M. W., & Libby, P. (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *The Journal of Clinical Investigation*, *94*(6), 2493–2503. https://doi.org/10.1172/JCI117619
Gangwar, M., Gautam, M. K., Sharma, A. K., Tripathi, Y. B., Goel, R. K., & Nath, G. (2014). Antioxidant Capacity and Radical Scavenging Effect of Polyphenol Rich *Mallotus philippenensis* Fruit Extract on Human Erythrocytes: An *In Vitro* Study. *The Scientific World Journal*, *2014*, 1–12. https://doi.org/10.1155/2014/279451
Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, *15*(12), 8813–8826. https://doi.org/10.3390/molecules15128813
Gauvin-Bialecki, A., & Marodon, C. (2008). Essential oil of Ayapana triplinervis from Reunion Island: A good natural source of thymohydroquinone dimethyl ether. *Biochemical Systematics and Ecology*, *36*(11), 853–858. https://doi.org/10.1016/j.bse.2008.09.006
Geng, S., Chen, K., Yuan, R., Peng, L., Maitra, U., Diao, N., Chen, C., Zhang, Y., Hu, Y., Qi, C.-F., Pierce, S., Ling, W., Xiong, H., & Li, L. (2016). The persistence of low-grade inflammatory monocytes contributes to aggravated atherosclerosis. *Nature Communications*, *7*(1), 13436. https://doi.org/10.1038/ncomms13436
Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., & Brown, M. S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(1), 333–337. https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.333
Goldstein, Joseph L., & Brown, M. S. (1977). Atherosclerosis: The low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism*, *26*(11), 1257–1275. https://doi.org/10.1016/0026-0495(77)90119-6
Goldstein, Joseph L., & Brown, M. S. (2009). History of Discovery: The LDL Receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(4), 431–438. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179564
Gong, T., Yang, X., Bai, F., Li, D., Zhao, T., Zhang, J., Sun, L., & Guo, Y. (2020). Young apple polyphenols as natural α-glucosidase inhibitors: In vitro and in silico studies. *Bioorganic Chemistry*, *96*, 103625. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103625
González-Sarrías, A., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2017). Non-extractable polyphenols produce gut microbiota metabolites that persist in circulation and show anti-inflammatory and free radical-scavenging effects. *Trends in Food Science & Technology*, *69*, 281–288. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.010
Gotlieb, A. I. (2005). Atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Cardiovascular Pathology*, *14*(4), 181–184. https://doi.org/10.1016/j.carpath.2005.03.007
Grattagliano, I., Palmieri, V. O., Portincasa, P., Moschetta, A., & Palasciano, G. (2008). Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: A unifying hypothesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *19*(8), 491–504. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.06.011
Grootaert, M. O. J., Moulis, M., Roth, L., Martinet, W., Vindis, C., Bennett, M. R., & De Meyer, G. R. Y. (2018). Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, *114*(4), 622–634. https://doi.org/10.1093/cvr/cvy007
Gugliucci, A., & Menini, T. (2002). Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb Achyrocline satureoides. *Life Sciences*, *71*(6), 693–705. https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)01734-4
Gupta, A., NARANIWAL, M., & Kothari, V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences*.
Haddad, J. G., Picard, M., Bénard, S., Desvignes, C., Desprès, P., Diotel, N., & El Kalamouni, C. (2019). Ayapana triplinervis Essential Oil and Its Main Component Thymohydroquinone Dimethyl Ether Inhibit Zika Virus at Doses Devoid of Toxicity in Zebrafish. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(19). https://doi.org/10.3390/molecules24193447
Haddy, N. (2003). IL-6, TNF-α and atherosclerosis risk indicators in a healthy family population:

The STANISLAS cohort. *Atherosclerosis*, *170*(2), 277–283. https://doi.org/10.1016/S0021-9150(03)00287-9
Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *476*(2), 107–112. https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.028
Hao, D., Danbin, W., Maojuan, G., Chun, S., Bin, L., Lin, Y., Yingxin, S., Guanwei, F., Yefei, C., Qing, G., & Xijuan, J. (2019). Ethanol extracts of Danlou tablet attenuate atherosclerosis via inhibiting inflammation and promoting lipid effluent. *Pharmacological Research*, *146*, 104306. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104306
Harats Dror, Shaish Aviv, George Jacob, Mulkins Mary, Kurihara Hiroki, Levkovitz Hana, & Sigal Elliott. (2000). Overexpression of 15-Lipoxygenase in Vascular Endothelium Accelerates Early Atherosclerosis in LDL Receptor–Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *20*(9), 2100–2105. https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.9.2100
Harrington, J. R. (2000). The Role of MCP-1 in Atherosclerosis. *STEM CELLS*, *18*(1), 65–66. https://doi.org/10.1634/stemcells.18-1-65
Hatia, S., Septembre-Malaterre, A., Le Sage, F., Badiou-Bénéteau, A., Baret, P., Payet, B., Lefebvre d'hellencourt, C., & Gonthier, M. P. (2014). Evaluation of antioxidant properties of major dietary polyphenols and their protective effect on 3T3-L1 preadipocytes and red blood cells exposed to oxidative stress. *Free Radical Research*, *48*(4), 387–401. https://doi.org/10.3109/10715762.2013.879985
Henry-Kirk, R. A., Plunkett, B., Hall, M., McGhie, T., Allan, A. C., Wargent, J. J., & Espley, R. V. (2018). Solar UV light regulates flavonoid metabolism in apple (Malus x domestica). *Plant, Cell & Environment*, *41*(3), 675–688. https://doi.org/10.1111/pce.13125
Hernáez, Á., Fernández-Castillejo, S., Farràs, M., Catalán, Ú., Subirana, I., Montes, R., Solà, R., Muñoz-Aguayo, D., Gelabert-Gorgues, A., Díaz-Gil, Ó., Nyyssönen, K., Zunft, H.-J. F., de la Torre, R., Martín-Peláez, S., Pedret, A., Remaley, A. T., Covas, M.-I., & Fitó, M. (2014). Olive Oil Polyphenols Enhance High-Density Lipoprotein Function in Humans: A Randomized Controlled Trial. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *34*(9), 2115–2119. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303374
Herrmann, K. M. (1995). The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiology*, *107*(1), 7–12. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC161158/
Hobohm, C. (2000). Plant species diversity and endemism on islands and archipelagos, with special reference to the Macaronesian Islands. *Flora*, *195*(1), 9–24. https://doi.org/10.1016/S0367-2530(17)30943-X
Hofmann, M. A., Schiekofer, S., Isermann, B., Kanitz, M., Henkels, M., Joswig, M., Treusch, A., Morcos, M., Weiss, T., Borcea, V., Abdel Khalek, A. K. M., Amiral, J., Tritschler, H., Ritz, E., Wahl, P., Ziegler, R., Bierhaus, A., & Nawroth, P. P. (1999). Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kB. *Diabetologia*, *42*(2), 222–232. https://doi.org/10.1007/s001250051142
Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur.
Hoppe, G., O'Neil, J., & Hoff, H. F. (1994). Inactivation of lysosomal proteases by oxidized low density lipoprotein is partially responsible for its poor degradation by mouse peritoneal macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, *94*(4), 1506–1512. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC295294/
Horseman, M. A., Surani, S., & Bowman, J. D. (2017). Endotoxin, Toll-like Receptor-4, and Atherosclerotic Heart Disease. *Current Cardiology Reviews*, *13*(2), 86–93. https://doi.org/10.2174/1573403X12666160901145313
Hurwitz, A., Furtado, D., & Low, R. R. (1975). The effects of endotoxemia and bacteremia on gastrointestinal drug absorption in mice and rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *192*(1), 236–241.
Ikewuchi, C. C., Ikewuchi, J. C., & Ifeanacho, M. O. (2017). Bioactive phytochemicals in an aqueous extract of the leaves of Talinum triangulare. *Food Science & Nutrition*, *5*(3), 696–701. https://doi.org/10.1002/fsn3.449
Jessup, W., Mohr, D., Gieseg, S. P., Dean, R. T., & Stocker, R. (1992). The participation of nitric

oxide in cell free- and its restriction of macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1180*(1), 73–82. https://doi.org/10.1016/0925-4439(92)90029-M

Johnson, J. L. (2017). Metalloproteinases in atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology*, *816*, 93–106. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.007

Khan, H. (2013). Molecular docking of Viscosine as a new lipoxygenase inhibitor isolated from Dodonaea viscosa. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, *8*, 36–39. https://doi.org/10.3329/bjp.v8i1.1308

Kondratyuk, T. P., & Pezzuto, J. M. (2004). Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health. *Pharmaceutical Biology*, *42*(sup1), 46–63. https://doi.org/10.3109/13880200490893519

Kumar, R., & Tewari, A. K. (2018). Chapter 10—Isolation of medicinally important constituents from rare and exotic medicinal plants. In A. Tewari & S. Tiwari (Eds.), *Synthesis of Medicinal Agents from Plants* (pp. 229–256). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102071-5.00010-6

La Réunion, terre de tisaneurs. (2020). Réunion la 1ère. https://la1ere.francetvinfo.fr/reunion/reunion-terre-tisaneurs-809018.html

Labbé, J. (2018). *Les plantes médicinales et l'herboristerie: À la croisée de savoirs ancestraux et d'enjeux d'avenir*. https://www.senat.fr/rap/r17-727/r17-7277.html

Latruffe, N., Menzel, M., Delmas, D., Buchet, R., & Lançon, A. (2014). Compared binding properties between resveratrol and other polyphenols to plasmatic albumin: Consequences for the health protecting effect of dietary plant microcomponents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *19*(11), 17066–17077. https://doi.org/10.3390/molecules191117066

Lavergne, R. (1989). *Plantes médicinales indigènes: Tisanerie et tisaneurs de la Réunion* [Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc]. HAL.

Lavergne, R. (2018). *Les plantes médicinales réunionnaises d'aujourd'hui* -. http://www.ethnopharmacologia.org/bibliotheque-ethnopharmacologie/les-plantes-medicinales-reunionnaises-d-aujourd-hui/

Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J.-S., Jeong, H.-S., & Kim, J. H. (2003). Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sciences*, *73*(2), 167–179. https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00259-5

Les manifestations—Aplamedom. (2016). Aplamedom Réunion. https://aplamedom.org/category/manifestation/

Les plantes médicinales de la Réunion, de la canopée aux labos de pointe. (2019, January 23). https://www.youtube.com/watch?v=C2XtLIpghIk

Levitan, I., Volkov, S., & Subbaiah, P. V. (2010, May 19). *Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology* (140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA) [Review-article]. Https://Home.Liebertpub.Com/Ars; Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA. https://doi.org/10.1089/ars.2009.2733

Li Wei, Yuan Xi Ming, Olsson Anders G., & Brunk Ulf T. (1998). Uptake of Oxidized LDL by Macrophages Results in Partial Lysosomal Enzyme Inactivation and Relocation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *18*(2), 177–184. https://doi.org/10.1161/01.ATV.18.2.177

Li, X.-W., Chen, H.-P., He, Y.-Y., Chen, W.-L., Chen, J.-W., Gao, L., Hu, H.-Y., & Wang, J. (2018). Effects of Rich-Polyphenols Extract of Dendrobium loddigesii on Anti-Diabetic, Anti-Inflammatory, Anti-Oxidant, and Gut Microbiota Modulation in db/db Mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *23*(12). https://doi.org/10.3390/molecules23123245

Liao, F., & Andalibi, A. (1993). Genetic Control of Inflammatory Gene Induction and NF-KB-like Transcription Factor Activation in Response to an Atherogenic Diet in Mice. *Journal of Clinical Investigation*, 8.

Liao, X., Sluimer, J. C., Wang, Y., Subramanian, M., Brown, K., Pattison, J. S., Robbins, J., Martinez, J., & Tabas, I. (2012). Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis. *Cell Metabolism*, *15*(4), 545–553. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.022

Lin, J., Della-Fera, M. A., & Baile, C. A. (2005). Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate Inhibits Adipogenesis and Induces Apoptosis in 3T3-L1 Adipocytes. *Obesity Research*, *13*(6), 982–990. https://doi.org/10.1038/oby.2005.115

Lin, W., Wang, W., Yang, H., Wang, D., & Ling, W. (2016). Influence of Intestinal Microbiota on the Catabolism of Flavonoids in Mice. *Journal of Food Science*, *81*(12), H3026–H3034.

https://doi.org/10.1111/1750-3841.13544
Lin, X., Liu, M.-H., Hu, H.-J., Feng, H., Fan, X.-J., Zou, W., Pan, Y., Hu, X., & Wang, Z. (2015). Curcumin enhanced cholesterol efflux by upregulating ABCA1 expression through AMPK-SIRT1-LXRα signaling in THP-1 macrophage-derived foam cells. *DNA and Cell Biology*, *34*(9), 561–572. https://doi.org/10.1089/dna.2015.2866
Liu, S., Sui, Q., Zhao, Y., & Chang, X. (2019). Lonicera caerulea Berry Polyphenols Activate SIRT1, Enhancing Inhibition of Raw264.7 Macrophage Foam Cell Formation and Promoting Cholesterol Efflux. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(25), 7157–7166. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02045
Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *2*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23
Liu, X., Li, J., Peng, X., Lv, B., Wang, P., Zhao, X., & Yu, B. (2016). Geraniin Inhibits LPS-Induced THP-1 Macrophages Switching to M1 Phenotype via SOCS1/NF-κB Pathway. *Inflammation*, *39*(4), 1421–1433. https://doi.org/10.1007/s10753-016-0374-7
Luca, S. V., Macovei, I., Bujor, A., Miron, A., Skalicka-Woźniak, K., Aprotosoaie, A. C., & Trifan, A. (2020). Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(4), 626–659. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546669
Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, *1043*(2), 323–327. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.083
Luche, E., Cousin, B., Garidou, L., Serino, M., Waget, A., Barreau, C., André, M., Valet, P., Courtney, M., Casteilla, L., & Burcelin, R. (2013). Metabolic endotoxemia directly increases the proliferation of adipocyte precursors at the onset of metabolic diseases through a CD14-dependent mechanism. *Molecular Metabolism*, *2*(3), 281–291. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.06.005
Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, *407*(6801), 233–241. https://doi.org/10.1038/35025203
Lv, O., Wang, L., Li, J., Ma, Q., & Zhao, W. (2016). Effects of pomegranate peel polyphenols on lipid accumulation and cholesterol metabolic transformation in L-02 human hepatic cells via the PPARγ-ABCA1/CYP7A1 pathway. *Food & Function*, *7*(12), 4976–4983. https://doi.org/10.1039/c6fo01261b
Lyon-Caen, O. (2019). *La cartographie des pathologies et dépenses—Résultats 2012-2017*.
Mahomoodally, M., Korumtollee, H., & Chady, Z. (2014). Psiloxylon mauritianum (Bouton ex Hook.f.) Baillon (Myrtaceae)-a promising traditional medicinal plant from the Mascarene Islands. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, *3*(4), 192. https://doi.org/10.5455/jice.20140804010620
Manach, C., Milenkovic, D., Van de Wiele, T., Rodriguez-Mateos, A., de Roos, B., Garcia-Conesa, M. T., Landberg, R., Gibney, E. R., Heinonen, M., Tomás-Barberán, F., & Morand, C. (2017). Addressing the inter-individual variation in response to consumption of plant food bioactives: Towards a better understanding of their role in healthy aging and cardiometabolic risk reduction. *Molecular Nutrition & Food Research*, *61*(6), 1600557. https://doi.org/10.1002/mnfr.201600557
Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(5), 727–747. https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727
Maracle, C. X., Agca, R., Helder, B., Meeuwsen, J. A. L., Niessen, H. W. M., Biessen, E. A. L., de Winther, M. P. J., de Jager, S. C. A., Nurmohamed, M. T., & Tas, S. W. (2018). Noncanonical NF-κB signaling in microvessels of atherosclerotic lesions is associated with inflammation, atheromatous plaque morphology and myocardial infarction. *Atherosclerosis*, *270*, 33–41. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.01.032
Marimoutou, M., Le Sage, F., Smadja, J., Lefebvre d'Hellencourt, C., Gonthier, M.-P., & Robert-Da Silva, C. (2015). Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants Antirhea borbonica, Doratoxylon apetalum and Gouania mauritiana protect 3T3-L1 preadipocytes against H2O2, TNFα and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismutase and NF-κB genes. *Journal of Inflammation*, *12*(1), 10. https://doi.org/10.1186/s12950-015-0055-6
Mariutti, L. R. B., Rodrigues, E., Chisté, R. C., Fernandes, E., & Mercadante, A. Z. (2014). The

Amazonian fruit Byrsonima crassifolia effectively scavenges reactive oxygen and nitrogen species and protects human erythrocytes against oxidative damage. *Food Research International*, *64*, 618–625. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.032

Martín-Ventura, J., Rodrigues-Diez, R., Martínez López, D., Salaices, M., Blanco-Colio, L., & Briones, A. (2017). Oxidative Stress in Human Atherothrombosis: Sources, Markers and Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*, 2315. https://doi.org/10.3390/ijms18112315

Masuda J, & Ross R. (1990). Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Fatty streak formation. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.*, *10*(2), 164–177. https://doi.org/10.1161/01.ATV.10.2.164

Mei, Q., Wang, C., Zhao, Z., Yuan, W., & Zhang, G. (2015). Synthesis of icariin from kaempferol through regioselective methylation and para-Claisen–Cope rearrangement. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, *11*, 1220–1225. https://doi.org/10.3762/bjoc.11.135

Mohanty, J. G., Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (2014). Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in Physiology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084

Momtazi-Borojeni, A. A., Abdollahi, E., Nikfar, B., Chaichian, S., & Ekhlasi-Hundrieser, M. (2019). Curcumin as a potential modulator of M1 and M2 macrophages: New insights in atherosclerosis therapy. *Heart Failure Reviews*, *24*(3), 399–409. https://doi.org/10.1007/s10741-018-09764-z

Moore, K. J., Koplev, S., Fisher, E. A., Tabas, I., Björkegren, J. L. M., Doran, A. C., & Kovacic, J. C. (2018). Macrophage Trafficking, Inflammatory Resolution, and Genomics in Atherosclerosis: JACC Macrophage in CVD Series (Part 2). *Journal of the American College of Cardiology*, *72*(18), 2181–2197. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.08.2147

Moore, K. J., Sheedy, F. J., & Fisher, E. A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: A dynamic balance. *Nature Reviews Immunology*, *13*(10), 709–721. https://doi.org/10.1038/nri3520

Morel, A.-L., Giraud, S., Bialecki, A., Moustaoui, H., de La Chapelle, M. L., & Spadavecchia, J. (2017). Green extraction of endemic plants to synthesize gold nanoparticles for theranostic applications. *Frontiers in Laboratory Medicine*, *1*(3), 158–171. https://doi.org/10.1016/j.flm.2017.10.003

Morgan, J. (1995). Oxidation of low density lipoprotein by iron or copper at acidic pH. *Journal of Lipid Research*, *36*, 9.

Mothana, R. A. A., Abdo, S. A. A., Hasson, S., Althawab, F. M. N., Alaghbari, S. A. Z., & Lindequist, U. (2010). Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Yemeni Medicinal Plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *7*(3), 323–330. https://doi.org/10.1093/ecam/nen004

Moulis, M., & Vindis, C. (2018). Autophagy in Metabolic Age-Related Human Diseases. *Cells*, *7*(10), 149. https://doi.org/10.3390/cells7100149

Muhammad, A., Tel-Çayan, G., Öztürk, M., Duru, M. E., Nadeem, S., Anis, I., Ng, S. W., & Shah, M. R. (2016). Phytochemicals from Dodonaea viscosa and their antioxidant and anticholinesterase activities with structure-activity relationships. *Pharmaceutical Biology*, *54*(9), 1649–1655. https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1113992

Murota, K., Nakamura, Y., & Uehara, M. (2018). Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *82*(4), 600–610. https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444467

Nahapetyan, H., Moulis, M., Grousset, E., Faccini, J., Grazide, M.-H., Mucher, E., Elbaz, M., Martinet, W., & Vindis, C. (2019). Altered mitochondrial quality control in Atg7-deficient VSMCs promotes enhanced apoptosis and is linked to unstable atherosclerotic plaque phenotype. *Cell Death & Disease*, *10*(2), 1–15. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1400-0

Nakamura, T., Kinjo, C., Nakamura, Y., Kato, Y., Nishikawa, M., Hamada, M., Nakajima, N., Ikushiro, S., & Murota, K. (2018). Lymphatic metabolites of quercetin after intestinal administration of quercetin-3-glucoside and its aglycone in rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *645*, 126–136. https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.03.024

Nakashima, Y., Raines, E. W., Plump, A. S., Breslow, J. L., & Ross, R. (1998). Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient

mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *18*(5), 842–851. https://doi.org/10.1161/01.atv.18.5.842
Nakashima, Yutaka, Fujii, H., Sumiyoshi, S., Wight, T. N., & Sueishi, K. (2007). Early Human Atherosclerosis: Accumulation of Lipid and Proteoglycans in Intimal Thickenings Followed by Macrophage Infiltration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(5), 1159–1165. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.106.134080
Nègre-Salvayre, A., Vindis, C., & Salvayre, R. (2006). Signalisation apototique induite par les LDL oxydées Implication dans l'athérosclérose. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, *13*, 39–45. https://doi.org/10.1051/ocl.2006.4444
Nelken, N. A., Coughlin, S. R., Gordon, D., & Wilcox, J. N. (1991). Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *Journal of Clinical Investigation*, *88*(4), 1121–1127. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC295565/
Nemeikaitė-Čėnienė, A., Imbrasaitė, A., Sergedienė, E., & Čėnas, N. (2005). Quantitative structure–activity relationships in prooxidant cytotoxicity of polyphenols: Role of potential of phenoxyl radical/phenol redox couple. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *441*(2), 182–190. https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.07.002
Nguyen, M. V. C., Lardy, B., Paclet, M.-H., Rousset, F., Berthier, S., Baillet, A., Grange, L., Gaudin, P., & Morel, F. (2015). Les NADPH oxydases, Nox—Une nouvelle famille d'isoenzymes. *médecine/sciences*, *31*(1), 43–52. https://doi.org/10.1051/medsci/20153101012
Nielsen, I. L. F., Chee, W. S. S., Poulsen, L., Offord-Cavin, E., Rasmussen, S. E., Frederiksen, H., Enslen, M., Barron, D., Horcajada, M.-N., & Williamson, G. (2006). Bioavailability Is Improved by Enzymatic Modification of the Citrus Flavonoid Hesperidin in Humans: A Randomized, Double-Blind, Crossover Trial. *The Journal of Nutrition*, *136*(2), 404–408. https://doi.org/10.1093/jn/136.2.404
Nimgulkar, C., Ghosh, S., Sankar, A. B., Uday, K. P., Surekha, M. V., Madhusudhanachary, P., Annapurna, B. R., Raghu, P., & Bharatraj, D. K. (2015). Combination of spices and herbal extract restores macrophage foam cell migration and abrogates the athero-inflammatory signalling cascade of atherogenesis. *Vascular Pharmacology*, *72*, 53–63. https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.02.014
Nizamutdinova, I. T., Kim, Y. M., Chung, J. I., Shin, S. C., Jeong, Y.-K., Seo, H. G., Lee, J. H., Chang, K. C., & Kim, H. J. (2009, July 24). *Anthocyanins from Black Soybean Seed Coats Preferentially Inhibit TNF-α-Mediated Induction of VCAM-1 over ICAM-1 through the Regulation of GATAs and IRF-1* (world) [Research-article]. American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/jf900856z
Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., & Ohta, H. (2006). Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *70*(1), 178–192. https://doi.org/10.1271/bbb.70.178
Nuñez-Sánchez, M. A., García-Villalba, R., Monedero-Saiz, T., García-Talavera, N. V., Gómez-Sánchez, M. B., Sánchez-Álvarez, C., García-Albert, A. M., Rodríguez-Gil, F. J., Ruiz-Marín, M., Pastor-Quirante, F. A., Martínez-Díaz, F., Yáñez-Gascón, M. J., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2014). Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. *Molecular Nutrition & Food Research*, *58*(6), 1199–1211. https://doi.org/10.1002/mnfr.201300931
Observatoire Régional de la Santé Océan Indien. (2017). *Tableau de bord sur les maladies cardiovasculaires à La Réunion*. https://www.ors-ocean-indien.org/IMG/pdf/tb_orsoi_mcv_reunion_2017.pdf
Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF-κB Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(4). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000034
Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, *95*(2), 351–358. https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3
Ojulari, O. V., Lee, S. G., & Nam, J.-O. (2019). Beneficial Effects of Natural Bioactive Compounds from Hibiscus sabdariffa L. on Obesity. *Molecules*, *24*(1). https://doi.org/10.3390/molecules24010210
Olivares, R., Ducimetière, P., & Claude, J. R. (1993). Monocyte count: A risk factor for coronary

heart disease? *American Journal of Epidemiology*, *137*(1), 49–53. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a116601
***OMS** | Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023*. (2013). WHO; World Health Organization. https://www.who.int/publications/list/traditional_medicine_strategy/fr/
Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I., & Marcel, Y. L. (2011). Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metabolism*, *13*(6), 655–667. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.023
Palinski, W., & Napoli, C. (1999). Pathophysiological Events during Pregnancy Influence the Development of Atherosclerosis in Humans. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *9*(7), 205–214. https://doi.org/10.1016/S1050-1738(00)00022-0
Patay, É. B., Bencsik, T., & Papp, N. (2016). Phytochemical overview and medicinal importance of Coffea species from the past until now. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *9*(12), 1127–1135. https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.11.008
Pereira, D., Valentão, P., Pereira, J., & Andrade, P. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, *14*(6), 2202–2211. https://doi.org/10.3390/molecules14062202
P**érez-Jiménez**, J, Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: An application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, *64*(S3), S112–S120. https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.221
Pérez-Jiménez, Jara, Serrano, J., Tabernero, M., Arranz, S., Díaz-Rubio, M. E., García-Diz, L., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2009). Bioavailability of Phenolic Antioxidants Associated with Dietary Fiber: Plasma Antioxidant Capacity After Acute and Long-Term Intake in Humans. *Plant Foods for Human Nutrition*, *64*(2), 102–107. https://doi.org/10.1007/s11130-009-0110-7
Perron, N. R., & Brumaghim, J. L. (2009). A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *53*(2), 75–100. https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x
Picot, M. C. N., Bender, O., Atalay, A., Zengin, G., Loffredo, L., Hadji-Minaglou, F., & Mahomoodally, M. F. (2017). Multiple pharmacological targets, cytotoxicity, and phytochemical profile of Aphloia theiformis (Vahl.) Benn. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *89*, 342–350. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.031
Pietta, P. G., Simonetti, P., Gardana, C., Brusamolino, A., Morazzoni, P., & Bombardelli, E. (1998). Catechin metabolites after intake of green tea infusions. *BioFactors*, *8*(1–2), 111–118. https://doi.org/10.1002/biof.5520080119
Poloni, D. M., Dangles, O., & Vinson, J. A. (2019). Binding of Plant Polyphenols to Serum Albumin and LDL: Healthy Implications for Heart Disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(33), 9139–9147. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06674
Polton, D., & Ricordeau, P. (2011). *Le SNIIRAM et les bases de données de l'Assurance Maladie en 201*. 58.
Poullain, C., Girard-Valenciennes, E., & Smadja, J. (2004). Plants from reunion island: Evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities. *Journal of Ethnopharmacology*, *95*(1), 19–26. https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.023
Pourchez, L. (2006). Comportements alimentaires, petite enfance et grande distribution: Incorporation de nouvelles normes à l'île de La Réunion. *Journal des anthropologues*, *106–107*, 145–167. https://doi.org/10.4000/jda.1303
Prawiradilaga, D. M. (2017). Endemism☆. In *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.02164-6
***Premiers résultats du Baromètre santé DOM 2014**—La Réunion*. (2014). 12.
Priya, S. H., Prakasan, N., & Purushothaman, J. (2017). Antioxidant activity, phenolic-flavonoid content and high-performance liquid chromatography profiling of three different variants of Syzygium cumini seeds: A comparative study. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, *6*(1), 107–114. https://doi.org/10.5455/jice.20161229055555
Proestos, C., & Komaitis, M. (2007). Application of microwave-assisted extraction tothe fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT*, *41*, 652–659.
Quehenberger, O. (2005). Thematic Review Series: The Immune System and Atherogenesis. Molecular mechanisms regulating monocyte recruitment in atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, *46*(8), 1582–1590. https://doi.org/10.1194/jlr.R500008-JLR200

Quiles, J. L., Mesa, M. D., Ramírez-Tortosa, C. L., Aguilera, C. M., Battino, M., Gil, A., & Ramírez-Tortosa, M. C. (2002). Curcuma longa extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *22*(7), 1225–1231. https://doi.org/10.1161/01.atv.0000020676.11586.f2

Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*, *2014*, 1–19. https://doi.org/10.1155/2014/761264

Rahangdale, S., Yeh, S., Malhotra, A., & Veves, A. (2009). Therapeutic interventions and oxidative stress in diabetes. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, *14*, 192–209. https://doi.org/10.2741/3240

Rahim, A. T. M. A., Takahashi, Y., & Yamaki, K. (2015). Mode of pancreatic lipase inhibition activity in vitro by some flavonoids and non-flavonoid polyphenols. *Food Research International*, *75*, 289–294. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.017

Rangasamy, O., Mahomoodally, F. M., Gurib-Fakim, A., & Quetin-Leclercq, J. (2014). Two anti-staphylococcal triterpenoid acids isolated from Psiloxylon mauritianum (Bouton ex Hook.f.) Baillon, an endemic traditional medicinal plant of Mauritius. *South African Journal of Botany*, *93*, 198–203. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.03.017

Reape, T. J., & Groot, P. H. (1999). Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *147*(2), 213–225. https://doi.org/10.1016/s0021-9150(99)00346-9

Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srai, S. K. S., Moore, K. P., & Rice-Evans, C. A. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology & Medicine*, *36*(2), 212–225. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.022

Reidy, M., & Bowyer, D. (1977). Scanning electron microscopy of arteries The morphology of aortic endothelium in haemodynamically stressed areas associated with branches. *Atherosclerosis*, *26*(2), 181–194. https://doi.org/10.1016/0021-9150(77)90101-0

Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, *3*(7), 1125–1131. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75

Repon, K. S., Zaman, M., & Roy. (2013). Comparative evaluation of the medicinal activities of methanolic extract of seeds, fruit pulps and fresh juice of Syzygium cumini in vitro. *Journal of Coastal Life Medicine*. https://doi.org/10.12980/JCLM.1.2013C365

Reygaert, W. C. (2018). Green Tea Catechins: Their Use in Treating and Preventing Infectious Diseases. *BioMed Research International*, *2018*, 9105261. https://doi.org/10.1155/2018/9105261

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, *20*(7), 933–956. https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9

Ricquebourg, M. (2018). *Tableau de bord—La Nutrition Santé à La Réunion* (p. 72). ORS OI.

Robbesyn, F., Salvayre, R., & Negre-Salvayre, A. (2004). Dual role of oxidized LDL on the NF-kappaB signaling pathway. *Free Radical Research*, *38*(6), 541–551. https://doi.org/10.1080/10715760410001665244

Robinson, J. G., & Gidding, S. S. (2014). Curing Atherosclerosis Should Be the Next Major Cardiovascular Prevention Goal. *Journal of the American College of Cardiology*, *63*(25 Part A), 2779–2785. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.04.009

Rodríguez-Gómez, R., Vanheuverzwjin, J., Souard, F., Delporte, C., Stevigny, C., Stoffelen, P., De Braekeleer, K., & Kauffmann, J.-M. (2018). Determination of Three Main Chlorogenic Acids in Water Extracts of Coffee Leaves by Liquid Chromatography Coupled to an Electrochemical Detector. *Antioxidants*, *7*(10). https://doi.org/10.3390/antiox7100143

Roopchand, D. E., Carmody, R. N., Kuhn, P., Moskal, K., Rojas-Silva, P., Turnbaugh, P. J., & Raskin, I. (2015). Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium Akkermansia muciniphila and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome. *Diabetes*, *64*(8), 2847–2858. https://doi.org/10.2337/db14-1916

Rosenfeld, M. E. (1996). *Cellular mechanisms in the development of atherosclerosis*. 11.

Roth, G. A., Johnson, C., Abajobir, A., Abd-Allah, F., Abera, S. F., Abyu, G., Ahmed, M., Aksut, B., Alam, T., Alam, K., Alla, F., Alvis-Guzman, N., Amrock, S., Ansari, H., Ärnlöv, J., Asayesh, H., Atey, T. M., Avila-Burgos, L., Awasthi, A., … Murray, C. (2017). Global, Regional, and

National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *Journal of the American College of Cardiology*, *70*(1), 1–25. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.052
Sale, S., Verschoyle, R. D., Boocock, D., Jones, D. J. L., Wilsher, N., Ruparelia, K. C., Potter, G. A., Farmer, P. B., Steward, W. P., & Gescher, A. J. (2004). Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans 3,4,5,4′-tetramethoxystilbene. *British Journal of Cancer*, *90*(3), 736–744. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601568
Samavati, V., & Manoochehrizade, A. (2013). Dodonaea viscosa var. angustifolia leaf: New source of polysaccharide and its anti-oxidant activity. *Carbohydrate Polymers*, *98*(1), 199–207. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.083
Santhakumar, A. B., Battino, M., & Alvarez-Suarez, J. M. (2018). Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology*, *113*, 49–65. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.022
Saragih, B., Pasiakan, M., Saraheni, S., & David, W. (2014). Effect of herbal drink plants Tiwai (Eleutherine Americana Merr) on lipid profile of hypercholesterolemia patients. *International Food Research Journal*, *Vol.21*(03), 1163–1167. http://www.ifrj.upm.edu.my/volume-21-2014.html
Saucier, C. T., & Waterhouse, A. L. (1999). Synergetic Activity of Catechin and Other Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(11), 4491–4494. https://doi.org/10.1021/jf990352t
Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. 13.
Sen, R., & Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, *46*(5), 705–716. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90346-6
Sengupta, B., & Sengupta, P. K. (2002). The interaction of quercetin with human serum albumin: A fluorescence spectroscopic study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *299*(3), 400–403. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02667-0
Sengupta, B., & Sengupta, P. K. (2003). Binding of quercetin with human serum albumin: A critical spectroscopic study. *Biopolymers*, *72*(6), 427–434. https://doi.org/10.1002/bip.10489
Seo, M.-J., Lee, Y.-J., Hwang, J.-H., Kim, K.-J., & Lee, B.-Y. (2015). The inhibitory effects of quercetin on obesity and obesity-induced inflammation by regulation of MAPK signaling. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *26*(11), 1308–1316. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.06.005
Septembre-Malaterre, A., Stanislas, G., Douraguia, E., & Gonthier, M.-P. (2016). Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Réunion French Island. *Food Chemistry*, *212*, 225–233. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.147
Serino, A., & Salazar, G. (2018). Protective Role of Polyphenols against Vascular Inflammation, Aging and Cardiovascular Disease. *Nutrients*, *11*(1). https://doi.org/10.3390/nu11010053
Shapiro, B. J., Leducq, J.-B., & Mallet, J. (2016). What Is Speciation? *PLoS Genetics*, *12*(3), e1005860. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005860
Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(9), 6425–6440. https://doi.org/10.1002/jcp.26429
Sharma, A. K., Bharti, S., Kumar, R., Krishnamurthy, B., Bhatia, J., Kumari, S., & Arya, D. S. (2012). Syzygium cumini Ameliorates Insulin Resistance and β-Cell Dysfunction via Modulation of PPARγ, Dyslipidemia, Oxidative Stress, and TNF-α in Type 2 Diabetic Rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, *119*(3), 205–213. https://doi.org/10.1254/jphs.11184FP
Sharma, S., Pathak, S., Gupta, G., Sharma, S. K., Singh, L., Sharma, R. K., Mishra, A., & Dua, K. (2017). Pharmacological evaluation of aqueous extract of syzigium cumini for its antihyperglycemic and antidyslipidemic properties in diabetic rats fed a high cholesterol diet—Role of PPARγ and PPARα. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *89*, 447–453. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.048
Shioi, A., & Ikari, Y. (2018). Plaque Calcification During Atherosclerosis Progression and Regression. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, *25*(4), 294–303. https://doi.org/10.5551/jat.RV17020

Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, *82*(2), 291–295. https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024
Singh, U., & Jialal, I. (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, *13*(3), 129–142. https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2006.05.002
Smadja, J., & Marodon, C. (2016). *Plantes médicinales de la Réunion—Tome 1—Editions Orphie*. Orphie. https://www.editions-orphie.com/shop/home/663-plantes-medicinales-de-la-reunion-tome-1-9791029800924.html
Spitaleri, F., Bucci, M., Cesarone, M. R., Clemente, D. D., Sanctis, M. D., Incandela, L., Laurora, G., Iacobitti, P., Nepa, A., Belcaro, G., & Martines, G. (1999). P22 Prevalence of peripheral obliterating arteriopathy disease and its correlation with cardiovascular risk factors: Preliminary data of a prevention study. *Atherosclerosis*, *145*, S17. https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)90168-5
Stalmach, A., Mullen, W., Barron, D., Uchida, K., Yokota, T., Cavin, C., Steiling, H., Williamson, G., & Crozier, A. (2009). Metabolite Profiling of Hydroxycinnamate Derivatives in Plasma and Urine after the Ingestion of Coffee by Humans: Identification of Biomarkers of Coffee Consumption. *Drug Metabolism and Disposition*, *37*(8), 1749–1758. https://doi.org/10.1124/dmd.109.028019
Sugahara, S., Chiyo, A., Fukuoka, K., Ueda, Y., Tokunaga, Y., Nishida, Y., Kinoshita, H., Matsuda, Y., Igoshi, K., Ono, M., & Yasuda, S. (2018). Unique antioxidant effects of herbal leaf tea and stem tea from Moringa oleifera L. especially on superoxide anion radical generation systems. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *82*(11), 1973–1984. https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1495552
Sukhdev Swami, H., Suman Preet Singh, K., Gennaro, L., & Dev Dutt, R. (2008). *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants* (United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology). https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants_0.pdf
Sun, P., Li, K., Wang, T., Ji, J., Wang, Y., Chen, K.-X., Jia, Q., Li, Y.-M., & Wang, H.-Y. (2019). Procyanidin C1, a Component of Cinnamon Extracts, Is a Potential Insulin Sensitizer That Targets Adipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(32), 8839–8846. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02932
Suwalsky, M., F.Villena, & Gallardo, M. J. (2015). In vitro protective effects of resveratrol against oxidative damage in human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1848*(1, Part A), 76–82. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.09.009
Tabas, I. (2005). Consequences and Therapeutic Implications of Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis: The Importance of Lesion Stage and Phagocytic Efficiency. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *25*(11), 2255–2264. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000184783.04864.9f
Tableau de bord des outre-mer. (2018).
Taïlé, J., Arcambal, A., Clerc, P., Gauvin-Bialecki, A., & Gonthier, M.-P. (2020). Medicinal Plant Polyphenols Attenuate Oxidative Stress and Improve Inflammatory and Vasoactive Markers in Cerebral Endothelial Cells during Hyperglycemic Condition. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *9*(7). https://doi.org/10.3390/antiox9070573
Takahashi, K., Takeya, M., & Sakashita, N. (2002). Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Medical Electron Microscopy*, *35*(4), 179–203. https://doi.org/10.1007/s007950200023
Tangirala, R. K., Mahlberg, F. H., Glick, J. M., Jerome, W. G., & Rothblat, G. H. (1993). Lysosomal accumulation of unesterified cholesterol in model macrophage foam cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(13), 9653–9660.
Taniguchi, K., & Karin, M. (2018). NF-κB, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. *Nature Reviews Immunology*, *18*(5), 309–324. https://doi.org/10.1038/nri.2017.142
Tavares, I. M. de C., Lago-Vanzela, E. S., Rebello, L. P. G., Ramos, A. M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Da-Silva, R., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2016). Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (Syzygium cumini (L.) Skeels). *Food Research International*, *82*, 1–13. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.014

Tedesco, I., Russo, M., Russo, P., Iacomino, G., Russo, G. L., Carraturo, A., Faruolo, C., Moio, L., & Palumbo, R. (2000). Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *11*, 114–119. https://doi.org/10.1016/S0955-2863(99)00080-7

Tian, Y., Yang, C., Yao, Q., Qian, L., Liu, J., Xie, X., Ma, W., Nie, X., Lai, B., Xiao, L., & Wang, N. (2019). Procyanidin B2 Activates PPARγ to Induce M2 Polarization in Mouse Macrophages. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1895. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01895

Tizanes et Zerbaz péi. (2016). Réunion la 1ère. https://la1ere.francetvinfo.fr/reunion/emissions-radio/tizanes-et-zerbaz-pei

Torres-Rodríguez, M. L., García-Chávez, E., Berhow, M., & de Mejia, E. G. (2016). Anti-inflammatory and anti-oxidant effect of Calea urticifolia lyophilized aqueous extract on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, *188*, 266–274. https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.057

Tresserra-Rimbau, A., Arranz, S., & Vallverdu-Queralt, A. (2017). New Insights into the Benefits of Polyphenols in Chronic Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 1–2. https://doi.org/10.1155/2017/1432071

Tsimikas, S. (2017). A Test in Context: Lipoprotein(a): Diagnosis, Prognosis, Controversies, and Emerging Therapies. *Journal of the American College of Cardiology*, *69*(6), 692–711. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.11.042

Tso, P., & Balint, J. A. (1986). Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. *The American Journal of Physiology*, *250*(6 Pt 1), G715-726. https://doi.org/10.1152/ajpgi.1986.250.6.G715

Tsuda, T. (2018). Curcumin as a functional food-derived factor: Degradation products, metabolites, bioactivity, and future perspectives. *Food & Function*, *9*(2), 705–714. https://doi.org/10.1039/c7fo01242j

Tune, J. D., Goodwill, A. G., Sassoon, D. J., & Mather, K. J. (2017). Cardiovascular consequences of metabolic syndrome. *Translational Research*, *183*, 57–70. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.01.001

Tuppin, P., Rivière, S., Rigault, A., Tala, S., Drouin, J., Pestel, L., Denis, P., Gastaldi-Ménager, C., Gissot, C., Juillière, Y., & Fagot-Campagna, A. (2016). Prevalence and economic burden of cardiovascular diseases in France in 2013 according to the national health insurance scheme database. *Archives of Cardiovascular Diseases*, *109*(6–7), 399–411. https://doi.org/10.1016/j.acvd.2016.01.011

Ulla, A., Alam, M. A., Sikder, B., Sumi, F. A., Rahman, M. M., Habib, Z. F., Mohammed, M. K., Subhan, N., Hossain, H., & Reza, H. M. (2017). Supplementation of Syzygium cumini seed powder prevented obesity, glucose intolerance, hyperlipidemia and oxidative stress in high carbohydrate high fat diet induced obese rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *17*(1). https://doi.org/10.1186/s12906-017-1799-8

Upadya, H., Prabhu, S., Prasad, A., Subramanian, D., Gupta, S., & Goel, A. (2019). A randomized, double blind, placebo controlled, multicenter clinical trial to assess the efficacy and safety of Emblica officinalis extract in patients with dyslipidemia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *19*(1), 27. https://doi.org/10.1186/s12906-019-2430-y

Urrutia, M., Schwab, W., Hoffmann, T., & Monfort, A. (2016). Genetic dissection of the (poly)phenol profile of diploid strawberry (Fragaria vesca) fruits using a NIL collection. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, *242*, 151–168. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.07.019

Varona, J. F., Ortiz-Regalón, R., Sánchez-Vera, I., López-Melgar, B., García-Durango, C., Castellano Vázquez, J. M., Solís, J., Fernández-Friera, L., & Vidal-Vanaclocha, F. (2019). Soluble ICAM 1 and VCAM 1 Blood Levels Alert on Subclinical Atherosclerosis in Non Smokers with Asymptomatic Metabolic Syndrome. *Archives of Medical Research*, *50*(2), 20–28. https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2019.05.003

Veerapur, V. P., Prabhakar, K. R., Kandadi, M. R., Srinivasan, K. K., & Unnikrishnan, M. K. (2010). Antidiabetic effect of Dodonaea viscosa aerial parts in high fat diet and low dose streptozotocin-induced type 2 diabetic rats: A mechanistic approach. *Pharmaceutical Biology*, *48*(10), 1137–1148. https://doi.org/10.3109/13880200903527736

Veeren, B., Ghaddar, B., Bringart, M., Khazaal, S., Gonthier, M.-P., Meilhac, O., Diotel, N., &

Bascands, J.-L. (2020). Phenolic Profile of Herbal Infusion and Polyphenol-Rich Extract from Leaves of the Medicinal Plant Antirhea borbonica: Toxicity Assay Determination in Zebrafish Embryos and Larvae. *Molecules*, *25*(19), 4482. https://doi.org/10.3390/molecules25194482

Veggi, P. C., Martinez, J., & Meireles, M. A. A. (2012). Fundamentals of Microwave Extraction. In F. Chemat & G. Cravotto (Eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds* (pp. 15–52). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4830-3_2

VERGES, B. (2008). Risque cardio-vasculaire et dyslipidémies. */data/revues/00034266/00590004/335/*. https://www.em-consulte.com/en/article/74951

Vetrani, C., Rivellese, A. A., Annuzzi, G., Adiels, M., Borén, J., Mattila, I., Orešič, M., & Aura, A.-M. (2016). Metabolic transformations of dietary polyphenols: Comparison between in vitro colonic and hepatic models and in vivo urinary metabolites. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *33*, 111–118. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.03.007

Vincent, H. K., Innes, K. E., & Vincent, K. R. (2007). Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *9*(6), 813–839. https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2007.00692.x

Vindis, C. (2015). Autophagy: An emerging therapeutic target in vascular diseases. *British Journal of Pharmacology*, *172*(9), 2167. https://doi.org/10.1111/bph.13052

Virchow, R. (1860). *Cellular Pathology as based upon physiological and pathological histology. Twenty lectures delivered in ... 1858. Translated from the second edition of the original by F. Chance. With notes and numerous emendations principally from MS. notes of the author, and illustrated by ... Engravings on wood.*

Vogiatzi, G., Tousoulis, D., & Stefanadis, C. (2008). *The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis*. 8.

Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, *3*(1), 2–20. https://doi.org/10.1093/mp/ssp106

Walgren, R. A., Lin, J. T., Kinne, R. K., & Walle, T. (2000). Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *294*(3), 837–843.

Walgren, Richard A., Karnaky, K. J., Lindenmayer, G. E., & Walle, T. (2000). Efflux of Dietary Flavonoid Quercetin 4′-β-Glucoside across Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers by Apical Multidrug Resistance-Associated Protein-2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *294*(3), 830–836. http://jpet.aspetjournals.org/content/294/3/830

Wang, L., Sun, R., Zhang, Q., Luo, Q., Zeng, S., Li, X., Gong, X., Li, Y., Lu, L., Hu, M., & Liu, Z. (2019). An update on polyphenol disposition via coupled metabolic pathways. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *15*(2), 151–165. https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1559815

Wang, S., Zhang, X., Liu, M., Luan, H., Ji, Y., Guo, P., & Wu, C. (2015a). Chrysin inhibits foam cell formation through promoting cholesterol efflux from RAW264.7 macrophages. *Pharmaceutical Biology*. https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/13880209.2014.986688

Wang, S., Zhang, X., Liu, M., Luan, H., Ji, Y., Guo, P., & Wu, C. (2015b). Chrysin inhibits foam cell formation through promoting cholesterol efflux from RAW264.7 macrophages. *Pharmaceutical Biology*, *53*(10), 1481–1487. https://doi.org/10.3109/13880209.2014.986688

Weaver, L. M., & Herrmann, K. M. (1997). Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science*, *2*(9), 346–351. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)84622-5

Williamson, G., & Clifford, M. N. (2017). Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, *139*, 24–39. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.012

Woo, C. S. J., Lau, J. S. H., & El-Nezami, H. (2012). Chapter 10 - Herbal Medicine: Toxicity and Recent Trends in Assessing Their Potential Toxic Effects. In L.-F. Shyur & A. S. Y. Lau (Eds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 62, pp. 365–384). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394591-4.00009-X

Wu, C.-H., Ou, T.-T., Chang, C.-H., Chang, X.-Z., Yang, M.-Y., & Wang, C.-J. (2014). The Polyphenol Extract from *Sechium edule* Shoots Inhibits Lipogenesis and Stimulates Lipolysis via Activation of AMPK Signals in HepG2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(3), 750–759. https://doi.org/10.1021/jf404611a

Xie, L., Lee, S. G., Vance, T. M., Wang, Y., Kim, B., Lee, J.-Y., Chun, O. K., & Bolling, B. W.

(2016). Bioavailability of anthocyanins and colonic polyphenol metabolites following consumption of aronia berry extract. *Food Chemistry*, *211*, 860–868. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.122

Xu, S., Huang, Y., Xie, Y., Lan, T., Le, K., Chen, J., Chen, S., Gao, S., Xu, X., Shen, X., Huang, H., & Liu, P. (2010). Evaluation of foam cell formation in cultured macrophages: An improved method with Oil Red O staining and DiI-oxLDL uptake. *Cytotechnology*, *62*(5), 473–481. https://doi.org/10.1007/s10616-010-9290-0

Xu, X., Yuan, X., Li, N., Dewey, W. L., Li, P.-L., & Zhang, F. (2016). Lysosomal cholesterol accumulation in macrophages leading to coronary atherosclerosis in CD38(-/-) mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *20*(6), 1001–1013. https://doi.org/10.1111/jcmm.12788

Yancey, P. G., & St Clair, R. W. (1992). Cholesterol efflux is defective in macrophages from atherosclerosis-susceptible White Carneau pigeons relative to resistant show racer pigeons. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*, *12*(11), 1291–1304. https://doi.org/10.1161/01.atv.12.11.1291

Yang, J., Leng, J., Li, J.-J., Tang, J., Li, Y., Liu, B.-L., & Wen, X.-D. (2016). Corosolic acid inhibits adipose tissue inflammation and ameliorates insulin resistance via AMPK activation in high-fat fed mice. *Phytomedicine*, *23*(2), 181–190. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.12.018

Yang, M.-Y., Huang, C.-N., Chan, K.-C., Yang, Y.-S., Peng, C.-H., & Wang, C.-J. (2011). Mulberry Leaf Polyphenols Possess Antiatherogenesis Effect via Inhibiting LDL Oxidation and Foam Cell Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(5), 1985–1995. https://doi.org/10.1021/jf103661v

Yang, Y., Li, X., Peng, L., An, L., Sun, N., Hu, X., Zhou, P., Xu, Y., Li, P., & Chen, J. (2018). Tanshindiol C inhibits oxidized low-density lipoprotein induced macrophage foam cell formation via a peroxiredoxin 1 dependent pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1864*(3), 882–890. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.12.033

Yoshida, H., & Kisugi, R. (2010a). Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta*, *411*(23), 1875–1882. https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.038

Yoshida, H., & Kisugi, R. (2010b). Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta*, *411*(23–24), 1875–1882. https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.038

Yoshida, K., Cheynier, V., & Quideau, S. (2017). *Recent Advances in Polyphenol Research*. John Wiley & Sons.

Yusuf, S., Islam, S., Chow, C. K., Rangarajan, S., Dagenais, G., Diaz, R., Gupta, R., Kelishadi, R., Iqbal, R., Avezum, A., Kruger, A., Kutty, R., Lanas, F., Lisheng, L., Wei, L., Lopez-Jaramillo, P., Oguz, A., Rahman, O., Swidan, H., … Teo, K. K. (2011). Use of secondary prevention drugs for cardiovascular disease in the community in high-income, middle-income, and low-income countries (the PURE Study): A prospective epidemiological survey. *The Lancet*, *378*(9798), 1231–1243. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61215-4

***Zerbaz Péi—Exemple**: Zanbavil*. (2015, April 7). https://www.youtube.com/watch?v=u2RQAU1a0Qc

Zhang, Heng, Zhai, Z., Zhou, H., Li, Y., Li, X., Lin, Y., Li, W., Shi, Y., & Zhou, M.-S. (2015). Puerarin Inhibits oxLDL-Induced Macrophage Activation and Foam Cell Formation in Human THP1 Macrophage. *BioMed Research International*, *2015*, 403616. https://doi.org/10.1155/2015/403616

Zhang, Hua, & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, *8*, 33–42. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002

Zhang, T.-T., Zheng, C.-Y., Hu, T., Jiang, J.-G., Zhao, J.-W., & Zhu, W. (2017). Polyphenols from Ilex latifolia Thunb. (A Chinese bitter tea) exert anti-atherosclerotic activity through suppressing NF-κB activation and phosphorylation of ERK1/2 in macrophages. *MedChemComm*, *9*(2), 254–263. https://doi.org/10.1039/c7md00477j

Zhang, Y., Yang, X., Bian, F., Wu, P., Xing, S., Xu, G., Li, W., Chi, J., Ouyang, C., Zheng, T., Wu, D., Zhang, Y., Li, Y., & Jin, S. (2014). TNF-α promotes early atherosclerosis by increasing transcytosis of LDL across endothelial cells: Crosstalk between NF-κB and PPAR-γ. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *72*, 85–94. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.02.012

Zhao, J.-F., Ching, L.-C., Huang, Y.-C., Chen, C.-Y., Chiang, A.-N., Kou, Y. R., Shyue, S.-K., &

Lee, T.-S. (2012). Molecular mechanism of curcumin on the suppression of cholesterol accumulation in macrophage foam cells and atherosclerosis. *Molecular Nutrition & Food Research*, *56*(5), 691–701. https://doi.org/10.1002/mnfr.201100735

Zhao, S., Li, J., Wang, L., & Wu, X. (2016). Pomegranate peel polyphenols inhibit lipid accumulation and enhance cholesterol efflux in raw264.7 macrophages. *Food & Function*, *7*(7), 3201–3210. https://doi.org/10.1039/c6fo00347h

Zheng, X.-X., Xu, Y.-L., Li, S.-H., Liu, X.-X., Hui, R., & Huang, X.-H. (2011). Green tea intake lowers fasting serum total and LDL cholesterol in adults: A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *94*(2), 601–610. https://doi.org/10.3945/ajcn.110.010926

Zhong, Y., Feng, J., Fan, Z., & Li, J. (2018). Curcumin increases cholesterol efflux via heme oxygenase-1-mediated ABCA1 and SR-BI expression in macrophages. *Molecular Medicine Reports*, *17*(4), 6138–6143. https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8577

Zou, Y., Lu, Y., & Wei, D. (2005). Hypocholesterolemic effects of a flavonoid-rich extract of Hypericum perforatum L. in rats fed a cholesterol-rich diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(7), 2462–2466. https://doi.org/10.1021/jf048469r