



**HAL**  
open science

# Potentiel néphroprotecteur des molécules issues de la biodiversité végétale réunionnaise : focus sur *Antirhea borbonica*

Bryan Veeren

► **To cite this version:**

Bryan Veeren. Potentiel néphroprotecteur des molécules issues de la biodiversité végétale réunionnaise : focus sur *Antirhea borbonica*. Biologie végétale. Université de la Réunion, 2021. Français. NNT : 2021LARE0025 . tel-03401641

**HAL Id: tel-03401641**

**<https://theses.hal.science/tel-03401641>**

Submitted on 25 Oct 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

*Présentée en vue de l'obtention du grade de*  
**Docteur de l'Université de La Réunion**

*Ecole doctorale Science,*  
**Science, Technologies et Santé**

*Discipline*  
**Biologie, Santé, Biochimie**

*Unité de Recherche*  
**INSERM UMR1188 Diabète athérombose thérapies Réunion Océan Indien**

---

## **Potentiel néphroprotecteur des molécules issues de la biodiversité végétale réunionnaise : focus sur *Antirhea borbonica***

---

*Présentée et soutenue publiquement le 03/06/2021 par*

**Bryan VEEREN**

### **Jury**

**MCU-HDR Colette DENIS**  
**Pr Christophe HIRTZ**  
**Pr Marie-Paule GONTHIER**  
**Dr Jean-Loup BASCANDS**

Université Paul Sabatier  
Université de Montpellier  
Université de La Réunion  
INSERM UMR1188

**Rapportrice**  
**Rapporteur**  
**Examinatrice**  
**Directeur de thèse**



*A ma femme, ma fille, mes parents et  
mes grands-parents*





## ***REMERCIEMENTS***

Je tiens tout d'abord à vous remercier, membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse malgré la situation sanitaire. Je remercie la Maitre de conférences Colette DENIS et le Professeur Christophe HIRTZ, de me faire l'honneur d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je souhaite remercier la Professeure Marie-Paule GONTHIER d'avoir accepté d'être l'examinatrice de ma thèse.

Je souhaite témoigner ma profonde gratitude, mon respect et ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Mr renal fibrosis, le Dr. Jean-Loup BASCANDS. En effet, sans toi cette aventure n'aurait été possible. Une aventure qui a débuté à Toulouse lors de ma recherche de stage de master 2. Lors de notre entretien tu m'as fait part que tu partais pour l'île de La Réunion. Étant originaire de La Réunion, je ne pouvais ignorer ce signe du destin. *In fine*, j'ai bien fait de le suivre. Durant ce stage, tu m'as formé et tout fait pour que je puisse donner le meilleur de moi-même. A la suite de cela, tu m'as donnée une opportunité en « or » celle de réaliser cette thèse. La vraie aventure a débuté à ce moment-là. Une aventure durant laquelle j'ai pu m'épanouir professionnellement dans le domaine de la recherche mais aussi personnellement. Je t'en remercie Jean-Loup. Je souhaite également te remercier pour ton soutien, ta confiance, d'avoir été là quand j'en avais besoin et surtout de m'avoir permis de présenter nos travaux lors d'un congrès international.

J'aimerais remercier Mr Olivier MEILHAC, directeur du laboratoire DÉTROU de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Une équipe dont je fais partie intégralement. Je te remercie de m'avoir permis de relever des challenges, de m'avoir permis de me surpasser tant sur terre que dans l'eau. Et bien évidemment un « Grand » merci de m'avoir laissé m'épanouir dans le domaine de la spectrométrie de masse durant ces dernières années ainsi que pour les années à venir.

Je souhaite remercier le Pr. Marie-Paule GONTHIER de m'avoir transmis à moi et à la nutritéam sa passion pour les polyphénols. Je te remercie pour tous les conseils et les connaissances que tu as pu me transmettre au cours de ces dernières années.

Je remercie toute l'équipe technique Groot, Philippe, Jessica, Cynthia ainsi qu'une espèce indigène de Toulouse unique à la Réunion « Le Bringus ». Je vous remercie tous pour votre soutien, votre aide technique qui a été précieuse et qui a permis de faire la différence durant cette thèse.

Je tiens à remercier Mr Danio rerio connu sous le nom vernaculaire de « ToukTouk », de m'avoir encouragé, de m'avoir conseillé et d'avoir corrigé et relu « n fois » nos papiers.

Je remercie tous les autres membres du laboratoire, Christine, Christian, Steeve (« prépare tapis ma tante »), et Manu à fond la forme.

Je remercie mes collègues doctorants, docteurs, nouveaux docteurs pour leurs dynamismes, pour les repas partagés et nos échanges scientifiques. En particulier, les angéliques, Valenting, Kéving, Brice, Anthony, Jonathan, Janice, Sébastien, Guillaume, Ludo (Jésus), Jade, Sarah, Chloé, Batoul, Ali, Sandhya, Jason, Axel et les deux derniers de 2m 10 de hauteurs, Flo et Julien. Je tiens à remercier plus particulièrement le docteur Ramin Mangata Stéphane que j'ai rencontré au cours de mon stage de master 2, avec qui je me suis tout de suite très bien entendu. Une personne en or qui a toujours été là, qui m'a épaulé, soutenu, conseillé comme le ferai un frère. Merci Ti Pi.. pour tous ces moments de joies, d'inquiétudes qu'on a passé avec toi et Éloïse. En espérant se retrouver autour d'un petit karaoké un de ces jours.

Je ne peux oublier de remercier les collègues du CYROI, Imade pour sa bonne humeur, Fanny, Séb, Laura, Céline, Giovedie, Johnny, Eric, Michèle, les femmes de ménages, Vinceng pour toutes nos discussions autour de la masse, les pannes de chaines HPLC, de poissons. Sans oublier Jimmy et Jean-Patrick qui m'ont permis d'utiliser leurs triples quads.

Je tiens à remercier sincèrement les membres de mon comité de thèse, les Docteurs Philippe RONDEAU, Wildriss VIRANAICKEN, Gilles GADEA et le Professeur Gilles LAMBERT qui ont su me conseiller, me soutenir et me faire confiance tout au long de cette thèse.

Je tiens à remercier toute l'équipe enseignante du parcours biochimie & biotechnologie de l'université Paul Sabatier pour leurs enseignements et leurs formations de qualités qui m'ont permis d'amener à bien cette thèse.

Pour clore ces remerciements, je souhaite remercier mon épouse qui m'a toujours soutenu, encouragé ces 9 dernières années. Merci chérie.

Papa, maman, merci de m'avoir aidé, de m'avoir soutenu dans tout ce que j'ai pu entreprendre. Sans ces trois personnes je ne serais pas arrivé là où je suis aujourd'hui. Je vous en serais éternellement reconnaissant et serais toujours là pour vous quoiqu'il arrive.

Et enfin, je souhaite remercier mon petit bébé (SuperBabyGirl) qui a su me donner de l'énergie lors de la rédaction de ce manuscrit.



## RESUME

Si la sensibilisation du grand public sur les pathologies cardiovasculaires, l'obésité, le diabète, le cancer, le sida peut être actuellement considérée comme acquise, la maladie rénale chronique reste encore une épidémie « silencieuse ». La plupart des pathologies rénales dites progressives aboutissent progressivement à la perte de la fonction rénale. Il est maintenant bien admis que la perte de la fonction rénale est corrélée avec l'existence d'une fibrose tubulointerstitielle aboutissant à l'insuffisance rénale terminale (IRT). Cette fibrose est caractérisée essentiellement par une accumulation des protéines de la matrice extracellulaire dans le compartiment tubulointerstitiel. Si depuis plusieurs décennies les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les antagonistes du récepteur AT1 de l'angiotensine II sont les seuls médicaments utilisés en clinique capables d'améliorer la fonction rénale, la maladie rénale chronique continue malgré tout de progresser vers l'IRT. Dans ce contexte, le défi pour les néphrologues et les chercheurs du domaine est de ralentir, d'arrêter et si possible de reverser cette progression vers l'IRT. La recherche de traitements efficaces est d'une importance capitale. Ainsi, l'inscription à la pharmacopée française de plantes médicinales de la Réunion aux propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes suggère que certaines d'entre elles pourraient être intéressantes d'un point de vue thérapeutique dans la fibrose tubulo-interstitielle (FTI). L'objectif principal de mon travail de thèse a été d'évaluer les effets néphroprotecteurs (antioxydant, anti-inflammatoire et anti-fibrosant) des polyphénols présents dans la plante médicinale *Antirhea borbonica* (*A. borbonica*) sur la FTI. Nous avons dans un premier temps procéder à la caractérisation et à une analyse quantitative de la composition en polyphénols des extraits d'*A. borbonica* par l'utilisation de la spectrométrie de masse. Nos analyses ont montré que ces extraits étaient riches en acides phénoliques et en flavonoïdes. De plus, des tests de toxicité réalisés sur le modèle poisson zèbre ont révélé une non toxicité de ces extraits à la dose recommandée en médecine traditionnelle. Grâce à l'utilisation d'un modèle accéléré de fibrose tubulointerstitielle murin, nos travaux ont montré que l'extrait enrichi en polyphénols exercé un effet préventif et curatif sur la FTI. Ces effets se traduisent par la réduction des 3 phases du processus de fibrose : i) l'infiltration macrophagique, ii) l'apparition des myofibroblastes et iii) l'accumulation de la matrice extra cellulaire. Des analyses d'imagerie par spectrométrie de masse (DESI-IMS) ont permis de mettre en évidence la distribution spatiale de l'acide caféique au niveau de la zone corticale du rein. L'ensemble des résultats de mes travaux de thèse indiquent le potentiel anti-fibrosant d'un extrait enrichi en polyphénols de la plante médicinale *A. borbonica*. Les preuves de concept utilisées dans cette thèse permettront d'évaluer le potentiel effet néphroprotecteur des autres plantes médicinales inscrites à la pharmacopée française.

**Mots-clés :** *Fibrose rénale, plante médicinale, polyphénols, HPLC-MS/MS, imagerie par spectrométrie de masse*

## ABSTRACT

Regardless of the initial insult, the progression of most forms of chronic renal disease (CKD) results in tubulointerstitial fibrosis. It is now well admitted that the progression of fibrosis in CKD is closely correlated to the progressive loss of renal function leading to end stage renal disease (ESRD). Interstitial fibrosis is characterized by the progressive accumulation of extracellular matrix (ECM) proteins in the tubulointerstitial compartment. Since decade, in humans, blockade of the renin-angiotensin system with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin type I receptor antagonists remains the only effective therapy to slow down the progression toward ESRD. Therefore, the challenge for nephrologists and scientists is to discover alternative molecules or therapies to slow down, stop and if possible, reverse the progression of renal fibrosis towards ESRD. In Reunion Island, since 2012, 27 medicinal plants have been registered at the French pharmacopeia. Most of them are known for their antioxidant and anti-inflammatory activities related mostly to their polyphenols content suggesting putative antifibrotic effect. The main objective of the present study was to evaluate the hypothetical nephroprotective effects (antioxidant, anti-inflammatory and anti-fibrotic) of polyphenols of the medicinal plant *Antirhea borbonica* (*A.borbonica*).

In a first set of experiments, by using selective liquid chromatography–tandem mass spectrometry, we performed polyphenol identification and quantification from *A.borbonica* leaves. Our data show high phenolic acids and flavonoids concentrations. In addition, we performed a zebrafish embryo acute toxicity showing the non-toxicity of the doses used in traditional medicine. In a second set of experiments by using an accelerated mouse model of renal tubulointerstitial fibrosis we provided evidences that the oral administration of a polyphenol-rich extract of *A.borbonica* induced a preventive as well as curative effect on the progression of renal tubulointerstitial fibrosis. These nephroprotective effects go through the reduction in the three phases of the fibrotic process: (i) macrophage infiltration, (ii) myofibroblast appearance and (iii) extracellular matrix accumulation. Furthermore, by using desorption electrospray ionization-high resolution/mass spectrometry (DESI-HR/MS) imaging were able to visualize, for the first time, CA in the kidney cortex. Taken together our results show the therapeutic antifibrotic potential of polyphenol-rich extract of *A.borbonica*. Our scientific approach could be used as an example to study the nephroprotective effects of other medicinal plants registered at the French pharmacopeia.

**Key words :** *Kidney fibrosis, medicinal plant, polyphenols, HPLC-MS/MS, imaging mass spectrometry*

# Tables des matières

<b>LISTES DES FIGURES.....</b>	<b>1</b>
<b>LISTES DES TABLEAUX .....</b>	<b>3</b>
<b>PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>8</b>
<b>CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>10</b>
<b>I. ANATOMIE .....</b>	<b>12</b>
I.1 GENERALITES .....	12
I.2 LES REINS D'UN POINT DE VUE MACROSCOPIQUE.....	13
I.3 LES REINS D'UN POINT DE VUE MICROSCOPIQUE.....	14
I.3.1 <i>Le néphron : une unité structurale et fonctionnelle</i> .....	14
I.3.2 <i>Le corpuscule rénal (ou corpuscule de Malpighi)</i> .....	15
I.3.3 <i>Le tubule</i> .....	16
I.3.4 <i>L'appareil juxtaglomérulaire</i> .....	17
I.3.5 <i>L'espace interstitiel (Interstitium)</i> .....	18
I.4 ROLES PHYSIOLOGIQUES DU REIN.....	18
I.4.1 <i>Filtration glomérulaire &amp; formation de l'urine</i> .....	18
I.4.2 <i>Fonction endocrine</i> .....	21
I.4.2.1 <i>Le système Rénine-Angiotensine-aldostérone (SRAA)</i> .....	21
I.4.2.2 <i>L'érythropoïétine</i> .....	23
I.4.2.3 <i>Métabolisation du précurseur de la vitamine D</i> .....	23
<b>II. LA MALADIE RENALE .....</b>	<b>25</b>
II.1 GENERALITES .....	25
II.2 DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES.....	25
II.2.1 <i>A l'échelle mondiale</i> .....	25
II.2.2 <i>A l'échelle de la France et de La Réunion</i> .....	26
II.3 DIAGNOSTIC DE LA MALADIE RENALE CHRONIQUE.....	26
II.3.1 <i>L'estimation du débit de filtration glomérulaire</i> .....	28
II.3.2 <i>La mesure du débit de filtration glomérulaire</i> .....	29
II.3.3 <i>Diagnostic de l'atteinte tissulaire du rein : les marqueurs d'atteintes rénales</i> .....	30
II.4 LES ATTEINTES RENALES .....	31
II.4.1 <i>La néphropathie vasculaire due à l'hypertension</i> .....	31
II.4.2 <i>Les néphropathies diabétiques</i> .....	31
II.4.3 <i>Les néphropathies glomérulaires (glomérulonéphrites)</i> .....	32
II.4.4 <i>Les néphropathies tubulointerstitielles chroniques</i> .....	33
II.4.5 <i>Les néphropathies toxiques</i> .....	34
<b>III. LA FIBROSE TUBULOINTERSTITIELLE .....</b>	<b>35</b>
III.1 GENERALITES .....	35
III.2 LES ETAPES DE LA FIBROSE TUBULOINTERSTITIELLE .....	38
III.2.1 <i>L'inflammation</i> .....	39
III.2.1.1 <i>Les leucocytes</i> .....	41
III.2.2 <i>Stress oxydant</i> .....	48
III.2.2.1 <i>Les espèces pro-oxydantes</i> .....	48
III.2.2.2 <i>La défense antioxydante</i> .....	52
III.2.3 <i>Les Myofibroblastes</i> .....	55
III.2.3.1 <i>Une cellule, plusieurs origines</i> .....	55
III.2.4 <i>Accumulation de la matrice extracellulaire</i> .....	64



III.2.5 TGF $\beta$ 1 : le médiateur clé de la fibrose tubulo-interstielle .....	66
<b>IV. LES APPROCHES THERAPEUTIQUES .....</b>	<b>71</b>
IV.1 LES CIBLES .....	71
IV.1.1 L'INFLAMMATION .....	71
IV.1.2 L'APPARITION DES MYOFIBROBLASTES .....	72
IV.1.2.1 Inhibition de la cytokine pro-fibrosante TGF- $\beta$ .....	73
IV.1.2.2 Inhibition de récepteurs à tyrosine kinase .....	74
IV.1.3 L'ACCUMULATION DE LA MATRICE EXTRA CELLULAIRE .....	74
IV.1.3.1 Inhibition de la lysyl oxidase .....	74
IV.1.4 BLOCAGE DU SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE .....	75
IV.1.5 LE STRESS OXYDANT .....	75
IV.1.5.1 Les polyphénols .....	76
IV.1.5.2 Les plantes médicinales de la Réunion : riche en polyphénols .....	85
<b>OBJECTIF DE THESE .....</b>	<b>88</b>
<b>TRAVAUX PERSONNELS .....</b>	<b>92</b>
ARTICLE 1 : PROFIL PHENOLIQUE D'UNE INFUSION ET D'UN EXTRAIT ENRICHI EN POLYPHENOLS PREPARES A PARTIR DE FEUILLES DE LA PLANTE MEDICINALE <i>ANTIRHEA BORBONICA</i> : DETERMINATION DE LA TOXICITE CHEZ LES EMBRYONS ET LES LARVES DE POISSON ZEBRE. 94	
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>97</b>
<b>2. RESULTS .....</b>	<b>98</b>
2.1. DETERMINATION OF TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC / FLAVONOID CONTENTS AQUEOUS AND ACETONIC EXTRACTS. 98	
2.2. CHARACTERIZATION OF POLYPHENOLS FROM <i>ANTIRHEA BORBONICA</i> ACETONIC EXTRACT .....	99
2.2.1. Phenolic acids quantification by UHPLC-ESI-MS .....	104
2.3. ZEBRAFISH EMBRYO AND LARVAE ACUTE TOXICITY TEST. ....	105
2.3.1. Survival and lethality curves on zebrafish embryos .....	105
<b>3. DISCUSSION .....</b>	<b>110</b>
POLYPHENOL CONTENT OF AQUEOUS AND ACETONIC EXTRACTS .....	110
AQUEOUS AND ACETONIC EXTRACTS OF <i>ANTIRHEA BORBONICA</i> EXHIBIT DEVELOPMENTAL AND TOXICITY AT HIGH CONCENTRATIONS..	111
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>112</b>
<b>4. MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>112</b>
4.1. REAGENTS/STANDARDS .....	112
4.2. PLANT MATERIAL .....	112
4.3. PREPARATION OF THE PLANT EXTRACTS .....	112
4.4. MEASUREMENT OF THE TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY OF POLYPHENOL-RICH PLANT EXTRACTS .....	112
4.5. DETERMINATION OF PHENOLIC ACID CONTENT .....	113
4.6. DETERMINATION OF FLAVONOID CONTENT .....	113
4.7. POLYPHENOLIC COMPOUNDS IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION BY LC-UV-ESI-MS/MS .....	113
4.7.1. PREPARATION OF STANDARD SOLUTION, CALIBRATION CURVES AND METHOD VALIDATION .....	114
4.8. ZEBRAFISH HUSBANDRY .....	114
4.9. DEVELOPMENTAL TOXICITY TEST (ZEBRAFISH EMBRYOS) .....	114
4.10. STATISTICAL ANALYSES .....	115
<b>DISCUSSION &amp; PERSPECTIVES (PUBLICATION 1) .....</b>	<b>126</b>
ARTICLE 2 : L'ACIDE CAFEIQUE, UN DES ACIDES PHENOLIQUES MAJORITAIRES DE LA PLANTE MEDICINALE <i>ANTIRHEA BORBONICA</i> , REDUIT LA FIBROSE TUBULOINTERSTITIELLE RENALE .....	129
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>130</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>132</b>
2.1. CHEMICALS AND REAGENTS .....	132
2.2. PLANT MATERIAL .....	132

2.3. NEPHROTOXIC COMPOUNDS IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF POLYPHENOLS BY UPLC-UV-ESI-MS/MS.....	132
2.4. DESORPTION ELECTROSPRAY IONIZATION-HIGH RESOLUTION/MASS SPECTROMETRY (DESI-HR/MS) IMAGING .....	133
2.5. ANIMAL MODEL: UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION (UUO)—BIODISTRIBUTION AND PHARMACOKINETIC STUDIES.....	133
2.6. DETERMINATION OF PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENTS—MEASUREMENT OF THE TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY OF POLYPHENOL-RICH PLANT EXTRACT ADMINISTERED ORALLY.....	134
2.7. IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND HISTOLOGICAL ANALYSIS .....	134
2.8. RT-QPCR .....	134
2.9. PROTEIN ISOLATION FROM KIDNEY TISSUE, ANTIOXIDANT ACTIVITIES (Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, GPX, CAT) AND PROTEIN CARBONYLATION.....	136
2.10. STATISTICS .....	136
<b>3. RESULTS .....</b>	<b>136</b>
3.1. DETECTION AND IDENTIFICATION OF NEPHROTOXIC COMPONENTS.....	136
3.2. PHENOLIC/FLAVONOID CONTENTS AND TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ORALLY ADMINISTERED POLYPHENOL-RICH EXTRACT FROM A. BORBONICA. ....	137
3.3. PREVENTIVE EXPERIMENT: EFFECTS OF POLYPHENOL-RICH EXTRACT FROM A. BORBONICA ON BODY AND KIDNEY WEIGHT AND DIURESIS IN A UUO MODEL .....	137
3.4. PREVENTIVE EFFECT OF POLYPHENOL-RICH EXTRACT FROM A. BORBONICA IN UUO-INDUCED TUBULOINTERSTITIAL FIBROSIS..	138
3.5. CURATIVE EFFECT OF POLYPHENOL-RICH EXTRACT FROM A. BORBONICA IN UUO-INDUCED TUBULOINTERSTITIAL FIBROSIS.....	139
3.6. BIODISTRIBUTION OF CAFFEIC ACID AND ITS METABOLITE 24 HOURS AFTER ADMINISTRATION OF A. BORBONICA POLYPHENOL- RICH EXTRACT (25 MG/KG) IN MICE KIDNEY, LIVER AND URINE .....	141
3.7. CAFFEIC ACID (CA) ADMINISTRATION MIMICS A. BORBONICA EXTRACT’S NEPHROPROTECTIVE EFFECTS .....	142
3.8. PLASMA AND KIDNEY PHARMACOKINETIC OF CAFFEIC ACID .....	143
3.9. VISUALIZATION OF ORALLY ADMINISTERED CAFFEIC ACID (CA) IN THE OBSTRUCTED KIDNEY.....	145
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>146</b>
<b>5. CONCLUSIONS .....</b>	<b>147</b>
<b>DISCUSSION &amp; PERSPECTIVES (PUBLICATION 2) .....</b>	<b>153</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>157</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>173</b>

## Listes des figures

**Figure 1 :** L'appareil urinaire

**Figure 2 :** Coupe frontale et anatomie rénale

**Figure 3 :** Structure d'un néphron

**Figure 4 :** Le corpuscule rénale

**Figure 5 :** La barrière de filtration glomérulaire

**Figure 6 :** Le système rénine-angiotensine-aldostérone

**Figure 7 :** Schéma du métabolisme de la vitamine D3

**Figure 8 :** La fibrose, un processus partagé par le foie, les reins, le cœur, les poumons et la peau

**Figure 9 :** Relation entre la fonction rénale et la fibrose tubulointerstitielle

**Figure 10 :** Étapes de recrutement leucocytaire (monocyte) dans l'interstitium

**Figure 11 :** Maturation des macrophages

**Figure 12 :** Corrélation entre les macrophages interstitiels et dommages chroniques

**Figure 13 :** Les acteurs cellulaires de l'inflammation stérile médiée lors de la fibrose tubulointerstitielle.

**Figure 14 :** Régulation des espèces réactives à l'oxygène et leurs effets

**Figure 15 :** Réactions de Fenton et d'Haber-Weiss

**Figure 16 :** Voie de signalisation Nrf2-Keap1

**Figure 17 :** Les origines du myofibroblaste

**Figure 18 :** Étapes de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes

**Figure 19 :** Représentation graphique des abondances relatives de l'E-cadhérine et de l' $\alpha$ -SMA après traitement au TGF- $\beta$ 1 des cellules épithéliales rénales.

**Figure 20 :** Micrographies représentatives montrant les modifications du profil d'expression protéique de la E-cadhérine et de l' $\alpha$ -SMA après OUU.

**Figure 21 :** Mise en évidence de la transition macrophage-myofibroblaste dans la FTI.

**Figure 22 :** TGF $\beta$  et ses rôles dans la maladie rénale chronique

**Figure 23 :** Dégradation des protéines de la MEC par le système fibrinolytique et métalloprotéinases

**Figure 24 :** Le TGF- $\beta$ , voie de signalisation classique par les Smads et les voies de signalisation « non-Smad »

**Figure 25 :** Structure des acides phénoliques

**Figure 26 :** Structure des flavonoïdes

**Figure 27 :** Structure du resvératrol

**Figure 28 :** Structure du secoisolariciresinol

**Figure 29 :** Biodisponibilité

**Figure 30 :** Absorption et métabolisme des polyphénols issus de l'alimentation

**Figure 31 :** Les 27 plantes médicinales de La Réunion inscrites à la pharmacopée française

## Listes des tableaux

**Tableau 1 :** Composition de l'urine

**Tableau 2 :** Pronostic de la MRC grâce à la stratification du débit de filtration glomérulaire et de l'albuminurie

**Tableau 3 :** Marqueurs du stress oxydant

**Tableau 4 :** Caractéristiques et marqueurs des cellules interstitielles du rein

**Tableau 5 :** Les polyphénols ayant des effets néphroprotecteurs dans le cadre de la MRC

## Productions scientifiques

### Publications scientifiques issues de ce travail

- *Article 1* : **Veerén B**, Ghaddar B, Bringart M, Khazaal S, Gonthier MP, Meilhac O, Diotel N, Bascands JL. 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*. 2020 Sep 29;25(19):4482. doi:10.3390/molecules25194482.

- *Article 2* : **Veerén B**, Bringart M, Turpin C, Rondeau P, Planesse C, Ait-Arsa I, Gimié F, Marodon C, Meilhac O, Gonthier MP, Diotel N, Bascands JL. Caffeic Acid, One of the Major Phenolic Acids of the Medicinal Plant *Antirhea borbonica*, Reduces Renal Tubulointerstitial Fibrosis. *Biomedicines*. 2021 Mar 30;9(4):358. doi: 10.3390/biomedicines9040358.

### Publications issues de collaborations

- Dobi A, Bravo SB, **Veerén B**, Paradela-Dobarro B, Álvarez E, Meilhac O, Viranaicken W, Baret P, Devin A, Rondeau P. Advanced glycation end-products disrupt human endothelial cells redox homeostasis: new insights into reactive oxygen species production. *Free Radic Res*. 2019 Feb;53(2):150-169. doi: 10.1080/10715762.2018.1529866.

- Guibbal F, Meneyrol V, Ait-Arsa I, Diotel N, Patché J, **Veerén B**, Bénard S, Gimié F, Yong-Sang J, Khantaline I, Veerapen R, Jestin E, Meilhac O. Synthesis and Automated Labeling of [<sup>18</sup>F]Darapladib, a Lp-PLA<sub>2</sub> Ligand, as Potential PET Imaging Tool of Atherosclerosis. *ACS Med Chem Lett*. 2019 Apr 4;10(5):743-748. doi: 10.1021/acsmchemlett.8b00643.

- Delveaux J, Turpin C, **Veerén B**, Diotel N, Bravo SB, Begue F, Álvarez E, Meilhac O, Bourdon E, Rondeau P. *Antirhea borbonica* Aqueous Extract Protects Albumin and Erythrocytes from Glycoxidative Damages. *Antioxidants (Basel)*. 2020 May 12;9(5):415. doi: 10.3390/antiox9050415

- Arcambal A, Taillé J, Couret D, Planesse C, **Veerén B**, Diotel N, Gauvin-Bialecki A, Meilhac O, Gonthier MP. Protective Effects of Antioxidant Polyphenols against Hyperglycemia-Mediated

Alterations in Cerebral Endothelial Cells and a Mouse Stroke Model. Mol Nutr Food Res. 2020 Jul;64(13):e1900779. doi: 10.1002/mnfr.201900779.

- Ghaddar B, **Veeeren B**, Rondeau P, Bringart M, Lefebvre d'Hellencourt C, Meilhac O, Bascands JL, Diotel N. Impaired brain homeostasis and neurogenesis in diet-induced overweight zebrafish: a preventive role from *A. borbonica* extract. Sci Rep. 2020 Sep 2;10(1):14496. doi: 10.1038/s41598-020-71402-2.

- Begue F, Tanaka S, Mouktadi Z, Rondeau P, **Veeeren B**, Diotel N, Tran-Dinh A, Robert T, Vélia E, Mavingui P, Lagrange-Xélot M, Montravers P, Couret D, Meilhac O. Altered high-density lipoprotein composition and functions during severe COVID-19. Sci Rep. 2021 Jan 27;11(1):2291. doi: 10.1038/s41598-021-81638-1.

- Taïlé J, Patché J, **Veeeren B**, Gonthier MP. Hyperglycemic Condition Causes Pro-Inflammatory and Permeability Alterations Associated with Monocyte Recruitment and Deregulated NFκB/PPARγ Pathways on Cerebral Endothelial Cells: Evidence for Polyphenols Uptake and Protective Effect. Int J Mol Sci. 2021 Jan 30;22(3):1385. doi: 10.3390/ijms22031385.

### **Communication lors de congrès**

- **13th World Congress on Polyphenols Applications**, Malta 2019. (**Présentation orale**)

*“polyphenol extract from the medicinal plant antirhea borbonica attenuates renal tubulointerstitial fibrosis.”*

**Veeeren B**, Idoumbin JP, Bringart M, Ait Arsa I, Baraka-Vidot J, Gonthier MP, Rondeau P, Meilhac O, Bascands JL.

## Liste des abréviations

<b>8-OHdG</b>	8-Oxo-2'-désoxyguanosine
<b>ADPAPAM</b>	Association pour le Développement, la Défense et la Promotion des Plantes à Parfums
<b>AGE</b>	Advance glycation end-product
<b>AngI</b>	Angiotensine I
<b>AngII</b>	Angiotensine II
<b>APLAMEDOM</b>	Association pour les Plantes Aromatiques et Médicinales de La Réunion
<b>ARA</b>	Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine 2
<b>ARE</b>	Antioxydant response element
<b>AT1R</b>	Récepteur de type 1 de l'angiotensine II
<b>AT2R</b>	Récepteur de type 2 de l'angiotensine II
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	alpha-smooth muscle actin
<b>BMP-7</b>	Bone morphogenic protein 7
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CCL2</b>	Chemokine Ligand 2
<b>CCL2R</b>	Chemokine Ligand 2 receptor
<b>CDP</b>	Common DC progenitor
<b>ColI</b>	Collagène de type I
<b>ColIII</b>	Collagène de type III
<b>ColIV</b>	Collagène de type IV
<b>CTGF</b>	Connective tissue growth factor
<b>CYP</b>	Cytochrome P450
<b>DESI</b>	Desorption electrospray ionisation
<b>DFG</b>	Débit de filtration glomérulaire
<b>FN</b>	Fibronectine
<b>FTI</b>	Fibrose tubulointerstitielle
<b>GPx</b>	Glutathione peroxidase
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>HPLC-MS-MS</b>	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
<b>HPLC-UV-MS/MS</b>	Liquid chromatography-Ultraviolet-tandem mass spectrometry
<b>IEC</b>	Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interféron gamma



<b>iNOS</b>	Inductible Nitric oxide synthase
<b>IRC</b>	Insuffisance rénale chronique
<b>IRT</b>	Insuffisance rénale terminale
<b>IUCN</b>	Union internationale pour la conservation de la nature
<b>Keap-1</b>	Kelch-like ECH-associated protein 1
<b>LOXL</b>	Lysyl oxidase-like
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemoattractant protein 1
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>MMP</b>	Métalloprotéinase
<b>MRC</b>	Maladie Rénale Chronique
<b>NFkb</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>NLRP3</b>	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
<b>Nrf2</b>	Nuclear factor erythroid-2-related factor 2
<b>OUU</b>	Obstruction urétérale unilatérale
<b>PAI</b>	Plasminogene activator inhibitor
<b>PDGF</b>	Platelet derived growth factor
<b>Pro-MMP</b>	Pro-métalloprotéinase
<b>RNS</b>	Reactive nitrogen species
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>SOD</b>	Superoxide dismutase
<b>TGF-β</b>	Transforming growth factor béta
<b>TNF-α</b>	Tumor necrosis alpha
<b>tPA</b>	Tissue plasminogene activator
<b>uPA</b>	Urokinase plasminogene activator

## *Avant-propos*

Mon aventure dans le domaine du rein et plus particulièrement dans le domaine de la fibrose rénale a débuté au cours de mon stage de fin de cycle de master. Durant ce stage, j'ai découvert l'existence d'un processus silencieux que personne ne soupçonne, la fibrose tubulointerstitielle. Ce processus de cicatrisation non contrôlé, simple en apparence mais loin de l'être, va être responsable d'une déstructuration du rein. Cela aura pour conséquence la perte de la fonction rénale qui ne pourra plus exercer sa fonction première, celui de filtrer le sang.

A ce jour, il n'existe pas de traitement dirigé contre la fibrose tubulointerstitielle. Le challenge de trouver une thérapie à base de plantes médicinales de La Réunion contre cette fibrose, a donné naissance à ma thèse. Ainsi, l'étude du potentiel anti-fibrosant de la plante médicinale *Antirhea Borbonica* a été l'axe principal de ce travail. Au cours de ces années de thèse, j'ai également eu l'opportunité de participer à différentes collaborations nécessitant mes compétences dans le domaine de la spectrométrie de masse. Les publications scientifiques issues de ces collaborations sont listées dans la partie « Annexes » de ce manuscrit.

Lors de la rédaction de ce manuscrit, pour une meilleure compréhension, j'ai privilégié d'aborder les différentes thématiques auxquelles j'ai été moi-même confronté au cours de ces dernières années.



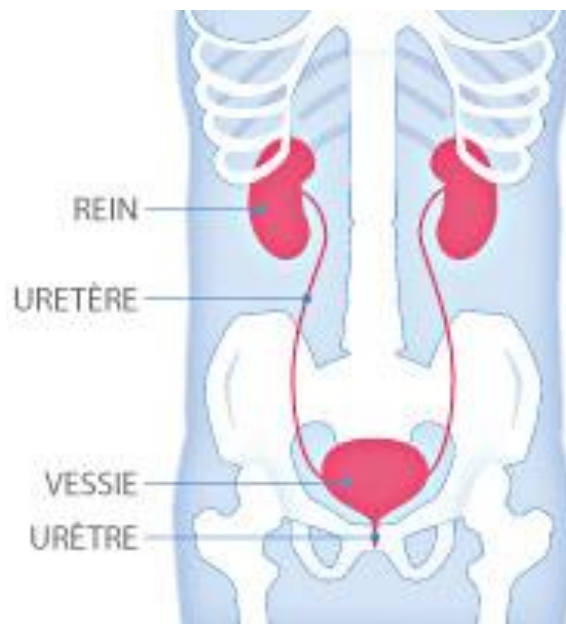
# **Contexte bibliographique**



# I. Anatomie

## I.1 Généralités

Les reins sont deux organes vitaux qui ont une forme de haricot, chacun de la taille d'un poing (entre 8 et 11cm de longueur). Ces derniers sont localisés juste en dessous de la cage thoracique au niveau des vertèbres thoraciques et lombaires (T12 – L2) dans la partie postérieure de l'abdomen, de part et d'autre de la colonne vertébrale. Les reins sont reliés à des conduits musculaires appelé uretères, qui vont permettre le transport de l'urine vers la vessie. Ce dernier compartiment va permettre le stockage de l'urine qui sera évacuée de l'organisme par l'urètre. Les reins, les uretères, la vessie et l'urètre constituent ainsi l'appareil urinaire (**figure 1**).



*(<https://www.mdm-france.com/fonctionnement-systeme-urinaire.html>)*

**Figure 1 : L'appareil urinaire**

## I.2 Les reins d'un point de vue macroscopique

Les reins sont entourés d'une capsule fibreuse (la capsule rénale) enveloppant le parenchyme rénal lui-même constitué de deux zones :

- La zone médullaire située dans la région centrale.
- La zone corticale localisée dans la région périphérique.

La zone médullaire est constituée de pyramides rénales appelées les pyramides de Malpighi. A l'apex de ces pyramides se trouvent la papille rénale qui débouchent sur des petits calices (calices rénaux mineurs) qui s'ouvrent sur des grands calices (calices rénaux majeurs) qui fusionnent pour donner le bassinnet qui correspond à la partie haute de l'uretère. Chacune de ces pyramides sont séparées par des colonnes rénales (colonnes de Bertin).

La vascularisation du parenchyme est assurée par l'artère rénale issue de l'aorte. Le drainage du sang filtré par le rein se fera par la veine rénale qui est reliée à la veine cave inférieure. La connexion de l'artère rénale et de la veine rénale se fait au niveau du hile rénal (**figure 2**). Il est intéressant de noter que 20 % du débit cardiaque sont transportés par les artères rénales.

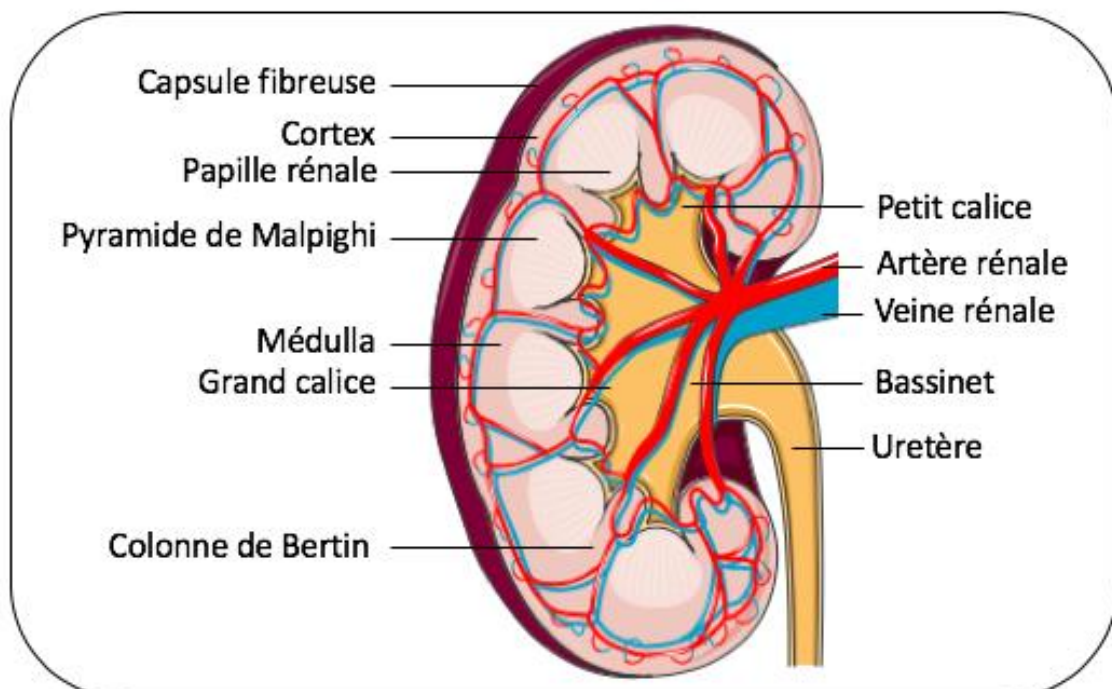
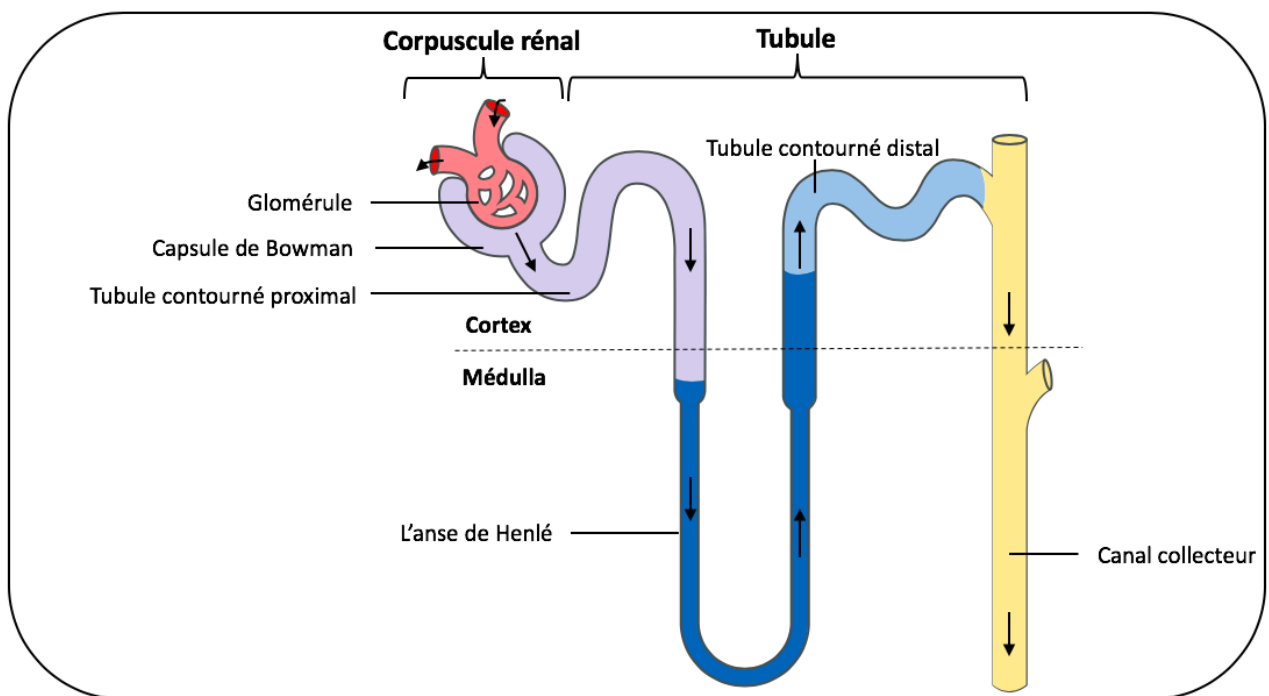


Figure 2 : Coupe frontale et anatomie rénale

## I.3 Les reins d'un point de vue microscopique

### I.3.1 Le néphron : une unité structurale et fonctionnelle

Les reins contiennent entre 500, 000 à 1,000,000 d'unités fonctionnelles filtrantes, nommés néphrons (Nyengaard and Bendtsen, 1992). Ils existent deux types de néphron : le néphron cortical, situé dans la zone corticale (80%) et le néphron juxtamédullaire situé dans la zone médullaire (20%). Chacun de ces néphrons est composé d'un glomérule qui filtre le sang et d'un tubule le long duquel des processus de réabsorption/sécrétion permettent la formation d'urine (**figure 3**).



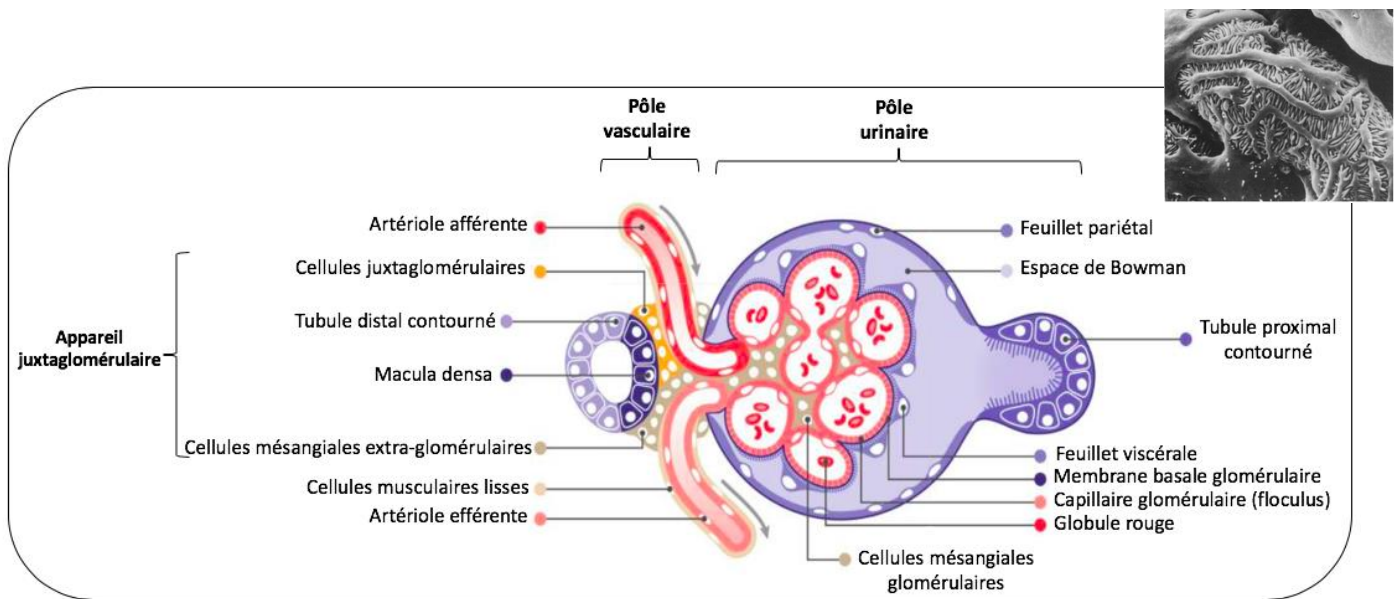
**Figure 3 : Structure d'un néphron**

Le néphron est une unité fonctionnelle qui va filtrer le sang. Il est constitué d'un corpuscule rénal et d'un tubule. Le corpuscule rénal est constitué d'un glomérule et de la capsule de Bowman. Le tubule se divise en quatre segments spécialisés : le tubule proximal, l'anse de Henlé, le tubule distal et le tubule collecteur.



### I.3.2 Le corpuscule rénal (ou corpuscule de Malpighi)

Le corpuscule rénal est constitué de deux structures bien distinctes : le glomérule et la capsule de Bowman. Durant la filtration, le sang provenant de l'artère rénale pénètre dans le glomérule par le pôle vasculaire via l'artériole afférente qui se divisent en capillaires fenêtrés (pores de 80-100 nm). Ces capillaires sont soutenus par le mésangium qui est composé de cellules mésangiales. Ces cellules possèdent des propriétés contractiles qui, en contrôlant l'ouverture des capillaires glomérulaires, permettent de réguler la surface de filtration glomérulaire (McMahon, 2016). Au niveau du pôle urinaire, ce réseau de capillaires glomérulaires (floculus) est entouré par la capsule de Bowman qui est composée de deux feuillets : le feuillet pariétal (partie externe) constitué de cellules épithéliales et le feuillet viscéral (partie interne) constitué de cellules appelées podocytes (**figure 4**). Les podocytes, quant à eux, contribuent au maintien de la structure de la membrane basale glomérulaire qui est composé de collagènes de type IV, de fibronectine, de laminine et de glycoprotéines (*i.e* néphrine) (Drenckhahn and Franke, 1988). Ces podocytes grâce à leur ramifications (pédicelles) vont envelopper les capillaires et s'entrelacer entre eux pour créer un « diaphragme de fente » (Kriz et al., 1994) (**Figure 4, encadré**). Ce diaphragme de fente joue le rôle de filtre et permet à l'ultrafiltrat ou urine primitive de rejoindre l'espace de Bowman ou espace urinaire.



**Figure 4 : Le corpuscule rénal** (Adaptée de Kriz, et W et al., 1994)

Schéma représentant la structure détaillée du corpuscule rénal et l'encadré représente une photographie d'un capillaire glomérulaire entouré de pédicules de podocytes qui s'entrelacent et forment les diaphragmes de fentes obtenue au microscope électronique (X10000).

### I.3.3 Le tubule

Le tubule est composé de quatre segments spécialisés : le tubule proximal, l'anse de Henlé, le tubule distal et le tubule collecteur (**figure 3**). Il est intéressant de noter que le tubule permet la réabsorption/sécrétion de nutriments et de substances dont l'organisme a besoin ou non. Il en résulte l'urine définitive qui est acheminée jusqu'au bassin.

#### I.3.3.1 Le tubule proximal

Le tubule proximal est en continuité de la capsule de Bowman. On distingue deux segments :

- i) le segment « contournée » et le segment droit encore appelé « pars recta » qui plonge dans la médulla et
- ii) le tubule contourné proximal (TCP) est situé dans la zone corticale. Il est composé

de cellules épithéliales polarisées dont le pôle apical avec une bordure en brosse (microvillosités) est orienté vers la lumière du tubule (en contact avec l'ultrafiltrat). Le pôle basolatéral est orienté vers l'espace interstitiel (Interstitium).

#### *1.3.3.2 L'anse de Henlé*

L'anse de Henlé en continuité avec la *Pars recta* dans la zone médullaire est composée d'une branche descendante et d'une branche ascendante.

#### *1.3.3.3 Le tube distal*

Le tube contourné distal en continuité avec la branche ascendante de l'anse de Henlé, remonte jusqu'au glomérule (pôle vasculaire, zone corticale). Il comprend deux parties : la partie proximale et la partie distale. Ce segment va jouer un rôle crucial dans l'équilibre électrolytique et dans l'ajustement de volume sanguin total de l'organisme (volémie).

#### *1.3.3.4 Le tube collecteur*

Le tube collecteur est en continuité avec le tube distal dans la zone cortico-médullaire débouchant sur les calices. Il va permettre de conduire l'urine définitive vers le bassinnet.

### **1.3.4 L'appareil juxtaglomérulaire**

L'appareil juxtaglomérulaire est une région située au pôle vasculaire du glomérule, où une portion du tube distal est en contact avec son propre glomérule. Il se compose de la *macula densa* du tube distal, des cellules mésangiales extraglomérulaires et des cellules granulaires de l'artériole afférente (**figure 4**). Ces dernières sont impliquées dans la sécrétion de la rénine, une enzyme jouant un rôle clé dans la régulation de la pression artérielle.

### I.3.5 L'espace interstitiel (Interstitium)

L'espace interstitiel rénal est un lieu d'échange correspondant à l'espace inter-tubulaire, extra-glomérulaire et extra-vasculaire, délimité par les membranes basales tubulaires et vasculaire. Cet espace virtuel est rempli de liquide interstitiel, de matrice extracellulaires (collagènes de types I, III, fibronectine) et de nombreuses cellules comme des fibroblastes résidents et des péricytes. Des cellules plaquettaires, des cellules dendritiques, et des macrophages y sont également retrouvés. Dans des conditions physiologiques, le volume de l'interstitium ne dépasse pas les 10 % (Lemley and Kriz, 1991; Zeisberg and Kalluri, 2015).

## I.4 rôles physiologiques du rein

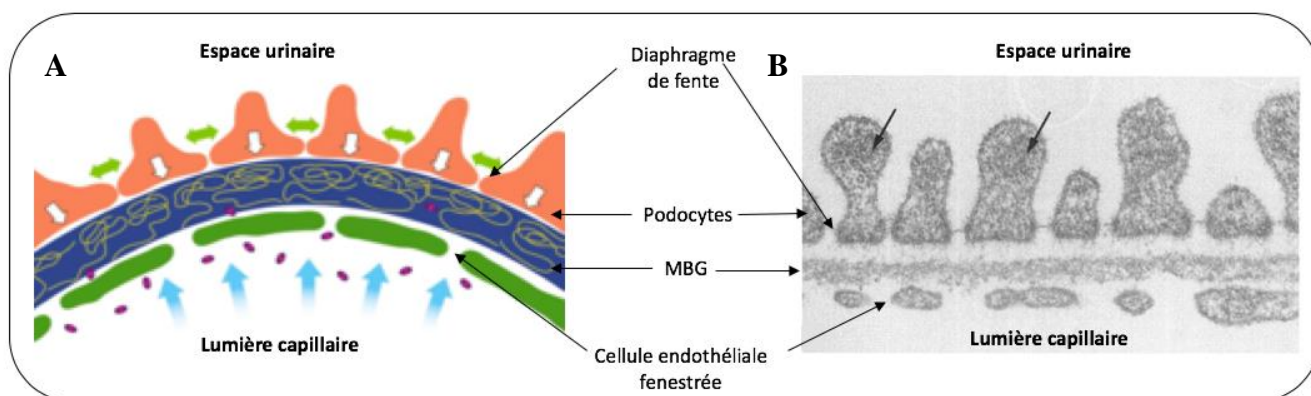
Dans notre organisme, le rein a pour fonction primaire la filtration du sang et l'épuration de déchets métaboliques endogènes (*i.e* excès d'eau, de minéraux et acide urique) et de substances exogènes (*i.e* xénobiotiques) afin de maintenir l'équilibre hydro-électrolytique. Le rein assure également le maintien de l'équilibre acido-basique en ajustant un pH sanguin autour de 7,38 et 7,42.

Au-delà de ces fonctions, le rein est un organe qui a une fonction endocrine.

### I.4.1 Filtration glomérulaire & formation de l'urine

La filtration glomérulaire constitue la première étape de formation de l'urine primitive. L'ultrafiltrat plasmatique, ou urine primitive est obtenue de manière séquentielle. En effet, le sang arrivant par l'artériole afférente des capillaires glomérulaires, passe à travers (i) l'endothélium fenestré des capillaires glomérulaires, (ii) la membrane basale glomérulaire et (iii) le maillage formé par les ramifications des podocytes pour rejoindre l'espace urinaire. Ces différents niveaux de filtration constituent la barrière de filtration glomérulaire (**figure 5**). Lorsque l'intégrité de cette

barrière est maintenue, l'excès d'eau, les petits solutés (sels, minéraux, glucose, déchets métaboliques (créatinine, urée) se trouveront dans l'ultrafiltrat qui constitue l'urine primitive. Ainsi, les protéines de haut poids moléculaires ( $\geq 66,000$  Dalton) comme l'albumine (66 kDa), les immunoglobulines (150 kDa) ne passeront pas la barrière glomérulaire. En revanche, en cas d'anomalie de la barrière, des protéines sanguines peuvent atteindre l'urine, on parle de protéinurie. Le sang filtré ressort des capillaires glomérulaires par l'artériole efférente. De l'artériole efférente naissent des capillaires péri-tubulaires qui viennent entourer le tubule permettant les phénomènes de réabsorption/sécrétion. En moyenne, le rein filtre 180 L de sang par jour (Zhuo and Li, 2013).



**Figure 5 : La barrière de filtration glomérulaire** (Adaptée de Kriz et W et al., 1994)

(A) Schéma et (B) photographie de la barrière de filtration glomérulaire obtenue au microscope électronique. MBG : membrane basale glomérulaire. Les flèches indiquent les podocytes.

La maturation de l'ultrafiltrat plasmatique en urine définitive se fait tout au long du tubule à travers les différents segments grâce à des phénomènes de réabsorption et de sécrétion.

En effet, c'est dans le tubule proximal contourné que débute la réabsorption du filtrat. La majeure partie (80 %) des ions comme le sodium (via des canaux sodique ou pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), de glucose

(via le co-transporteur Na-Glucose : SGLT), d'acides aminés, de bicarbonates (impliqué dans le maintien de l'équilibre acido-basique du sang) et d'eau (65 %) y sont réabsorbés.

Au niveau de l'anse de Henlé, la réabsorption de l'eau se fait uniquement dans la branche descendante tandis que celle du sodium se fait uniquement dans la branche ascendante via des pompes à sodium. Au niveau de ce segment, l'urine est de plus en plus hypotonique (peu concentré en sel) tandis que le compartiment interstitiel devient à l'inverse de plus en plus hypertonique (riche en sel).

Le tube distal quant à lui va jouer un rôle crucial dans l'équilibre électrolytique et dans l'ajustement de volume sanguin total de l'organisme (volémie).

La présence d'hormones comme la parathormone (PTH, sécrétée par les glandes parathyroïdiennes) et l'aldostérone (sécrétée par les glandes surrénales) favorisent la réabsorption de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), de sodium et la sécrétion de potassium dans l'urine. La sécrétion de protons ( $\text{H}^+$ ) et d'ammoniaque ( $\text{NH}_4^+$ ) dans ce segment permet le maintien de l'équilibre acido-basique. Des déchets azotés comme l'urée, la créatinine, l'acide urique et l'acide hippurique y sont également excrétés (Subramanya and Ellison, 2014). Cette urine mature est conduite vers le bassinet via le canal collecteur. Dans ce segment, l'hormone antidiurétique (ADH, sécrétée par l'hypophyse) et l'aldostérone vont réguler l'ouverture de canaux hydrique (aquaporines) permettant la réabsorption facultative de l'eau dans l'espace interstitiel (Interstitium). Ce processus important permet la concentration ou la dilution de l'urine définitive. La composition de l'urine définitive est présentée dans le **tableau 1**.

**Tableau 1. Composition de l'urine**

<b>Substances chimiques</b>	<b>Plasma (g/L)</b>	<b>Urine primitive (g/L)</b>	<b>Urine définitive (g/L)</b>
Eau	180 L	180 L	1,5 L
Chlore (Cl <sup>-</sup> )	650	650	7,5 à 22,5
Sodium (Na <sup>+</sup> )	585	585	6,8
Potassium (K <sup>+</sup> )	36	36	2,2
Protéines	14400	0	0
Glucides	180	180	0
Lipides	900	0	0
Urée	54	54	30
Acide urique	5,4	5,4	0,9
Créatinine	1,8	1,8	1,8
Ammoniac	0	0	0,75
Acide hippurique	0	0	0,3

#### I.4.2 Fonction endocrine

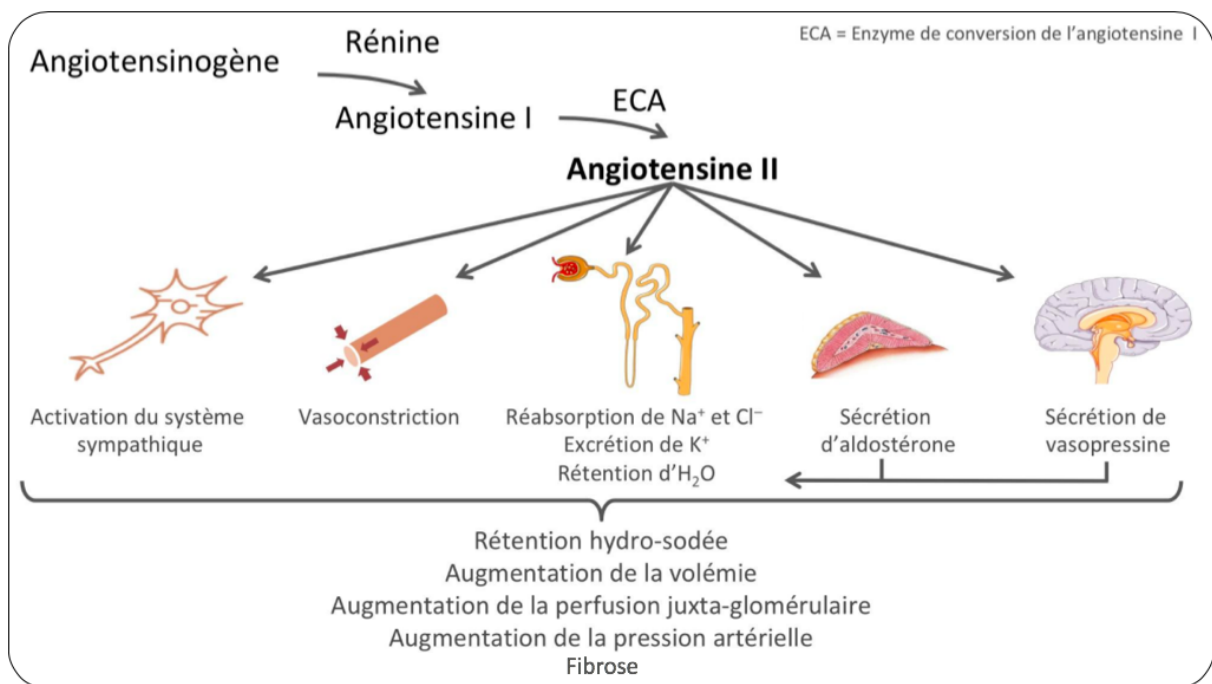
##### I.4.2.1 Le système Rénine-Angiotensine-aldostérone (SRAA)

Ce système hormonal localisé dans le rein joue un rôle primordial dans les processus physiologiques (équilibre du sodium dans le sang, de la volémie et de la pression artérielle) et pathologiques (hypertension, inflammation, fibrose) (**figure 6**).

La rénine considérée comme une hormone ([Brown, 2007](#)) est produite et sécrétée par les cellules granulaires de l'appareil juxtaglomérulaire. Elle agit sur l'angiotensinogène (produit par le foie), pour former l'angiotensine I (un décapeptide). Ce décapeptide sous l'action d'une carboxypeptidase produite par les poumons, l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA), va être convertit en angiotensine II (un octapeptide). Cette angiotensine II produite va interagir avec des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, AT1R et AT2R. Cette interaction ligand-récepteur conduit à diverses réponses physiologiques telles que la

vasoconstriction (vaisseaux sanguins et artériole efférente) induisant une augmentation de la pression artérielle, la sécrétion d'hormones comme l'aldostérone et l'hormone antidiurétique (Patel et al., 2017). Dans un contexte pathologique, l'angiotensine II peut mener à l'hypertension (Batenburg et al., 2012) et à des phénomènes de fibroses comme la fibrose hépatique (cirrhose) (Munshi et al., 2011) et la fibrose rénale (Mezzano et al., 2001; Huang et al., 2006). La sécrétion de rénine se trouve augmentée en cas de diminution de la concentration de sodium plasmatique (hypokaliémie) et de la pression artérielle (hypotension).

A ce jour, l'inhibition à différents niveaux de ce système rénine-angiotensine par une approche médicamenteuse est une des meilleures alternatives contre les maladies rénales (Juillerat-Jeanneret, 2020).



<https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/medicaments-du-systeme-renine-angiotensine>

**Figure 6 : Le système rénine-angiotensine-aldostérone**

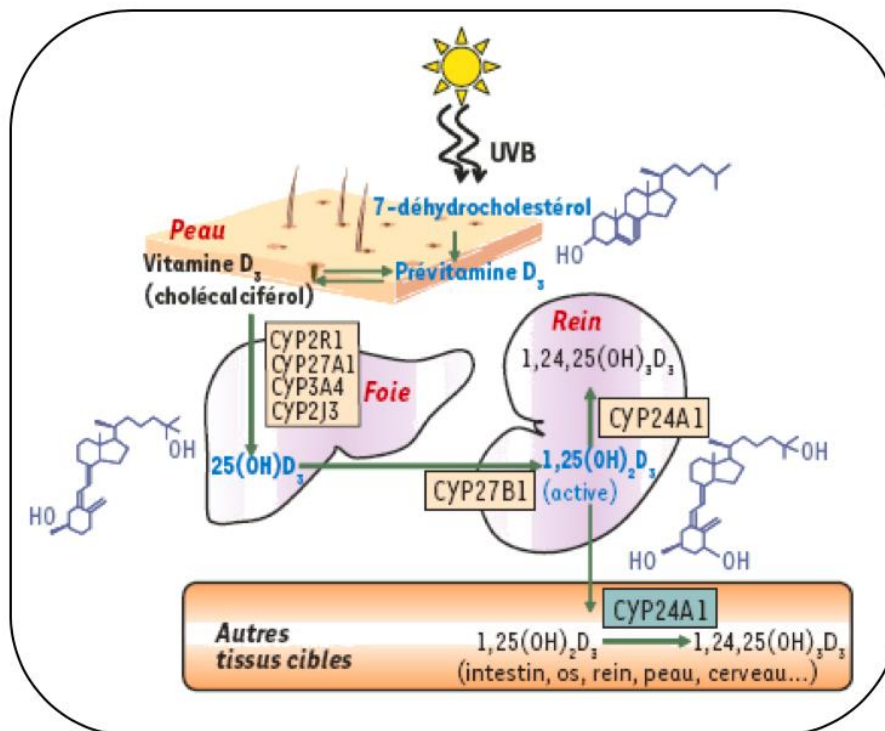


#### I.4.2.2 L'érythropoïétine

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone de type glycoprotéine produite essentiellement par les cellules rénales vraisemblablement par les fibroblastes interstitiels (Souma et al., 2015). Sa production est stimulée dans un contexte d'hypoxie (manque d'oxygène) afin de maintenir l'homéostasie de l'oxygène des tissus. Elle joue un rôle important dans la maturation des globules rouges, en agissant sur les cellules progénitrices érythroïdes de la moelle osseuse. Elle régule ainsi les niveaux de globules rouges dans l'organisme.

#### I.4.2.3 Métabolisation du précurseur de la vitamine D

Chez l'homme, la vitamine D apportée par l'alimentation est de deux types : la vitamine D2 (ergocalciférol) d'origine végétale et la vitamine D3 (cholécalfiérol) d'origine animale. De manière endogène, cette vitamine D est produite au niveau de la peau à partir du 7-déhydrocholestérol. Cette vitamine D subit une première hydroxylation au niveau du foie pour donner la 25-hydroxy-vitamine D. Une deuxième hydroxylation a lieu dans le rein pour donner la 1,25-dihydroxy-vitamine D3, la forme active et circulante de la vitamine D (**figure 7**). Elle joue un rôle important dans le maintien du taux de calcium/phosphate dans l'organisme. Cette synthèse est amorcée en cas d'hypocalcémie / d'hypophosphatémie ou de production de l'hormone parathyroïdienne (PTH) (Tissandié et al., 2006). Dans le cadre de la maladie rénale chronique, le métabolisme de la vitamine D est altéré. Une diminution de la 1,25 dihydroxy-vitamine a été observé chez des patients atteints de la maladie rénale chronique D3 (González et al., 2004; Al-Badr and Martin, 2008).



**Figure 7 : Schéma du métabolisme de la vitamine D<sub>3</sub>** (Adaptée de Tissandier *et al.*, 2006).

Dans la peau, le précurseur de la vitamine D<sub>3</sub>, le 7-déhydrocholestérol, est transformé en pré-vitamine D<sub>3</sub> qui est secondairement isomérisée en vitamine D<sub>3</sub> (ou cholécalférol). Dans le foie, la 25-hydroxyvitamine D<sub>3</sub> ou 25(OH)D<sub>3</sub> est synthétisée à partir de la vitamine D<sub>3</sub> après action de CYP27A1, CYP2R1, CYP2J3 ou CYP3A4. Dans les tissus cibles, la 1 $\alpha$ -hydroxylase CYP27B1 synthétise la forme biologiquement active 1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> ou 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Son catabolisme (essentiellement dans le rein) est initié par la 24-hydroxylase CYP24A1.

## II. La maladie rénale

### II.1 Généralités

La maladie rénale regroupe un ensemble de pathologies qui affectent de manière irréversible ou non la structure et la fonction du rein aboutissant progressivement à la perte partielle ou totale de la fonction rénale.

On distingue la maladie rénale aigüe de la maladie rénale chronique. Étant donné que la maladie rénale aigüe peut évoluer en maladie rénale chronique (Bedford et al., 2012), un focus sur la maladie rénale chronique sera privilégiée.

### II. 2 Données épidémiologiques

#### II.2.1 A l'échelle mondiale

La maladie rénale est un véritable problème de santé publique international avec des conséquences comme l'insuffisance rénale, l'hypertension, les maladies cardiovasculaires et de fortes mortalités et morbidités qui y sont associés. Selon l'étude *Global Burden of Disease (GBD)* de 2017, la prévalence mondiale de la maladie rénale est de 9,1%, soit près de 698 millions de malades (GBD Chronic Kidney Disease Collaboration., 2020). Elle est considérée comme la douzième cause de mortalité au niveau mondiale (1,2 millions de morts). D'autant plus, qu'elle contribue à 7,6% de la mortalité relevée pour les maladies cardiovasculaires.

## II.2.2 A l'échelle de la France et de La Réunion

Selon le registre REIN (Réseau Epidémiologie, Information, Néphrologie) de 2018, la France métropolitaine présente une incidence standardisée de l'IRCT traitée de 165 par million d'habitants et de 381 par million d'habitants à La Réunion. Soit 2,3 fois que celle de la France métropolitaine. La maladie rénale chronique est une priorité de santé publique nationale.

Parmi les causes majeures d'insuffisance rénale chronique, la néphropathie diabétique (22,7 vs 46,4 % (France vs Réunion)), suivie de l'hypertension artérielle (25,2 vs 12,7 %) et la glomérulonéphrite (12 vs 13,6 %).

## II.3 Diagnostic de la maladie rénale chronique

Le diagnostic et le pronostic de cette maladie rénale souvent silencieuse, est facilitée grâce à une standardisation des définitions et des systèmes de classification qui a été faite et mise à jour par les organisations NKF-KDOQI (National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) et KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes).

En effet, en 2002 la National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF-KDOQI) définit la maladie rénale chronique indépendamment de l'étiologie comme étant : soit une atteinte rénale, suggérée par une augmentation de marqueurs sanguin/urinaire (albumine, créatinine) et/ou soit une diminution de la fonction rénale marquée par une diminution du débit de filtration glomérulaire estimé (eDFG), sur une période allant au-delà de trois mois (National Kidney Foundation, 2002). La maladie rénale chronique est stratifiée en 5 stades. Ainsi, une personne avec un DFG inférieur à 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> de surface corporelle pendant plus de 3 mois est suspectée d'être atteinte d'une maladie rénale chronique.

Cependant, cette classification se base essentiellement sur la fonction rénale estimée, sans prendre en compte la cause de la maladie (Eckardt et al., 2009; Levey et al., 2011).

En 2011, une méta-analyse réalisée sur 45 cohortes comprenant 1,555,331 personnes, révèle qu'un faible débit de filtration glomérulaire associé à une forte albuminurie augmente le risque d'avoir une MRC (Astor et al., 2011). En 2013, une nouvelle classification de la maladie rénale chronique basée sur la cause, la sévérité, les catégories du DFG (G1-G5) et de l'albuminurie (A1-A3) est apparue (Levin and Stevens, 2014). Ainsi, les personnes ayant un DFG supérieur ou égale à 90 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> sont classées dans le premier stade où le rein fonctionne normalement, un DFG compris entre 60 et 89 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> dans le deuxième stade avec une fonction légèrement diminuée. Le troisième stade quant à lui est subdivisé en deux sous-groupes : avec un DFG compris entre 45 et 59 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> et compris entre 30 et 44 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, où le DFG est considéré comme modérément à sévèrement diminué, correspondant à l'insuffisance rénale chronique. Le quatrième stade où le DFG diminue à 15–29 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, correspondant à l'insuffisance rénale chronique sévère et le cinquième stade où le DFG est inférieur à 15 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, correspondant à l'insuffisance rénale terminale. A ce stade, le rein ne fonctionne quasiment plus. Des méthodes de suppléances de filtration comme l'hémodialyse ou la dialyse péritonéale sont envisagées. A chacun de ces stades est associé une concentration d'albumine dans les urines. Ainsi, une normo-albuminurie (stade A1) est diagnostiquée pour des concentrations d'albumines excrétées comprises entre 10 et 29 mg/jour, une micro-albuminurie (stade A2) pour des concentrations comprises entre 30 et 300 mg/jour et une macro-albuminurie (stade A3) pour des concentrations supérieures à 300 mg/jour (**tableau 2**) (Levey et al., 2020).

### *- Diagnostique de l'atteinte de la fonction rénale*

Le dépistage de la diminution de la fonction rénale et par conséquent de l'insuffisance rénale chronique se fait par l'estimation et/ou la mesure du débit de filtration glomérulaire.

**Tableau 2 : Pronostic de la MRC grâce à la stratification du débit de filtration glomérulaire et de l'albuminurie (Adapté Levin A et al., 2014)**

				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30–300 mg/g 3–30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min per 1.73 m <sup>2</sup> ) Description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60–89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45–59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30–44			
	G4	Severely decreased	15–29			
	G5	Kidney failure	<15			

Remarque : les couleurs représentent le risque d'avoir une MRC. Vert : risque faible ; Jaune : risque modéré ; Orange : risque élevé ; Rouge : risque très élevé

### II.3.1 L'estimation du débit de filtration glomérulaire

En clinique, le débit de de filtration glomérulaire estimée (eDFG) est préféré. Cette estimation se fait à l'aide de formules de prédictions qui se basent sur les taux de marqueurs sanguins et urinaires comme la créatinine en prenant compte des paramètres tels que l'âge, le sexe, la taille, le poids et même l'ethnie. De manière systématique, le DFG est calculé par la clairance de la créatinine. L'équation la plus utilisée pour calculer cette clairance est la formule de Cockcroft-Gault (1). L'équation de l'étude MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) (2) normalisée par la surface corporelle (1,73m<sup>2</sup>) quant à elle permet d'estimer le DFG contrairement à l'équation (1) qui estime la clairance de la créatinine (Bostom et al., 2002; Poggio et al., 2005). La formule du MDRD est

préférée à celle de Cockroft et Gault, car elle ne prend pas en compte le poids, et elle est plus exacte chez le sujet âgé.

(1) La formule de Cockroft-Gault pour l'estimation de la clairance de la créatinine

$$(1) \text{ Clairance créatinine} = \left[ \frac{(140 - \text{âge})}{\text{Créatininémie}} \right] * \text{Poids} * k$$

Age : année   Poids : kg   k : 1,23 (homme) et 1.04 (femme)

(2) La formule du MDRD (Modification of the Diet in Renal Disease) pour l'estimation du débit de filtration glomérulaire.

$$(2) eDFG = 186 * (\text{créatininémie} * 0,0113)^{-1,154} * \text{âge}^{-0,203}$$

\* 1,21 pour Sujets d'origine africaine.   \* 0,742 pour les femmes

(<https://www.sfnat.org/professionnels/calculateurs/mdrds-ckd-epi-cockcroft>)

### II.3.2 La mesure du débit de filtration glomérulaire

Le DFG est mesuré à l'aide d'une molécule non toxique, librement filtrée, non-réabsorbée, non métabolisée, non sécrétée par l'organisme et qui ne s'accumule pas dans les reins. Des traceurs exogènes comme l'inuline, [<sup>99m</sup>Tc]-diéthylènetriaminepentaacétique, [<sup>125</sup>I]-iothalamate, [<sup>51</sup>Cr]-éthylènediaminetétraaacétique (EDTA) sont utilisés. Cependant, l'utilisation de tels marqueurs est assez coûteuse et d'autant plus lourde pour le patient, si les marqueurs utilisés sont radioactifs. Des traceurs endogènes, comme la créatinine et la cystatine C peuvent être utilisés. Le DFG est ainsi déterminé par la clairance rénale. Cette clairance permet de mesurer l'excrétion de la substance

filtrée en un temps donné. Elle s'exprime en millilitres par minute et se calcule à l'aide de l'équation suivante :

$$CR = (U * V) / P$$

Où  $U$  = concentration de la substance dans l'urine (mg/mL)

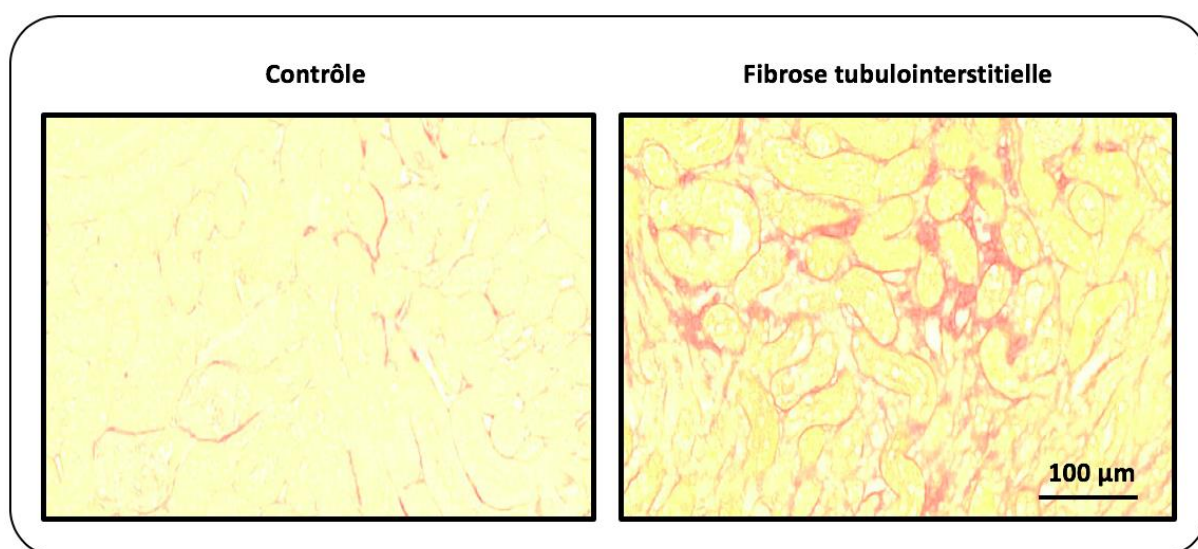
$V$  = taux de formation de l'urine (mL/min)

$P$  = concentration de la substance dans le plasma (mg/mL)

### II.3.3 Diagnostic de l'atteinte tissulaire du rein : les marqueurs d'atteintes rénales

Dans le cadre de diagnostic et de suivi de l'atteinte tissulaire du rein, le prélèvement d'un morceau de tissu rénal (biopsie) peut être réalisé pour des analyses histologiques.

En effet, la maladie rénale s'accompagne d'atteintes histo-morphologiques du rein comme la sclérose des vaisseaux des glomérules (glomérulosclérose) et la fibrose tubulointerstitielle (**figure 7**). Ces atteintes induisent une perte de l'intégrité de la barrière de filtration glomérulaire favorisant la fuite de composants du sang dans les urines. En clinique, la détection de protéines (albuminurie, protéinurie), d'hématies (hématurie) et de leucocytes (leucocyturie) dans les urines servent de marqueurs d'atteintes de cette barrière de filtration.



**Figure 7 : Atteinte rénale : la fibrose tubulointerstitielle.** (Données personnelles)

Photographies de reins colorés au rouge Sirius afin de visualiser la fibrose. Sur l'image de droite, la couleur rouge représente un dépôt important de collagènes dans l'interstitium.



## II.4 Les atteintes rénales

A ce jour, la classification des atteintes rénales, ou néphropathies n'est pas encore vraiment standardisée. De ce fait, nous avons utilisé la classification des principales néphropathies faite dans le rapport REIN (Réseau Épidémiologique et Information en Néphrologie), 2017.

### II.4.1 La néphropathie vasculaire due à l'hypertension

La néphropathie vasculaire (ou néphropathie hypertensive) associée à l'hypertension artérielle représente 22,3 % des maladies rénales chroniques. A plus ou moins long terme, cette hypertension chronique, entraîne une hyper filtration du sang aboutissant à des effets délétères au niveau des reins (artériosclérose, glomérulosclérose, fibrose). Parmi les facteurs qui contribuent au développement de cette néphropathie : l'activité élevée du système nerveux sympathique, l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone et l'altération de l'excrétion de sels par les reins (Hart and Bakris, 2010).

### II.4.2 Les néphropathies diabétiques

En France, la néphropathie diabétique associée au diabète de type 2 représente 20,6 % des maladies rénales chroniques. Le diabète de type 1 représente seulement 1,8 % des néphropathies diabétiques. La hausse de la prévalence du diabète ainsi que la hausse de l'espérance de vie de la population font que l'incidence de la néphropathie diabétique tend à s'accroître. En effet, la fédération internationale du diabète prévoit qu'en 2045, 700 millions de personnes seront atteintes de diabète à travers le monde.

L'hyperglycémie chronique, caractérisée par une forte concentration de glucose dans le sang va conduire à la formation de produits avancés de glycation (AGEs) via les processus de glycation/

glycoxydation des protéines (Vlassara and Palace, 2002). Au niveau endothélial, l'interaction des AGEs avec leurs récepteurs induit une « dysfonction endothéliale ». Celle-ci, se caractérise par une augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'adhésion des monocytes (Singh et al., 2001). Il en résulte une inflammation au niveau des glomérules et de la région tubulointerstitielle (Navarro-González et al., 2011; Wada and Makino, 2013).

#### II.4.3 Les néphropathies glomérulaires (glomérulonéphrites)

Les glomérulonéphrites représentent 10,8% des maladies rénales chroniques. Elles correspondent à une inflammation aiguë et/ou chronique des glomérules. Une inflammation qui à long terme induit la perte de la barrière de filtration glomérulaire, endommageant le rein et pouvant aboutir à l'insuffisance rénale terminale (Donadio and Grande, 2002).

Parmi les glomérulonéphrites les plus fréquentes :

- La néphropathie à immunoglobulines A (IgA) ou maladie de Berger représente 3,4% des glomérulonéphrites. Elle est caractérisée par un dépôt de complexes immuns de type IgA au niveau du mésangium des glomérules. Les causes sont diverses comme la surproduction d'IgA (Barratt and Feehally, 2005) ou une O-glycosylation anormale de l'IgA permettant la liaison aux cellules mésangiales (Allen et al., 2001).

- La sclérose glomérulaire segmentaire et focale représente 2,4% des glomérulonéphrites. Elle est caractérisée par une atteinte des podocytes (cellules impliquées dans la filtration glomérulaire). Des mutations sur des protéines impliquées dans la liaison des podocytes (néphrine, podocytine constituants du diaphragme de fente) peuvent causer cette pathologie (Hinkes et al., 2007; McKenzie et al., 2007).

Des analyses histologiques sur des biopsies de rein sont nécessaires pour le diagnostic de ces pathologies.

#### II.4.4 Les néphropathies tubulointerstitielles chroniques

Les néphropathies tubulointerstitielles chroniques représentent 10,6% des maladies rénales chroniques. Elles correspondent à une inflammation aigüe et/ou chronique des tubules et de l'interstitium, conduisant au développement d'atteintes histologiques (fibrose tubulointerstitielle) et morphologiques (bosselure, taille asymétrique) des reins. À des stades plus tardifs, des lésions vasculaires et des lésions de glomérulosclérose apparaissent. Des causes urologiques (*i.e* : uropathies), médicamenteuses (*i.e* : cisplatine), toxiques (*i.e* : plomb, herbes chinoises), génétiques (*i.e* : mutation du gène *UMOD* codant pour l'uromoduline), métaboliques (*i.e* : hypercalcémie), infectieuses (*i.e* : tuberculose) sont à l'origine de ces néphropathies.

Parmi les néphropathies tubulointerstitielles les plus fréquentes :

- La polykystose rénale autosomique dominante représente 6,2% des néphropathies tubulointerstitielles. Elle est caractérisée par la formation d'un ou plusieurs kystes au niveau des reins. Elle conduit à une augmentation de la taille des reins pouvant entraîner une insuffisance rénale. Elle est causée par une mutation des gènes *PKD1* et *PKD2* (Rossetti et al., 2002; Cornec-Le Gall et al., 2013). C'est une maladie héréditaire.

- Les pyélonéphrites représentent 4,4% des néphropathies tubulointerstitielles.

Elles sont caractérisées par des infections bactériennes (*i.e* : *Escherichia coli*) des voies urinaires qui atteignent le bassinet et le parenchyme rénal. 2,3% sont due à une uropathie obstructive acquise, 0,2% à une uropathie obstructive congénitale et 0,6% à une lithiase urinaire. L'obstruction ou la présence de calculs rénaux au niveau vésical, urétéral et rénal va induire un écoulement moins rapide de l'urine au niveau des uretères, conduisant à une hydronéphrose (dilatation du rein) pouvant aboutir à une atteinte tissulaire du rein, la fibrose tubulointerstitielle (Almodhen et al., 2009; Simões e Silva et al., 2013).

#### II.4.5 Les néphropathies toxiques

Les néphropathies toxiques représentent 1,8 % des maladies rénales chroniques. Elles sont causées par l'ingestion, l'inhalation et l'injection chronique de médicaments, de produits chimiques/biologiques, de métaux lourds et de solvants qui sont toxiques pour les reins. Ces derniers entraînent des changements fonctionnels et/ou structuraux des reins qui sont irréversibles (Schreiner and Maher, 1965; Van Vleet and Schnellmann, 2003). On peut citer comme exemples de néphropathies toxiques :

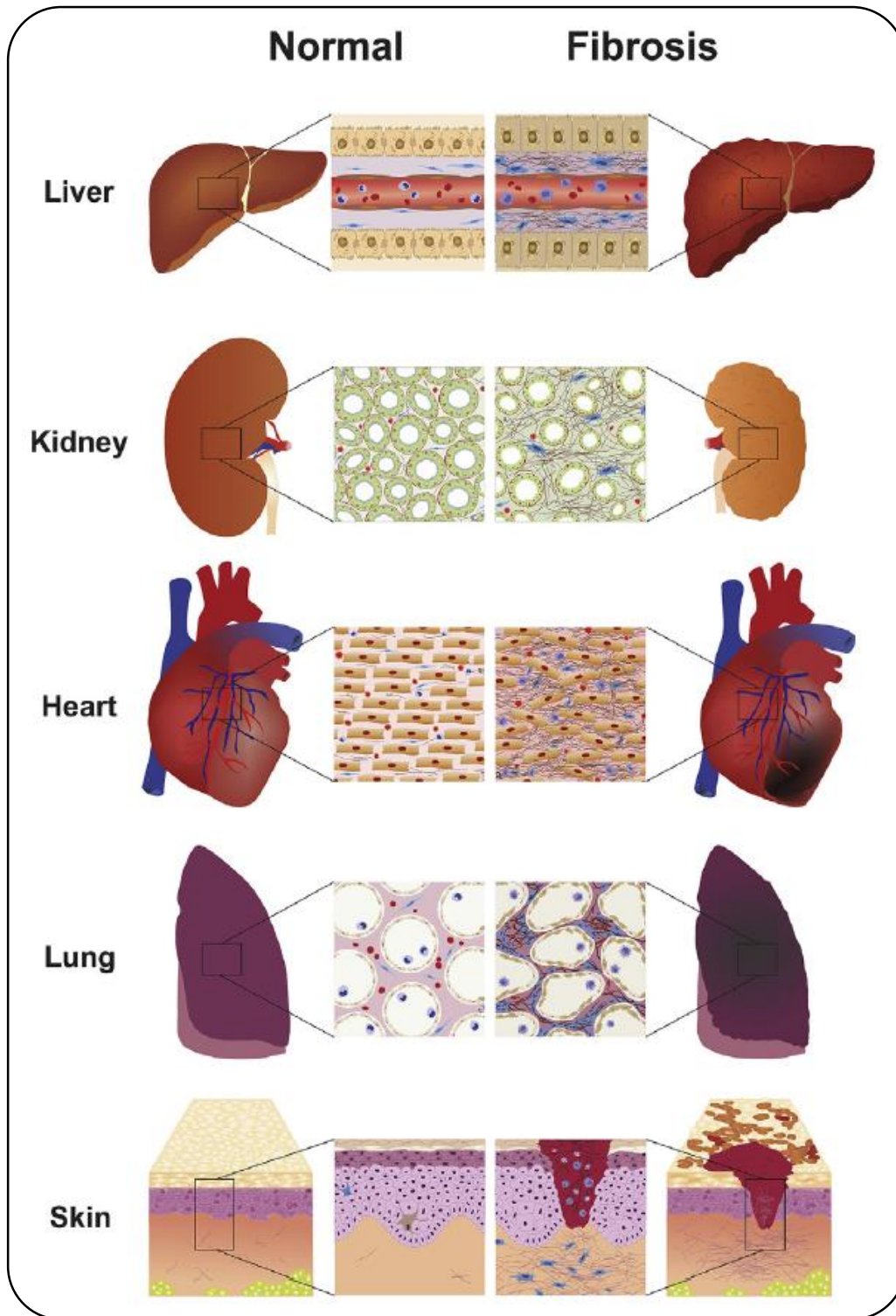
- La néphropathie induite par l'ingestion de chlorure de mercure qui endommage le tubule proximal.
- La néphropathie aux herbes chinoises ou néphropathie aux acides aristolochiques, qui induit une fibrose rénale (Nortier et al., 2015; Yang et al., 2018).

## III. La fibrose tubulointerstitielle

### III.1 Généralités

La cicatrisation est un processus biologique fondamental permettant le remplacement du tissu parenchymateux lésé par du tissu conjonctif. Quelle que soit l'origine de la lésion tissulaire, le processus de réparation comprend i) une phase inflammatoire ii) une phase de prolifération et iii) une phase de remodelage (Wilkinson and Hardman, 2020). Sans contrôle, ce processus de cicatrisation devient pathologique, on parle de fibrose.

La fibrose est un processus de cicatrisation mal contrôlé alternant en permanence prolifération et remodelage excessif de la matrice extracellulaire aboutissant à la formation d'un tissu cicatriciel. La modification structurale/architecturale des organes par ces cicatrices, conduit dans certains cas à la perte de leurs fonctions. A titre d'exemple, la fibrose au niveau des poumons entraîne un épaissement et une rigidification du tissu pulmonaire (Wuyts et al., 2013). Cela a pour conséquence de réduire le volume d'air qui rentre, conduisant ainsi à l'insuffisance respiratoire. Cette cicatrisation pathologique peut affecter des organes comme le foie, les reins, le cœur, les poumons et la peau (**figure 8**) (Weiskirchen et al., 2019).

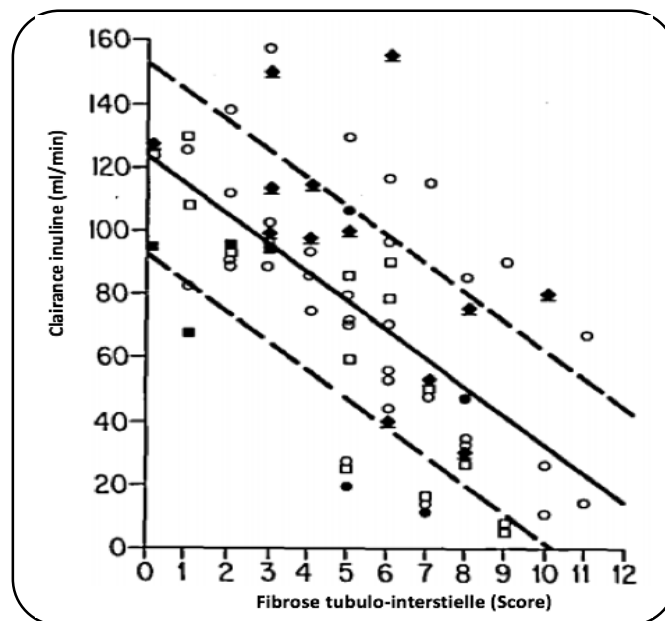


**Figure 8 : La fibrose, un processus partagé par le foie, les reins, le cœur, les poumons et la peau. (Adaptée de Weiskirchen et al., 2018)**

Au niveau des reins la fibrose peut atteindre i) les vaisseaux (artériosclérose), ii) les glomérules (glomérulosclérose) et iii) les tubules et l'interstitium (fibrose tubulointerstitielle).

Quelle que soit l'étiologie et la nature de la néphropathie, celle-ci aboutit à la fibrose tubulointerstitielle (Schainuck et al., 1970). Aujourd'hui, il est admis que cette fibrose tubulointerstitielle est un processus commun à toutes les néphropathies chroniques.

Dans le contexte de la maladie rénale chronique, cette fibrose tubulo-interstielle est fortement corrélée avec la perte progressive de la fonction rénale (Schainuck et al., 1970; Nath, 1992). En effet, les travaux de Schainuck LI *et al.* montrent qu'indépendamment de la néphropathie initiale, les patients ayant un débit de filtration glomérulaire inférieur à 60 ml/ min / 1.73 m<sup>2</sup> ont une fibrose tubulointerstitielle qui est modérée voir sévère (**figure 9**).



**Figure 9 : Relation entre la fonction rénale et la fibrose tubulointerstitielle.**

◆ Glomérulonéphrites aiguës ; ○ Glomérulonéphrites chroniques ; ● Néphropathies interstitielles ; ■ Néphrosclérose. (Adapté de Schainuck LI *et al.*, 1970)

Dans ce chapitre nous nous focaliserons sur les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sont impliqués dans le développement de la fibrose tubulointerstitielle.

### **III.2 Les étapes de la fibrose tubulointerstitielle**

La fibrose tubulointerstitielle peut être décrite en trois phases : i) une phase inflammatoire ii) une phase d'activation-prolifération de cellules sécrétrices de matrices extracellulaires (MEC) et iii) une phase d'accumulation de la MEC.

**i)** La première phase est l'inflammation. Suite à un stress appliqué au niveau du rein, les cellules résidentes sécrètent des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires. Celles-ci vont induire le recrutement et l'infiltration de cellules immunitaires (*e.g.* monocytes, lymphocytes T) dans l'interstitium. Ces dernières vont à leurs tours produire et sécrétées des cytokines pro-inflammatoires (*e.g.* TNF- $\alpha$ ), des facteurs de croissance profibrosantes (*e.g.* TGF- $\beta$ ) et des radicaux libres (Zeisberg et al., 2001) qui vont maintenir cet état inflammatoire (Cachofeiro et al., 2008; Forbes et al., 2008).

**ii)** La phase suivante est une phase d'activation-prolifération. La sécrétion de facteurs de croissance induit l'apparition et la prolifération de nouvelles cellules, les myofibroblastes.

**iii)** La dernière étape de cette fibrose est l'accumulation de matrice extracellulaire (MEC). Ces myofibroblastes sécrètent massivement des protéines de la MEC qui s'accumulent au niveau de l'interstitium (Zeisberg and Neilson, 2010).

Cette cicatrisation pathologique est un processus dynamique et bien plus complexe qu'il n'y paraît.



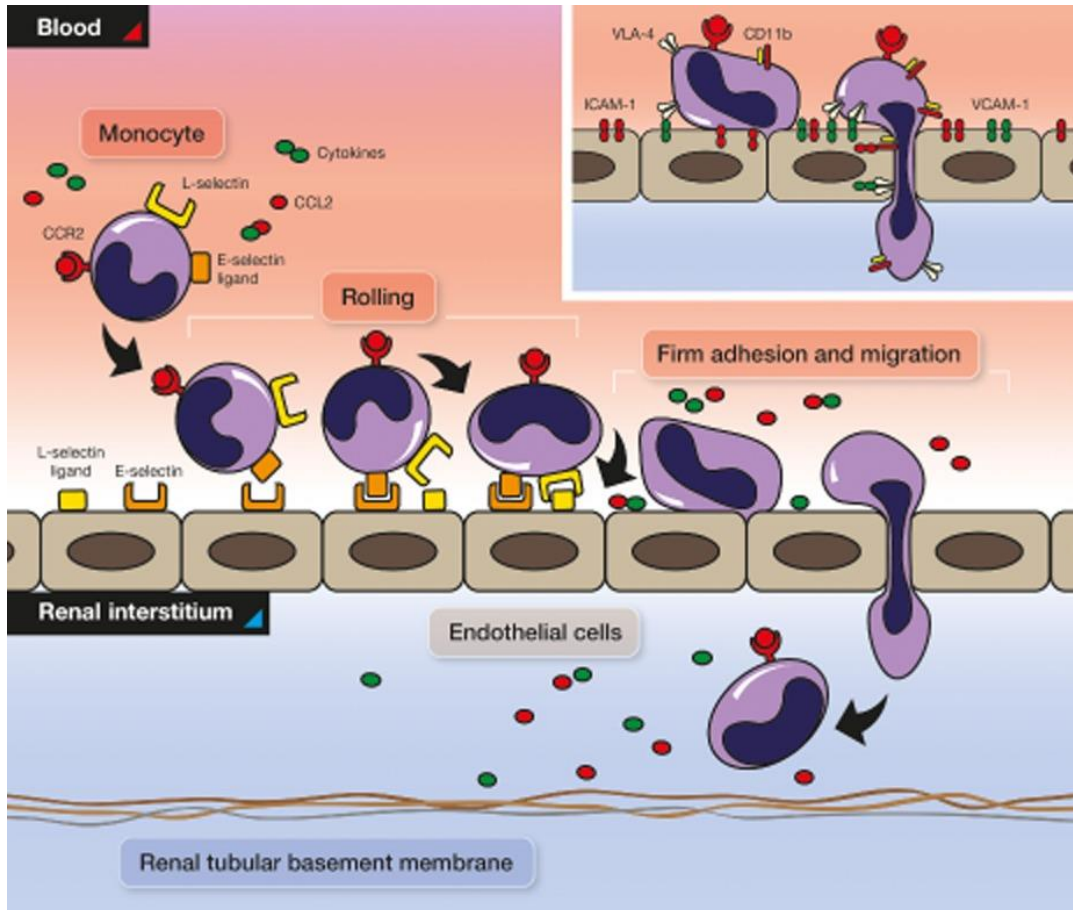
### III.2.1 L'inflammation

En condition physiopathologique ou d'infection, l'organisme met naturellement en place un système de défense, l'inflammation. Si elle n'est pas d'origine infectieuse, on parle d'inflammation stérile (Gong et al., 2020). L'inflammation va amorcer une réponse innée et/ou adaptative, médiée par les leucocytes.

Ainsi, lors d'une atteinte non-pathogène du tissu rénal, les cellules lésées vont initier une réponse inflammatoire dite stérile en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'interleukin-6 (IL-6) ainsi que des « signaux de danger », les DAMPs (Danger Associated Molecular Pattern) (Matzinger, 1994). Ces motifs sont reconnus par les leucocytes résidants dans les tissus (*i.e.* macrophages, cellules dendritiques, mastocytes) grâce à des récepteurs de types (*i.e.* Pattern Recognition Receptor (PRR)) (Gong et al., 2020). Cette reconnaissance permet l'activation/maturation de ces cellules qui sécrètent des chimiokines (*i.e.* monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)), des cytokines pro-inflammatoires et des espèces radicalaire (espèces réactives à l'oxygène et à l'azote). Un gradient de concentration de chimiokines se forme dans la circulation sanguine. Ainsi, lorsque les leucocytes circulants atteignent les vaisseaux sanguins avec la plus forte concentration de chimiokines, elles adhèrent fermement à l'endothélium et initient un processus de « rolling ». Une fois à proximité du site d'inflammation, les leucocytes cessent de rouler, et s'étirent à travers l'endothélium afin de rejoindre le site d'inflammation. Ce processus s'appelle la diapédèse (**figure 10**). Le rolling n'est possible qu'en raison de l'interaction entre les intégrines présentes à la membrane des leucocytes, et des sélectines plaquettaires (sélectines P) et endothéliales (sélectines E), exprimées par les cellules endothéliales et les plaquettes. Les molécules d'adhésion vasculaires (VCAM) et intercellulaires (ICAM) permettent l'adhésion des leucocytes à la paroi endothéliales (Fanelli et al., 2017).

Dans le contexte de la maladie rénale chronique, ce processus inflammatoire est maintenu dans le temps, on parle d'inflammation chronique. Celle-ci aboutie à une réponse immunitaire adaptative

faisant intervenir des lymphocytes T et B (Imig and Ryan, 2013). Nous nous intéresserons par la suite aux médiateurs cellulaires de cette inflammation.



**Figure 10 : Étapes de recrutement leucocytaire (monocyte) dans l'interstitium.**  
(D'après Alikhan MA *et al.*, 2013)

### III.2.1.1 Les leucocytes

Les leucocytes ou globules blancs sont des cellules qui interviennent dans la réponse innée ou adaptative du système immunitaire. On peut ainsi les diviser en deux groupes : i) Les cellules de l'immunité innée comprenant les monocytes/macrophages/cellules dendritiques, les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles, et ii) les cellules de l'immunité adaptative comprenant les lymphocytes T et B.

#### **a. Les monocytes/macrophages**

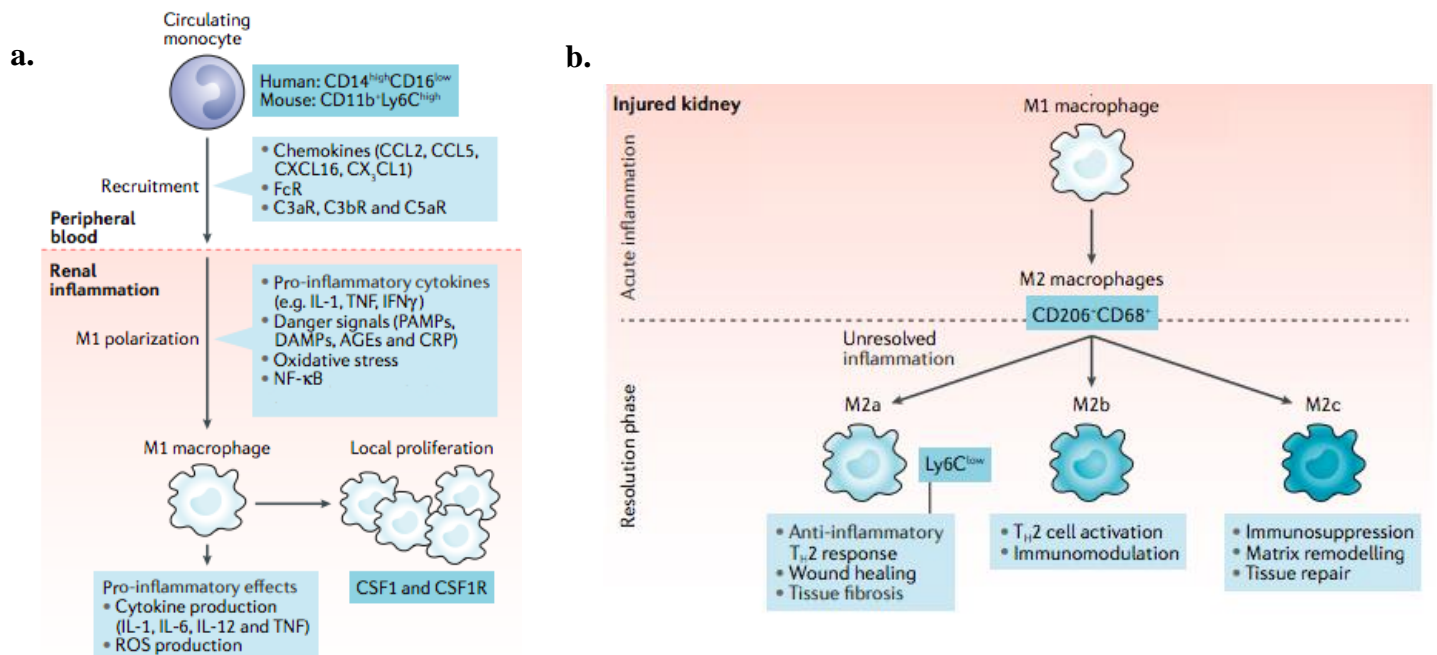
Les macrophages appartiennent à la famille des phagocytes mononucléés. Ils représentent 2 à 10% des leucocytes de l'organisme. On distingue généralement deux classes : les macrophages issus de la différenciation des monocytes circulant dans le sang et les macrophages résidants dans les tissus, issus du développement embryonnaire (Epelman et al., 2014). Ces derniers agissent comme d'importants médiateurs de l'inflammation et de la modulation de la réponse immunitaire (Hashimoto et al., 2013). Ils jouent un rôle essentiel dans la surveillance, l'homéostasie, et dans la réparation tissulaire (Gordon, 1998). Ils sont capables de reconnaître et de détruire par phagocytose des débris cellulaires et des cellules en apoptose. Cette classe de macrophages spécifiques aux tissus peuvent changer leurs phénotypes et leurs fonctions en réponse à des signaux micro-environnementaux locaux lors d'une infection ou d'une atteinte tissulaire (Murray and Wynn, 2011).

Il convient de noter qu'il existe une variété de sous-populations de macrophages différentes (Cao et al., 2015; Murray and Wynn, 2011). Bien qu'il s'agisse d'une classification simplifiée, ils sont le plus souvent classés autour de 2 pôles d'activation : activation classique (M1) et activation alternative (M2). L'activation M1 représente les capacités à déclencher une réponse inflammatoire, antimicrobienne et à promouvoir les réponses immunitaires adaptatives. L'activation M2

représente les capacités à phagocytter les débris, à favoriser la cicatrisation, à contrer l'inflammation destructrice et à supprimer l'immunité adaptative. Ces activités fonctionnelles sont médiées par des mécanismes moléculaires qui impliquent pour la sous-population de macrophages M1 activés de manière classique, des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) ou le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) et des enzymes telles que la nicotinamide adénosine dinucléotides phosphate (NADPH) oxydase ou l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) (Mosser DM et al., 2008). Ces macrophages activés, libèrent des cytokines inflammatoires comme l'interleukine-6 (IL-6) et des espèces radicalaires de l'oxygène qui favorisent l'inflammation, le stress oxydatif et par conséquent le développement de la fibrose rénale (Baud and Ardaillou, 1986; Boyce et al., 1989; Ricardo et al., 2008) (**figure 11, a.**).

Quant à la sous-population de macrophages M2 activés de manière alternative, leurs activités fonctionnelles sont médiées par des cytokines anti-inflammatoires comme l'interleukine-10 (IL-10) et par des cytokines profibrosantes, comme le tissue Growth factor bêta (TGF- $\beta$ ) (Gordon, 2003) (**figure 11, b.**).

L'augmentation du nombre de macrophages dans le rein a été observée dans de nombreuses formes d'insuffisance rénale chronique (Ferrario et al., 1985; Sean Eardley and Cockwell, 2005). En effet, la production de médiateurs de l'inflammation comme la chimiokine MCP-1/CCL2 (Monocyte chemoattractant protein-1) et son récepteur CCL2R permet le recrutement massif de monocytes circulants vers le foyer de l'inflammation (Braga et al., 2018). Ces monocytes se différencieront en macrophages et proliféreront grâce au facteur de croissance CSF1 (colony-stimulating factor-1). Ils pourront ainsi adopter les différents phénotypes M1/M2 précédemment évoqués (Tang et al., 2019).

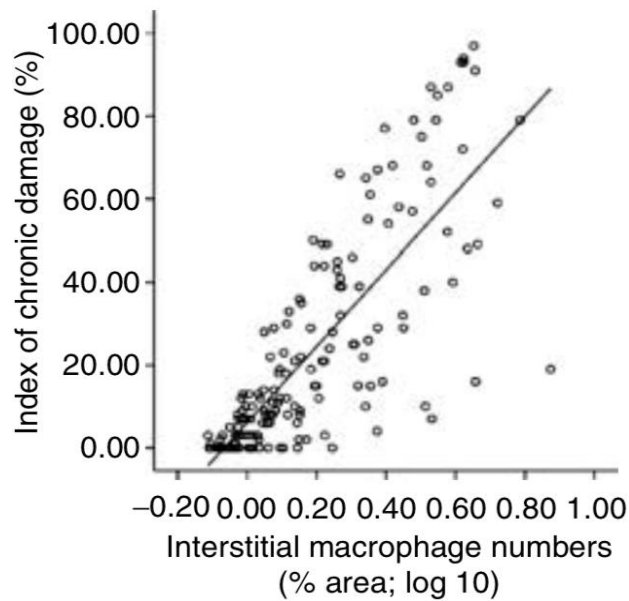


**Figure 11 : Maturation des macrophages** (Adaptée de Tang PMK et al., 2019)

**a)** Induction des macrophages M1 lors de l'inflammation **b)** Phénotypes et fonctions des macrophages suite à une atteinte rénale.

Des études suggèrent que les macrophages jouent un rôle important dans la médiation de l'inflammation et de la fibrose. En effet, suite à l'utilisation de liposomes enrichis avec du clodronate chez le rat (modèle d'ischémie/reperfusion) et la souris (modèle d'obstruction urétérale unilatérale (OUU)), l'infiltration macrophagique dans l'interstitium rénal est diminuée, réduisant l'inflammation et la fibrose tubulointerstitielle (Kitamoto et al., 2009; Ko et al., 2008). De plus, des études cliniques réalisées sur 215 patients atteints de maladies rénales chroniques, suggèrent que le degré d'infiltration des macrophages est en corrélation avec la gravité de la lésion rénale (Eardley et al., 2006, 2008) (**figure 12**). Ces études suggèrent un rôle pathogène des macrophages dans la maladie rénale. Ainsi, les macrophages sont des acteurs clés et incontournables dans l'inflammation associée à la fibrose tubulo-interstitielle. A noter que, cette pathogénicité des

macrophages dépend des signaux sécrétés au niveau rénal (Murray and Wynn, 2011). Pour exemple, les macrophages participent activement à l'élimination des cellules apoptotiques et nécrotiques pour résoudre les blessures et au remodelage de la matrice pour restaurer les tissus dans les maladies rénales aiguës et chroniques (Filardy et al., 2010; Huen and Cantley, 2015).



**Figure 12 : Corrélation entre les macrophages interstitiels et dommages chroniques (0,755 ;  $p < 0,001$ ).** (Adaptée de Eardley KS et al., 2006)

## **b. Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques appartiennent également à la famille des phagocytes mononucléés (Hettinger et al., 2013). Ces cellules dérivent des progéniteurs CDP (Common DC progenitor) de la moelle osseuse (Kurts et al., 2020). Ils existent deux types de cellules dendritiques différenciées dans les tissus : les cellules dendritiques conventionnelles CD1c et CD2c. Dans le rein, les plus abondants sont les CD2c (Stewart et al., 2019). Ces dernières sont capables, comme les

macrophages, de reconnaître et de détruire par phagocytose des débris cellulaires et des cellules en apoptose. Ces cellules sentinelles jouent également un rôle important dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T qui déclenche et régule la réponse immunitaire adaptative spécifique à l'antigène grâce aux complexes majeurs d'histocompatibilité (Mellman and Steinman, 2001; Fogg et al., 2006). Ces cellules résidentes sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  (Dong et al., 2007; Kurts et al., 2020).

Des études suggèrent que les cellules dendritiques jouent également un rôle important dans la médiation de l'inflammation et de la fibrose. En effet, Kitamoto et al. (2009) montrent dans leurs études que la déplétion des cellules dendritiques avec du clodronate, atténue l'apoptose tubulaire, diminue les taux de cytokines profibrosantes TGF- $\beta$ , diminuant ainsi l'inflammation et la fibrose. Cette étude suggère ainsi le rôle pathogène des cellules dendritiques dans l'inflammation associée à la fibrose tubulo-interstielle.

### **c. Les neutrophiles**

Les neutrophiles ou polynucléaires neutrophiles représentent 40 à 70% des leucocytes. Ces cellules de l'immunité innée sont localisées essentiellement dans la circulation sanguine. Ces cellules constituent la première ligne de défense contre les infections et sont de puissants médiateurs de l'inflammation. Ainsi, lors d'une inflammation, elles vont rejoindre le site inflammatoire par le processus de diapédèse (Mayadas et al., 2014). Elles sont capables d'initier les processus de phagocytose, de dégranulation et de destruction dépendante de la NADPH oxydase et de la myéloperoxydase, enzymes essentielles pour la production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ROS), de l'azote (RNS) et de l'acide hypochloreux (HOCl) (Homburg and Roos, 1996; Mayadas et al., 2014). Ces médiateurs vont amplifier l'inflammation, et notamment amplifier le stress oxydant qui est concomitant à celle-ci (Heinzelmann et al., 1999).

#### **d. Les lymphocytes T et B**

Les lymphocytes représentent 20 à 40% des leucocytes de l'organisme. Ils proviennent des cellules progénitrices lymphoïdes produites dans la moelle osseuse et le thymus. On distingue généralement deux classes : i) les lymphocytes B ou cellule-B dont le développement et la maturation se font dans la moelle osseuse et ii) les lymphocytes T ou cellule-T dont le développement se fait dans la moelle osseuse et la maturation dans le thymus. Une fois mature, les lymphocytes migrent dans les organes lymphoïdes secondaires (*i.e.* ganglions lymphatiques, rate) via le sang où ils seront activés s'ils rencontrent des antigènes spécifiques. D'une manière générale, les cellules dendritiques jouent un rôle important dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes (Larosa and Orange, 2008). En effet, les cellules dendritiques rejoignent les nœuds lymphatiques, où elles exposent l'antigène via les complexes majeurs d'histocompatibilités (CMH I ou II) se trouvant à leurs surfaces. Cet antigène exposé, est ensuite reconnu soit par les récepteurs des cellules T (TCR) ou soit par les récepteurs des cellules B (BCR). Cette interaction permet d'activer les lymphocytes. On parle de lymphocytes effecteurs. D'une vue simplifiée, les lymphocytes T activés, vont donner : les lymphocytes T-helper, possédant à leurs surfaces la glycoprotéine CD4, et les lymphocytes T cytotoxiques, possédant à leurs surfaces la glycoprotéine CD8 (Leahy, 1995). Selon le type de stimulus, les lymphocytes se différencient en l'un des 7 phénotypes connus : TH1, TH2, TH9, TH17, TH22, Tfh et Treg (Chatzileontiadou et al., 2021). Une fois leurs phénotypes acquis, ces derniers vont pouvoir moduler la réponse immunitaire adaptative. Pour exemple, les cellules Th1 sont principalement importantes pour la défense de l'hôte contre les agents pathogènes (*i.e.* virus, bactéries) (Szabo et al., 2003).

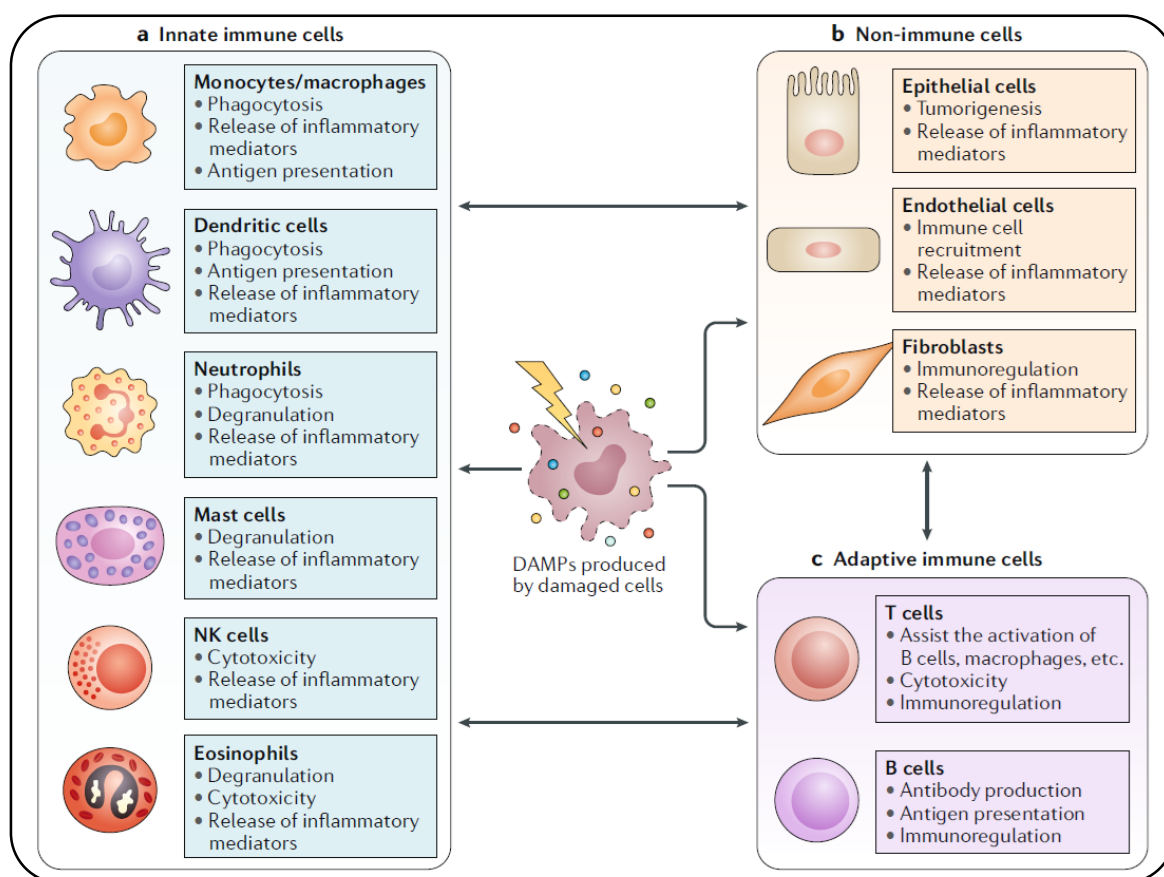
Dans le cadre de l'inflammation médiée au cours de la fibrose tubulointerstitielle, des études suggèrent que les lymphocytes jouent un rôle important dans ce processus inflammatoire. En effet, les lymphocytes TH-1 sont capables d'activer les macrophages via la sécrétion de cytokines pro-



inflammatoires comme l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) ou le facteur de nécrose tumorale (TNF) (Holdsworth et al., 1999).

Quant aux lymphocytes B, outre leurs rôles dans la production d'anticorps, ils semblent aggraver cette inflammation en favorisant le recrutement et l'infiltration de monocytes (Han et al., 2017) et de neutrophiles (Inaba et al., 2020).

Il est important de noter que d'autres cellules de l'immunité (*i.e.* Mastocytes, éosinophiles/basophiles) et des cellules non-immunitaires (*i.e.* Cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules endothéliales) participent à cette inflammation (**figure 13**).



**Figure 13 : Les acteurs cellulaires de l'inflammation stérile médiée lors de la fibrose tubulointerstitielle. (Adaptée de Gong TL et al., 2019)**

a) Les cellules de l'immunité innée. b) Les cellules non-immunitaires. c) Les cellules de l'immunité adaptative.

Une meilleure compréhension de l'implication des différents types de leucocytes et leurs cinétiques de recrutement dans le rein est essentielle à l'élaboration de stratégies thérapeutiques anti-inflammatoires dans la fibrose tubulointerstitielle.

### III.2.2 Stress oxydant

L'inflammation et le stress oxydant sont des processus interconnectés, perpétuant un cercle vicieux aboutissant à la progression de nombreuses pathologies (Dhalla et al., 2000; Himmelfarb, 2004; Elmarakby and Sullivan, 2012; Lushchak, 2014). Le stress oxydant joue un rôle important dans la pathogénèse de la maladie rénale chronique et sa progression vers l'insuffisance rénale terminale (Vodošek Hojs et al., 2020).

Le stress oxydant est défini comme un état de déséquilibre entre une production excessive d'espèces pro-oxydantes (*i.e* radicaux libres) et une dégradation insuffisante de ces dernières par des espèces antioxydantes endogènes (*i.e* superoxydes dismutases) (Sies, 2015). Il correspond à une dérégulation de l'homéostasie du statut redox.

Nous définirons par la suite les principales espèces pro-oxydantes et les différents effecteurs de la défense antioxydante endogène.

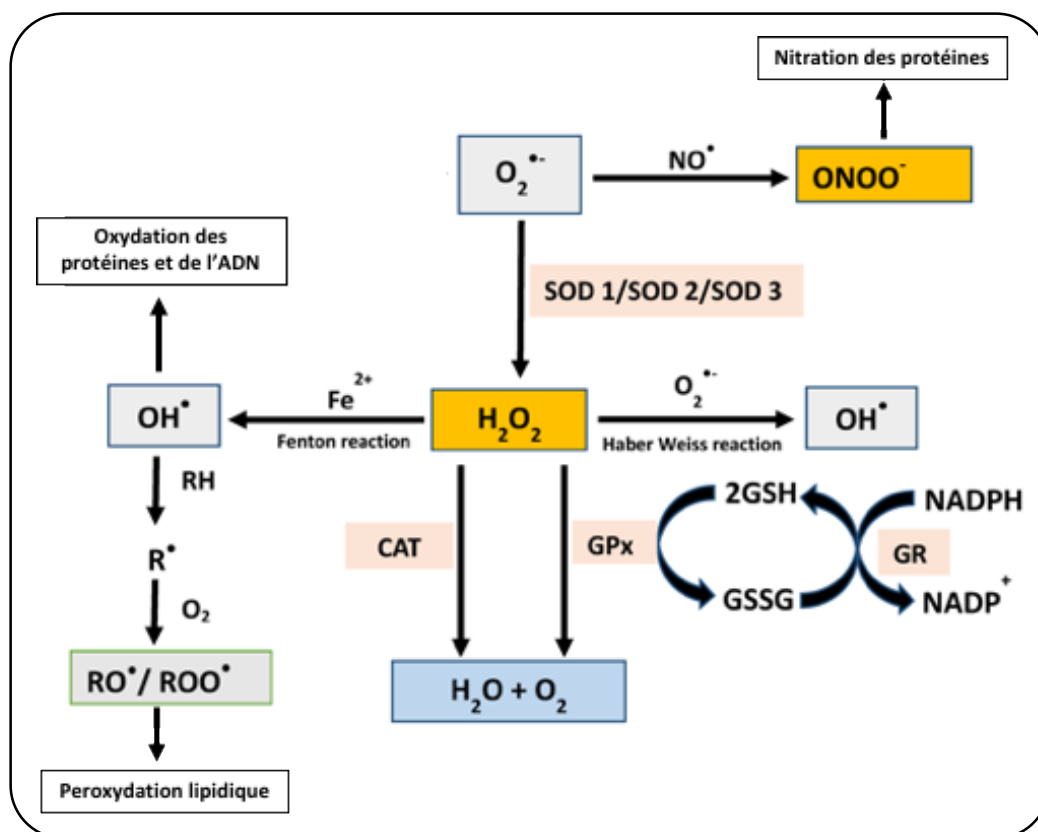
#### III.2.2.1 Les espèces pro-oxydantes

##### *III.2.2.1.1 Les espèces radicalaires et non-radicalaires*

Une espèce radicalaire ou radical libre est une espèce chimique (*i.e* atomes, ions, molécules) contenant un ou plusieurs électrons non appariés de type  $R^{\bullet}$ . Ce dernier très réactif, va réagir avec d'autres électrons non appariés pour former une espèce non-radicalaire de type R-R.

Ils existent différents types d'espèces radicalaires/non-radicalaires : i) les espèces réactives à l'oxygène (ROS), les plus abondantes et ii) les espèces réactives à l'azote (RNS). Parmi les principales espèces réactives à l'oxygène (ROS) sont retrouvés l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), le monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ), le radical dioxyde d'azote ( $NO_2^{\bullet}$ ) et des radicaux organiques dérivants des lipides ( $R^{\bullet}$ ,  $RO^{\bullet}$ ,  $ROO^{\bullet}$ ). Parmi les espèces non-radicalaires sont retrouvées le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ).

Les espèces réactives à l'azote (RNS) quant à eux comprennent des espèces radicalaires comme le monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ), le dioxyde d'azote ( $NO_2^{\bullet}$ ) et des espèces non-radicalaires comme le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), les nitrates  $NO_3^-$ , les nitrites  $NO_2^-$ , le trioxyde de diazote ( $N_2O_3$ ) et l'acide nitreux  $HNO_2$  (Daenen et al., 2019) (figure 14).



**Figure 14 : Régulation des espèces réactives à l'oxygène et leurs effets**  
(Adaptée de Ruiz Stacey et al., 2013)

Dans des conditions normales, à des concentrations faibles/modérées, les ROS et les RNS servent de seconds messagers et régulent ainsi de nombreux processus cellulaires comme la différenciation, la prolifération et l'apoptose. Ils jouent un rôle primordial dans la défense immunitaire. En effet, lors d'une inflammation liée à un pathogène, les leucocytes polymorphonucléaires (*i.e* neutrophiles) produisent des ROS afin de l'éliminer (Nguyen et al., 2017).

A contrario, si la production de ROS/RNS devient importante et si la défense endogène n'est plus suffisante pour retrouver l'homéostasie redox cela entraîne l'apparition d'un stress oxydant. Ce dernier conduit à l'oxydation/nitration des protéines, l'oxydation de l'ADN et à la peroxydation des lipides (Daenen et al., 2019). Certains de ces produits d'oxydation (**Tableau 3**) sont utilisés comme marqueurs de stress oxydant notamment dans la pathologie rénale (Vodošek Hojs et al., 2020). Witko-Sarsat V et ses collaborateurs ont montré que l'élévation de la concentration plasmatique d'AOPP (Advanced Oxidation Protein Products) chez des patients atteints de MRC était corrélée avec la perte de la fonction rénale (V et al., 1998).

### **Tableau 3 : Marqueurs du stress oxydant**

---

#### ***Oxydation des protéines***

Advanced oxidation protein products (AOPPs)

Advanced glycation end products (AGEs)

Carbonyles

#### ***Peroxydation des lipides***

Malondialdehyde (MDA)

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARSs)

4-hydroxynonenal (HNE)

F2-isoprostanés

#### ***Oxydation de l'ADN***

8-hydroxyguanosine (8-OHG)

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)

---

### III.2.2.1.2 Source des ROS

La production de ROS peut être médiée par des réactions enzymatiques et non enzymatiques (Birben et al., 2012). L'anion superoxide  $O_2^{\bullet-}$  est formé par diverses enzymes comme les NADPH (nicotine adenine dinucleotide phosphate) oxydases, les acides aminés oxydases et les xanthines oxydases. La mitochondrie est la source principale d'anion superoxide via la chaîne respiratoire mitochondriale (Lushchak, 2014). Il est important de noter que le péroxisome et le reticulum endoplasmique produisent aussi des  $O_2^{\bullet-}$ . Cet anion superoxide est convertit en peroxyde d'hydrogène par la superoxide dismutase. En présence d'ions métalliques (*i.e*  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$ ), le peroxyde d'hydrogène va donner des radicaux hydroxyles  $OH^{\bullet}$  via les réactions de Haber-weiss et de Fenton (figure 15).

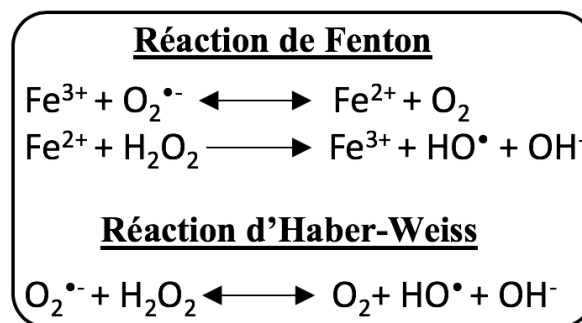


Figure 15 : Réactions de Fenton et d'Haber-Weiss

Il est intéressant de noter que dans le cadre de la fibrose tubulo-interstitielle, les NADPH oxydases (NOX-2, NOX-4) sont surexprimées (Bondi et al., 2010; Barnes and Gorin, 2011). L'inhibition de ces NADPH oxydases dans un modèle murin d'obstruction urétérale unilatérale induit une diminution de la fibrose (Kim et al., 2015).

### III.2.2.2 La défense antioxydante

Pour réguler la production de pro-oxydant, notre organisme possède une variété d'antioxydants. Ils sont divisés en deux catégories : i) les antioxydants enzymatiques dont la superoxide dismutase (SOD), la catalase (CAT), et la glutathione peroxidase (GPx) et ii) les antioxydants non enzymatiques comme les vitamines (i.e vitamines C et E), le glutathion (GSH), les caroténoïdes (i.e  $\beta$ -carotène) et les polyphénols.

Seuls les antioxydants enzymatiques étudiés durant cette thèse seront détaillés.

#### III.2.2.2.1 Anti-oxydants enzymatiques

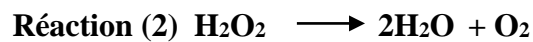
##### a. La superoxide dismutase

La superoxide dismutase (SOD) fait partie des enzymes antioxydantes les plus importantes dans la détoxification des radicaux libres. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et en dioxygène ( $O_2$ ) (**réaction 1**) (McCord and Fridovich, 1969). Cette enzyme existe sous trois formes qui diffèrent selon la nature de l'ion métallique ainsi que la localisation cellulaire : i) la SOD à cuivre-Zinc (Cu/Zn-SOD ou SOD-1) localisée dans le cytosol, ii) la SOD à manganèse (Mn-SOD ou SOD-2) localisée dans les mitochondries et iii) la SOD extracellulaire (EC-SOD ou SOD-3).



## b. La catalase

La catalase permet la conversion du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en dioxygène (O<sub>2</sub>) et eau (H<sub>2</sub>O) (**réaction 2**). Cette enzyme est composée de quatre chaînes polypeptidiques comportant chacune une molécule d'hème. Chaque sous unité est liée à la NADPH afin de la protéger contre le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) afin qu'elle reste active (Kirkman et al., 1999; Zelko et al., 2002).



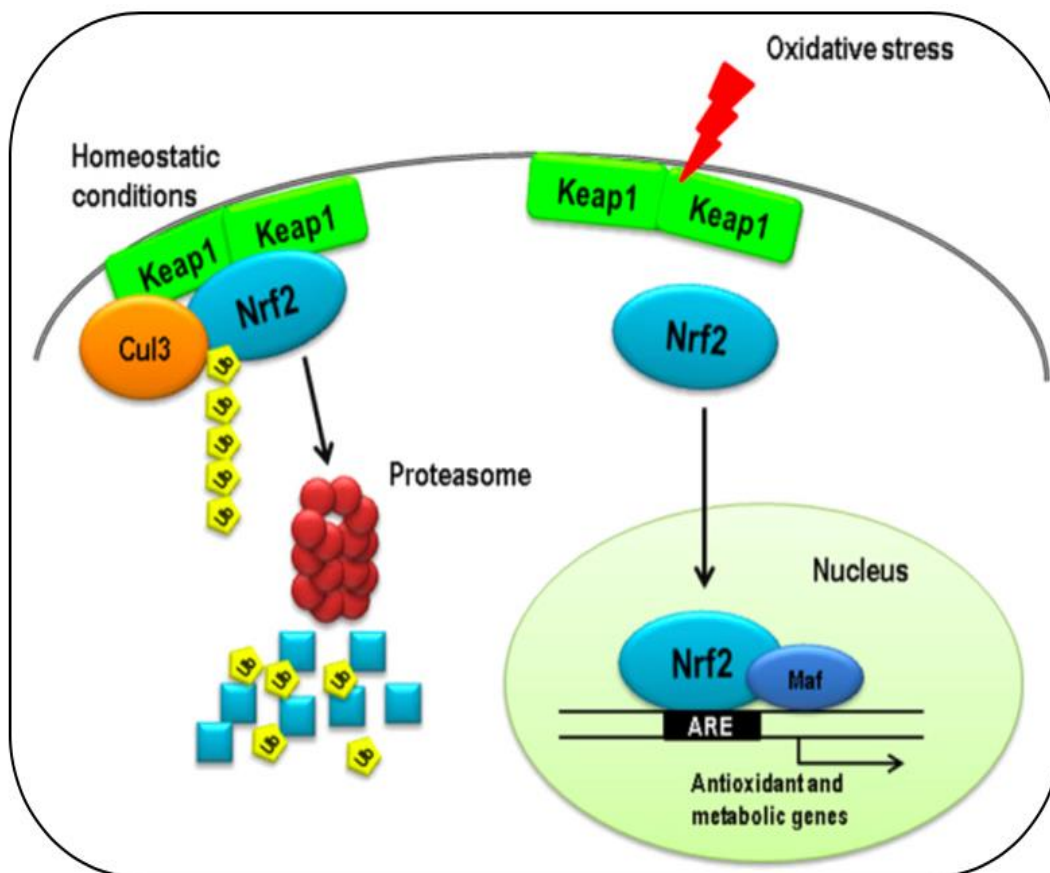
## c. Les glutathiones peroxydases

Les glutathiones peroxydases sont des enzymes importantes car elles vont neutraliser les effets néfastes du peroxyde d'hydrogène. Elles sont Sélénio-dépendantes et permettent la réduction du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et des peroxydes organiques (ROOH) en H<sub>2</sub>O grâce à l'oxydation du glutathion (GSH) (**réaction 3**). Il existe différentes formes de glutathione peroxydase comme la GPX-1, une enzyme tétramérique, ubiquitaire et localisée dans le cytosol et les mitochondries et la GPX-3, localisée dans le compartiment extracellulaire (Arthur, 2000).



Ces enzymes antioxydantes confèrent à notre organisme une protection endogène contre le stress oxydant dont l'impact dans les pathologies n'est plus à démontrer. Il est important de noter que la régulation de l'expression de ces enzymes se fait grâce à un facteur de transcription, le Nrf2 (Nuclear factor erythroid-related factor2) (Itoh et al., 1997). En condition physiologique, ce facteur

de transcription forme dans le cytosol un complexe avec Keap-1 (Kelch-like erythroid cell-derived protein) où il est ubiquitinylé puis dégradé par le protéasome. En présence de ROS, les groupements thiols présent sur Keap-1 sont modifiés, ce qui déstabilise sa conformation et libère Nrf2 qui est transloqué dans le noyau. Dans le noyau, Nrf2 interagit avec le domaine ARE (Antioxidant Response Element) et initie la transcription de gènes codant pour les enzymes antioxydantes (**figure 16**) (Itoh et al., 1997; Jaramillo and Zhang, 2013).



**Figure 16 : Voie de signalisation Nrf2-Keap1** (Adaptée de Bellezza I et al., 2018)

En condition physiologique, Nrf2 forme un complexe avec Keap-1 puis il est ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. En présence de ROS, les groupements thiols présent sur Keap-1 sont modifiés, ce qui libère Nrf2 qui est transloqué dans le noyau. Dans le noyau, Nrf2 interagit avec le domaine ARE (Antioxidant Response Element) et initie la transcription de gènes codant pour les enzymes antioxydantes.



### III.2.3 Les Myofibroblastes

L'inflammation médiée par l'infiltration des cellules immunitaires ainsi que la sécrétion continue de cytokines pro-inflammatoires et profibrosantes (*i.e* TGF- $\beta$ , PDGF...) dans l'interstitium conduisent à l'activation de cellules rénales résidentes en cellules sécrétrices de matrices extracellulaires appelées myofibroblastes.

#### III.2.3.1 Une cellule, plusieurs origines

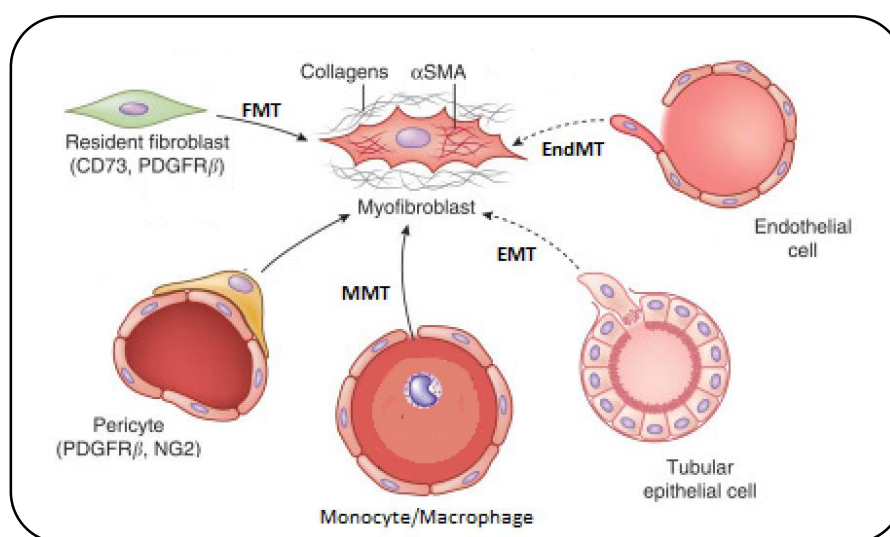
Les myofibroblastes sont des cellules spécialisées, aux propriétés contractiles qui sont essentiellement issues de fibroblastes interstitiels résidents (Meran and Steadman, 2011; LeBleu et al., 2013; Mack and Yanagita, 2015). Ces cellules ont été identifiées pour la première fois par microscopie électronique dans la contracture de Dupuytren (Gabbiani and Majno, 1972). Elles combinent les caractéristiques fonctionnelles des fibroblastes et les propriétés contractiles des cellules musculaires lisses. En effet, ces cellules synthétisent et sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire comme de la fibronectine, des fibres de collagènes de type I et III et expriment l' $\alpha$ -actine des muscles lisses ( $\alpha$ -SMA) qui constitue les fibres de stress. Même si l' $\alpha$ -SMA est exprimée au niveau des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins du rein, une expression *de novo* de celle-ci est observée dans l'interstitium du rein fibrosé (Campanholle et al., 2013) ; ce qui en fait un marqueur incontournable des myofibroblastes. Ainsi, les myofibroblastes sont des cellules effectrices clés dans la pathogénèse de la fibrose tubulo-interstielle (Strutz and Zeisberg, 2006). Néanmoins, leurs origines restent à ce jour un sujet de controverse. Des études de suivies de marqueurs cellulaires (**tableau 4**) et l'utilisation de souris génétiquement modifiées (système Cre-Lox) (LeBleu et al., 2013) suggèrent que d'autres cellules précurseurs contribuent à l'apparition des myofibroblastes dans l'interstitium du rein. En effet, ces cellules peuvent provenir de cellules épithéliales des tubules par le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Grgic et

al., 2012), de cellules endothéliales par le processus de transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT) (Zeisberg et al., 2008), de péricytes (cellules présentes autour de l'endothélium des vaisseaux) (Humphreys et al., 2010) et de macrophages par la transition macrophage-myofibroblastes (MMT) (Wang et al., 2017b) (Figure 17).

**Tableau 4. Caractéristiques et marqueurs des cellules interstitielles du rein** (Adaptée de Falke LL et al., 2015)

Cell type	Marker*						Function	Feature
	$\alpha$ SMA	PDGFR $\beta$	S100	NT5E	DES	VIM		
Fibroblast	x	✓	✓	✓	x	✓	ECM maintenance and structural support to the parenchyma	Interstitial In contact with the epithelium and epithelial basal membrane
Myofibroblast	✓	✓	✓	✓	x	✓	Wound contraction Tissue healing response	Absent under physiological conditions Present in the interstitium under pathological conditions
Pericyte	✓	✓	x	✓	✓	✓	Vascular stability Production of VEGFA Chemical and/or mechanical sensation	Interstitial In contact with the endothelium and endothelial basement membrane
VSMC	✓	✓	✓	x	✓	✓	Regulating vascular wall tonus	Medial layer of blood vessels

\*Owing to the overlap of marker expression, only ultrastructural analysis can discriminate between these four interstitial cell types. Other cell types, such as leucocytes, also express these markers. Abbreviations:  $\alpha$ SMA, aorta smooth muscle actin; DES, desmin; ECM, extracellular matrix; NT5E, 5'-nucleotidase (CD73); PDGFR $\beta$ , platelet-derived growth factor receptor,  $\beta$ ; S100A4, S100 calcium binding protein A4; VEGF, vascular endothelial growth factor A; VIM, vimentin; VSMC, vascular smooth muscle cell.



**Figure 17 : Les origines du myofibroblaste** (Adaptée de Mack M et al., 2015)

**FMT:** Fibroblast-Myofibroblast Transition; **MMT:** Macrophage-Mesenchymal Transition; **EMT:** Epithelio-Mesenchymal Transition; **EndMT :** Endothelio-Mesenchymal Transition

A noter qu'une étude récente réalisée par Kuppe C *et al.* suggère grâce à des analyses de transcriptomiques spatiales (réalisées sur des reins fibrosés) que les cellules sécrétrices de matrices (les myofibroblastes) proviennent bien des fibroblastes et des péricytes (Kuppe *et al.*, 2021). La différenciation des cellules en myofibroblastes et/ou l'acquisition d'un phénotype myofibroblastique sont influencées par la présence de niches fibrotiques (Yuan *et al.*, 2019).

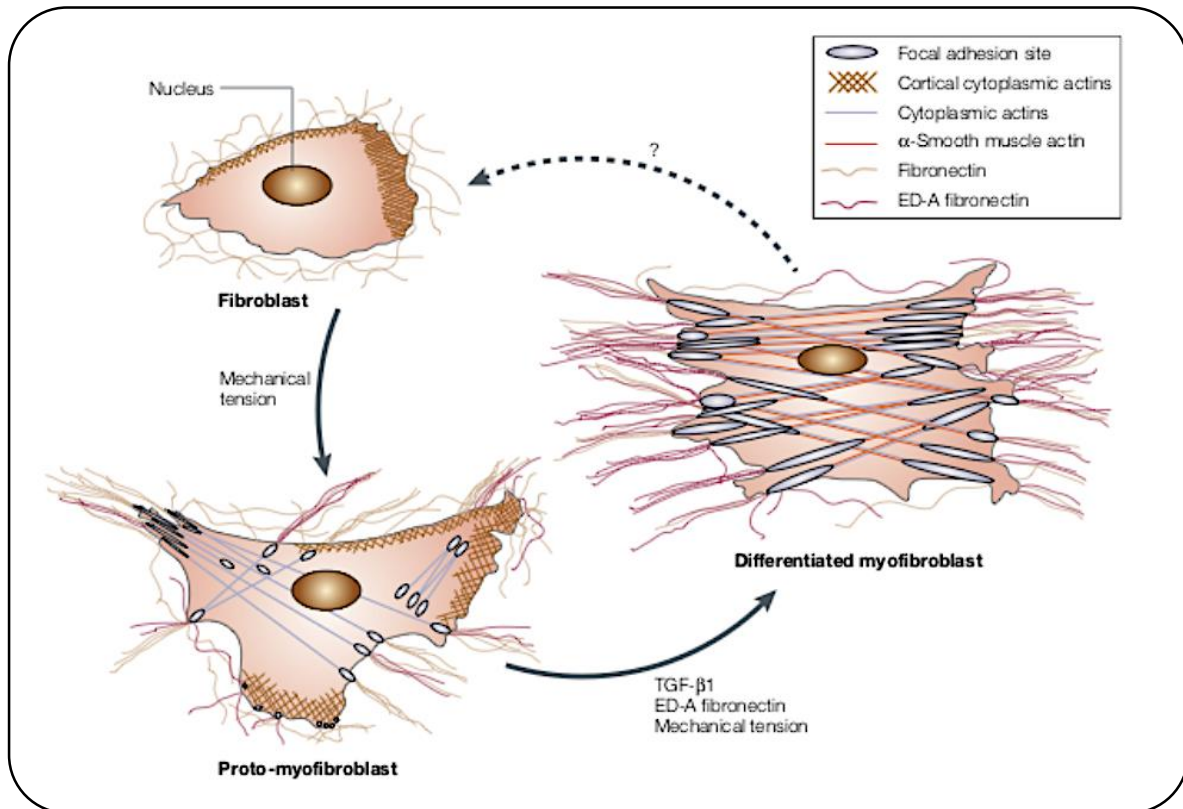
#### *III.2.3.1.1 Différenciation des fibroblastes en myofibroblastes*

Les fibroblastes résidents quiescents sont des cellules mésenchymateuses aplaties, allongées, fusiformes qui possèdent un noyau aplati et un petit réticulum endoplasmique. Ce sont des cellules ubiquitaires, retrouvées dans tous les tissus/organes de notre corps. Elles sont essentielles pour le maintien normal de l'architecture des tissus. Dans des conditions physiologiques, elles participent à la production de constituants de la MEC, d'enzymes protéolytiques (*i.e* métalloprotéinases matricielles) et d'inhibiteurs de ces enzymes (*i.e* TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteases), PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor -1)) leurs permettant de réguler l'organisation de la matrice extra cellulaire (MEC).

Dans le cadre de la fibrose tubulointerstitielle, ces cellules peuvent acquérir un phénotype dit « activé/pro-fibrotique » avec un noyau composé d'un ou deux nucléoles, un réticulum endoplasmique granuleux étendu reflétant leur capacité à synthétiser de manière massive les constituants de la MEC. Ces fibroblastes activés sont nommés myofibroblastes. Cette activation peut se faire par le biais de : i) médiateurs profibrosants (*i.e* TGF $\beta$ , PDGF...), ii) interactions entre MEC et intégrines ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et iii) signaux environnants (*i.e* hyperglycémie, ROS, hypoxie) (Gabbiani and Majno, 1972; Zeisberg and Neilson, 2010; Zeisberg and Kalluri, 2015).

La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes se fait de manière séquentielle par l'acquisition d'un phénotype intermédiaire appelé proto-myofibroblaste (Desmoulière *et al.*, 2005).

Les proto-myofibroblastes sont caractérisés par la présence d'un variant de la fibronectine (FN), l'ED-A (Extra Domain A) qui n'est pas exprimé par les fibroblastes. Ce phénotype proto-myofibroblastique est acquis en réponse à une tension mécanique de la MEC environnante. En effet, le cytosquelette d'actine des proto-myofibroblastes composé d'actines cytoplasmiques (de types  $\gamma$  et  $\beta$ ) va s'associer à des protéines contractiles comme la myosine II non-musculaire. Cette association induit une augmentation de la tension mécanique aux extrémités des fibres de stress aboutissant à la formation de points focaux d'adhésions matures composés d'intégrines et de protéines de liaisons d'actines qui forment le fibronexus (Tomasek et al., 2002; Hinz et al., 2003). Ce complexe permet l'adhésion cellule-MEC et de générer une force contractile. Les filaments d'actines sont ancrés à la membrane plasmique et se prolongent en au niveau extracellulaire par des fibres de fibronectine qui sont liés aux fibres de collagènes de la MEC (Hinz, 2006). Ce phénotype proto-myofibroblaste combiné avec la présence de cytokines profibrosantes (*i.e* TGF $\beta$ ,) issues des cellules environnantes (cellules inflammatoires ou résidentes) entraînent une réorganisation et une redistribution du cytosquelette d'actine, conduisant à l'incorporation d' $\alpha$ -SMA dans les fibres de stress ainsi qu'à la formation de points focaux d'adhésions super-matures (composés de tensine, d' $\alpha$ -SMA, d'ED-A fibronectine extracellulaire et d'intégrines  $\alpha 5\beta 6$ ). Ces modifications permettent l'acquisition d'un phénotype de myofibroblastes différenciés capable de sécréter de la matrice péri-cellulaire composée de collagènes et de protéoglycanes (Tomasek et al., 2002). Ce processus de transition fibroblastes en myofibroblastes est illustré en **figure 18**.



**Figure 18 : Étapes de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes.** (Adaptée de Tomasek J et al., 2002)

Les fibroblastes interstitiels se caractérisent par la production de fibronectine et l'absence de filaments d'actines, d' $\alpha$ -SMA et d'ED-A fibronectine. Sous une tension mécanique, les fibroblastes produisent l'ED-A fibronectine, contiennent des fibres de stress et des points focaux d'adhésions et deviennent des pro-myofibroblastes. En présence de cytokines profibrosantes (*i.e* TGF- $\beta$ ) ces derniers synthétisent l' $\alpha$ -SMA, produisent de manière abondante l'ED-A fibronectine et deviennent des myofibroblastes. La transition du fibroblaste en proto-myofibroblaste est réversible (trait plein) alors que la redifférenciation des myofibroblastes en fibroblastes semble être irréversible.

### III.2.3.1.2 La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et/ou transition épithélio-mésenchymateuse partielle (TEMP) ?

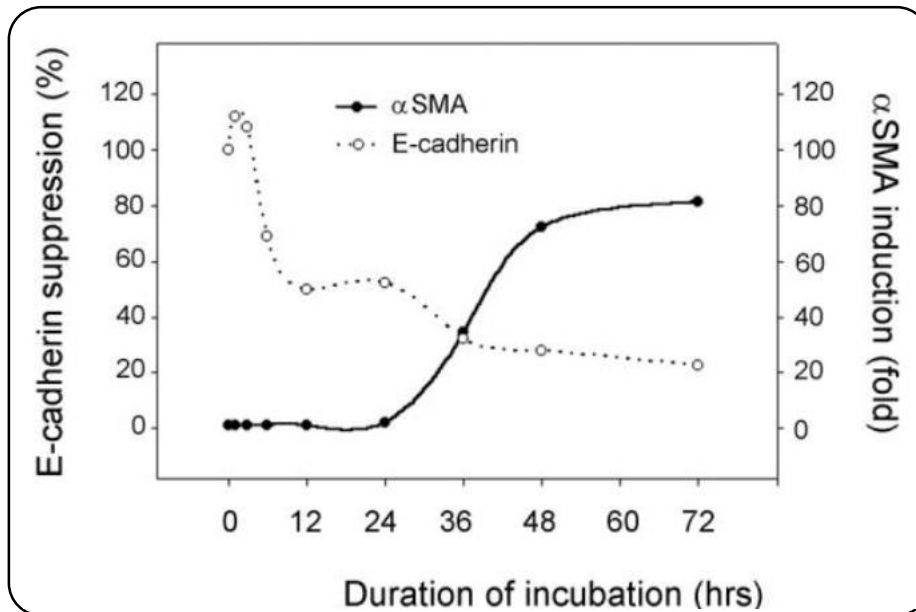
La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus cellulaire durant lequel les cellules épithéliales adoptent un phénotype de cellules mésenchymateuses. Celui-ci est caractérisé par une perte des marqueurs des cellules épithéliales (*i.e* E-cadhérine) et l'acquisition de marqueurs de

cellules mésenchymateuses (*i.e* N-cadhérine, vimentine) aboutissant à un phénotype myofibroblastique exprimant l' $\alpha$ -SMA et la fibronectine (Liu, 2004).

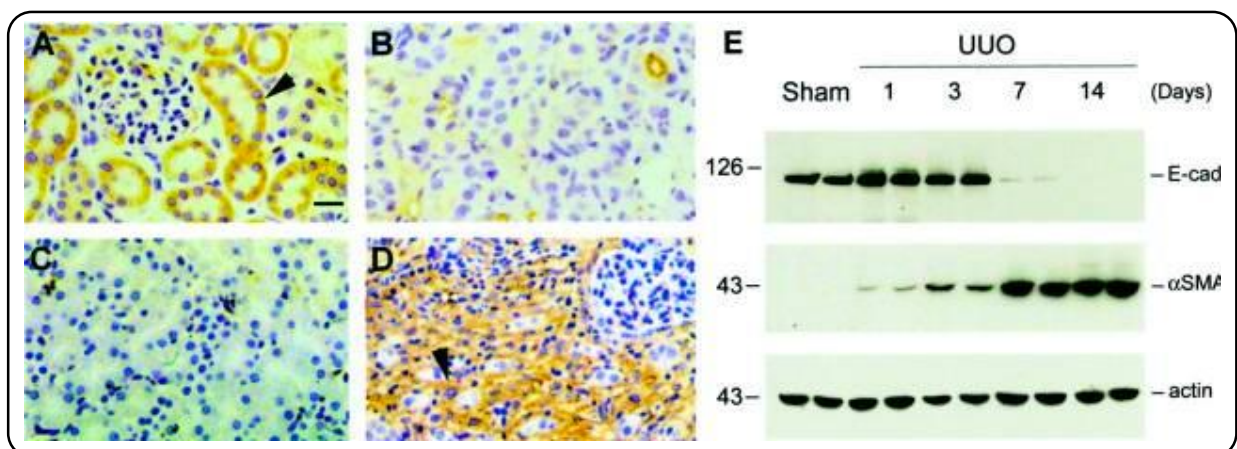
Au niveau rénal, ce concept a été mis en évidence lors d'études *in vitro* et *in vivo* (Yang and Liu, 2001; Iwano et al., 2002). C'est un processus dynamique dont le déroulement est divisé en quatre étapes : **i)** Perte des jonctions cellule-cellule (*i.e* E-cadhérine, Zonula-Occludens-1 (ZO-1)), entraînant une dépolarisation des cellules. **ii)** Réorganisation du cytosquelette d'actine : l'expression croissante *de novo* d' $\alpha$ -SMA induit le remplacement du cytosquelette de filaments intermédiaires constitués de cytokératines par la vimentine. **iii)** Digestion de la membrane basale : synthèse et sécrétion de métalloprotéinases matricielles de type 2 et 9 (MMP-2 et 9) qui vont digérer le collagène de type IV et la laminine constitutifs de la membrane basale. **iv)** Migration, infiltration/sécrétion de constituants de la MEC dans l'interstitium rénal aggravant ainsi la progression de la fibrose.

Dans leurs étude, Yang J et ses collaborateurs (Yang and Liu, 2001) ont mis en évidence la diminution progressive de l'expression de la E-cadhérine et l'augmentation progressive de l'expression d' $\alpha$ -SMA en traitant des cellules épithéliales (rénales) du tubule proximal avec du TGF- $\beta$  (pro-fibrosant) (**figure 19**) et en utilisant un modèle d'Obstruction Urétérale Unilatérale murin (modèle accéléré de fibrose) (**Figure 20**).





**Figure 19 :** Représentation graphique des abondances relatives de l'E-cadhérine et de l'α-SMA après traitement au TGF-β1 des cellules épithéliales rénales. (Adaptée de Yang J et al., 2001)



**Figure 20 :** Micrographies représentatives montrant les modifications du profil d'expression protéique de la E-cadhérine et de l'α-SMA après OUU. (Adaptée de Yang J et al., 2001)

**A et C :** Souris SHAM. **B et D :** Souris OUU. **A et B :** E-cadhérine. **C et D :** α-SMA. Les pointes de flèche indiquent des cellules colorées positivement. **E :** Western blot démontre une modification en fonction du temps dans l'expression de la E-cadhérine et de l'α-SMA dans les reins obstrués après OUU.

Des études cliniques suggèrent également que la TEM semble jouer un rôle dans la pathogénèse de la fibrose rénale. En effet, l'absence de cytokératines, de zonula occludens 1 ainsi que la présence de marqueurs de cellules mésenchymateuses (phénotype myofibroblastique) comme la vimentine et du collagène de type I ont été observés sur des biopsies de rein issues de patients atteints de la maladie rénale chronique (Rastaldi et al., 2002).

Le concept de TEM est actuellement très débattu par la communauté scientifique. Malgré la présence de marqueurs de la TEM et du marqueur de fibroblaste (FSP1) au niveau de l'interstitium, il semblerait que ceux-ci soient également retrouvés au niveau de la membrane basale des tubules (LeBleu et al., 2013; Rastaldi et al., 2002). Un nouveau concept semble émerger, celui de la transition épithélio-mésenchymateuse partielle (Grande et al., 2015). En effet, des études récentes ont démontré que suite à une lésion au niveau des cellules épithéliales des tubules que ces derniers subissent un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. Cela a pour conséquence de diminuer l'expression des marqueurs épithéliaux et d'augmenter la sécrétion de cytokines profibrosantes afin de favoriser l'activation des fibroblastes résidants en myofibroblastes (Yang et al., 2010; Lovisa et al., 2016). Ce processus de TEM partielle semble être régulé par le facteur de transcription Snail1 (Snail family zinc finger) (Grande et al., 2015).

#### *III.2.3.1.3 La transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT)*

La transition endothélio-mésenchymateuse est un processus cellulaire durant lequel les cellules endothéliales adoptent un phénotype de cellules mésenchymateuses. Du fait que les cellules endothéliales soient des cellules épithéliales spécifiques qui tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins, ce processus est assimilé à une forme de TEM. L'EndMT a été décrite pour la première fois dans le cadre de l'embryogenèse du cœur (Eisenberg and Markwald, 1995).

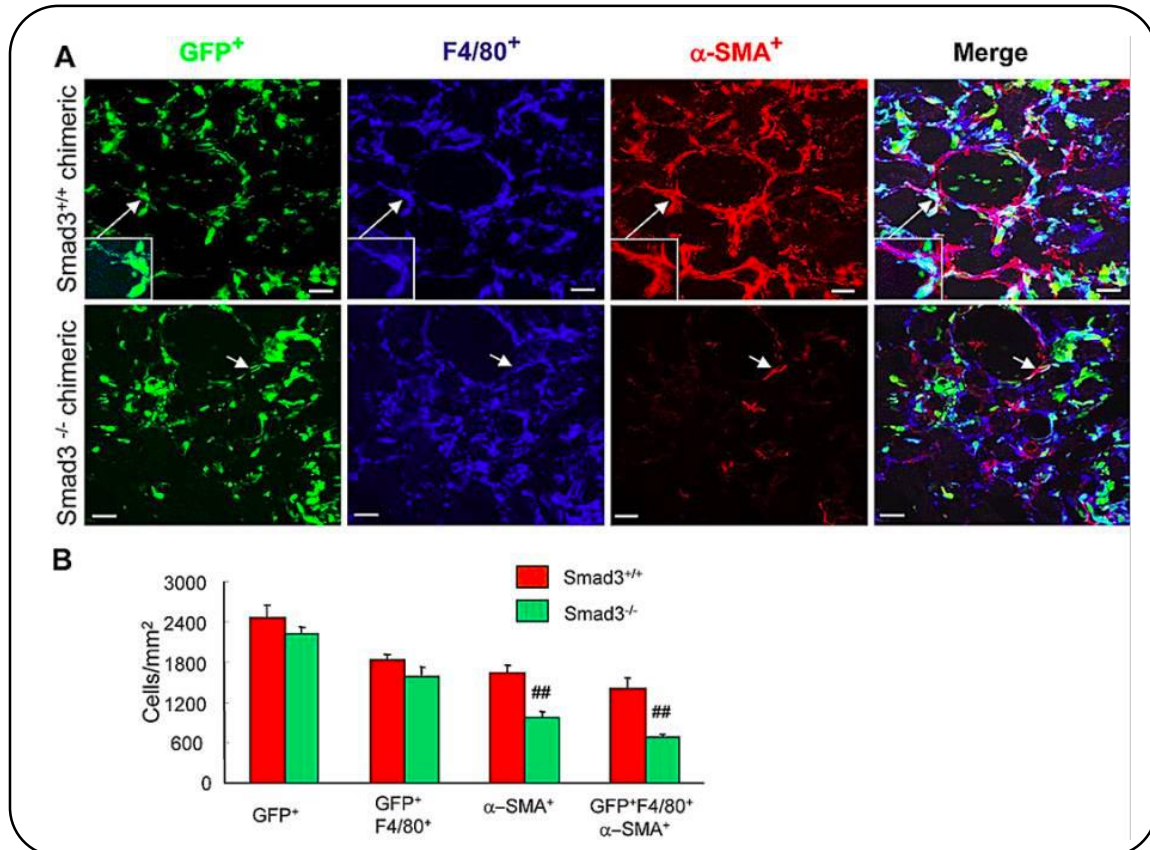


Ce processus contribue également à la pathogénèse de la fibrose rénale. En effet, *Zeisberg et al.* ont montré grâce à différents modèles murin de néphropathies qu'environ 30 à 50 % des myofibroblastes présents dans l'interstitium co-expriment CD31 (marqueur de cellules endothéliales), FSP1 et l' $\alpha$ -SMA (*Zeisberg et al., 2008*). Cette co-expression a également été observée sur des biopsies de rein de patients atteints de MRC (*Deng et al., 2016*). Ces études suggèrent fortement que les cellules endothéliales jouent un rôle important dans l'apparition des myofibroblastes associés à la fibrose tubulointerstitielle. La transition endothélio-mésenchymateuse pourrait être un processus clé dans la raréfaction des vaisseaux sanguins observée suite à une hypoxie dans la maladie rénale chronique (*Ballermann and Obeidat, 2014*).

#### *III.2.3.1.4 La transition macrophage-myofibroblaste*

La transition macrophage-myofibroblaste (TMM) est un processus cellulaire durant lequel les macrophages issus des monocytes dérivés de la moelle osseuse « adoptent » un phénotype myofibroblastique (*Wang et al., 2015a; Meng et al., 2016a; Wang et al., 2017b*). Ce nouveau concept a été décrit pour la première fois en 2015 par l'équipe de Hui-Yao Lan. Les auteurs ont utilisé des souris qui ont été irradiées afin de pouvoir injecter des cellules de moelle osseuse fluorescentes (GFP<sup>+</sup>) issus de souris transgénique. Après avoir réalisé une obstruction urétérale unilatérale sur ces souris chimériques, ils ont pu mettre en évidence la co-expression d' $\alpha$ -SMA, du F4/80 (marqueur de macrophages chez la souris) et de la GFP (cellules de moelle osseuse fluorescentes) suggérant ce processus de TMM. En utilisant le même design expérimental les auteurs ont injecté des cellules de moelle osseuse fluorescentes (GFP<sup>+</sup>) issus de souris KO (Knock Out) Smad3<sup>-/-</sup>/GFP<sup>+</sup> ou Smad3<sup>+/+</sup>/GFP<sup>+</sup>. Après avoir réalisé une obstruction urétérale unilatérale sur ces souris chimériques, ils ont observé une diminution de la co-expression d' $\alpha$ -SMA, du F4/80 et de la GFP chez les souris Smad3<sup>-/-</sup>/GFP<sup>+</sup> suggérant que ce processus de TMM était médié par la voie de signalisation TGF- $\beta$ /Smad3 (*Wang et al., 2015a*) (**figure 21**). Ce phénomène de TMM a

également été observé sur des biopsies de rein issue de patients atteints de MRC (Meng et al., 2016a).



**Figure 21 : Mise en évidence de la transition macrophage-myofibroblaste dans la FTL.** (Adaptée de Wang S et al., 2016)

(A) Microscopie confocale montrant les cellules GFP<sup>+</sup> (green), α-SMA<sup>+</sup> (red, myofibroblastes) et F4/80<sup>+</sup> (blue, macrophages) chez les souris GFP+Smad3<sup>+/+</sup> + OUU et GFP+Smad3<sup>-/-</sup> + OUU  
 (B) Quantification des analyses de microscopie confocale dans les reins obstrués (n = 6).

### III.2.4 Accumulation de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est une structure tridimensionnelle dynamique composée de fibres (*i.e* fibre de collagène), de glycoprotéines (*i.e* fibronectine), de protéoglycanes (*i.e* décorine)

et de polysaccharides (*i.e* glycosaminoglycanes (GAGs)). Elle permet le maintien de l'architecture des organes, l'homéostasie tissulaire et l'adhérence des cellules (Bonnans et al., 2014).

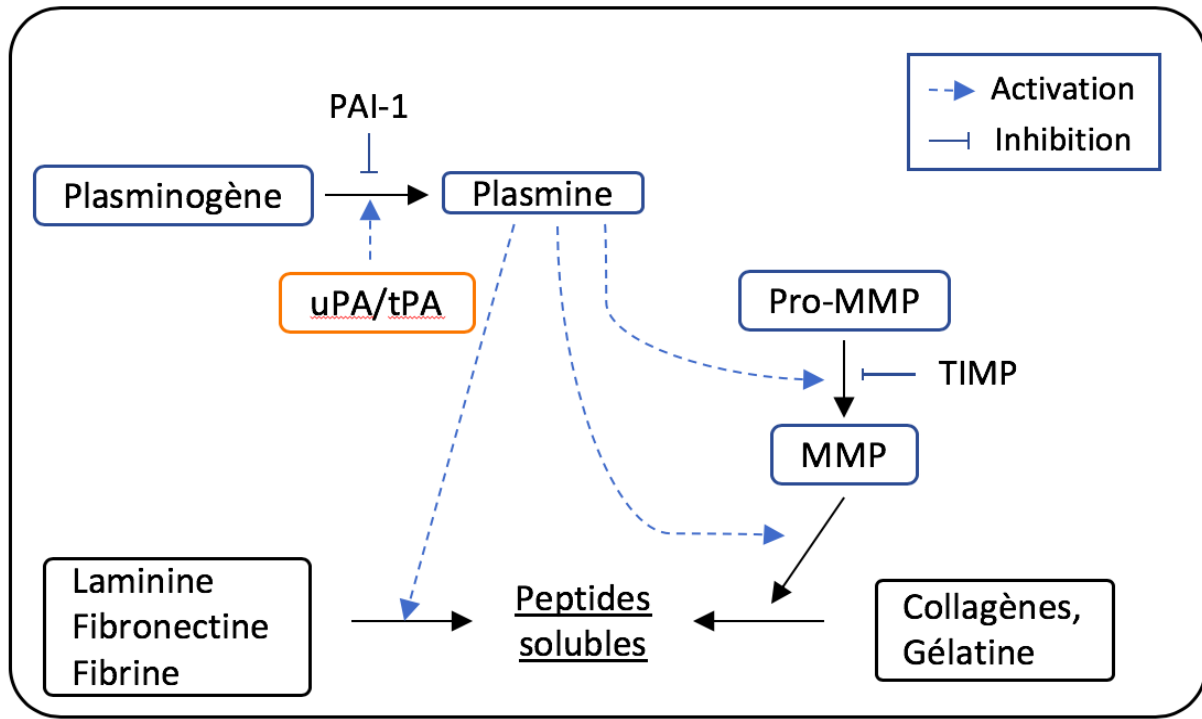
L'accumulation de la MEC est dépendante de deux processus : **i**) la production et **ii**) la dégradation.

Dans le contexte de fibrose tubulo-interstielle, la MEC s'accumule dans l'interstitium. Les myofibroblastes sont les principales cellules responsables de la synthèse de la MEC. En effet, quel que soit leur origine, sous l'action de cytokines profibrosantes (*i.e* TGF- $\beta$ , Connective-tissue Growth factor (CTGF)), les myofibroblastes vont synthétiser et sécréter de manière importante différents constituants de la MEC (*i.e* majoritairement la fibronectine et les collagènes de types I et III) (Eddy, 2005). Plus la fibrose progresse, plus la MEC est modifiée. Des enzymes comme la lysyl oxidase-like 2 (lox12) et la transglutaminase tissulaire 2 (tg2) vont induire des liaisons covalentes entre les fibres de collagènes et les protéines de la MEC, rendant ce réseau de matrice interstitiel plus rigide et plus résistant à la protéolyse (Smith-Mungo and Kagan, 1998; Johnson et al., 2003). A noter qu'une surexpression de la transglutaminase tissulaire 2 a été montrée sur des biopsies rénales de patients atteints de MRC et que celle-ci est positivement corrélée à la sévérité de la fibrose rénale (Johnson et al., 2003).

En parallèle de cette synthèse de MEC, les myofibroblastes vont synthétiser et sécréter des inhibiteurs des metalloprotéases matricielles (MMP) dont le rôle est de dégrader la MEC: **i**) les TIMP (tissue inhibitor of metalloprotease), inhibiteurs des métalloprotéinases (MMP) et **ii**) PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et de l'urokinase (u-PA) dont la fonction est de générer la plasmine qui à son tour va activer les pro-MMPs en MMPs actives. Ces inhibiteurs vont diminuer le taux de dégradation de la MEC amplifiant le phénomène d'accumulation de la MEC (**figure 23**) (Edwards et al., 1987).

En conditions pathologiques, cette accumulation continue de MEC conduit à une augmentation progressive du volume de l'interstitium éloignant physiquement les néphrons des vaisseaux

conduisant à une perte progressive des néphrons fonctionnels et finalement aboutissant à la perte de la fonction rénale (Zeisberg and Kalluri, 2015).



**Figure 23 : Dégradation des protéines de la MEC par le système fibrinolytique et métalloprotéinases**

L'uPA catalyse la transformation du plasminogène en plasmine. La plasmine participe à la dégradation de la fibrine et de certaines protéines matricielles, mais aussi à l'activation de la majorité des pro-MMP en MMP. La plasmine inhibe l'activation du plasminogène en plasmine et les TIMPs inhibent l'activation des pro-MMP en MMP ce qui a pour effet d'induire une accumulation de la MEC. u-PA/t-PA : activateurs du plasminogène; PAI-1 : inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 ; Pro-MMP : pro-métalloprotéases ; MMP : métalloprotéinases ; TIMP : inhibiteurs des MMP.

### III.2.5 TGFβ1 : le médiateur clé de la fibrose tubulo-interstielle

Le TGF-β (Transforming Growth Factor-β) est la cytokine la plus profibrosante connue et elle joue un rôle majeur dans le processus de fibrose rénale. Le TGF-β va pouvoir moduler plusieurs

réponses biologiques comme l'apoptose, la chimiotaxie, la prolifération, la différenciation ainsi que la synthèse de la MEC (Isaka et al., 1993; Sato et al., 2003; Gentle et al., 2013; Moses et al., 2016) (figure 22).

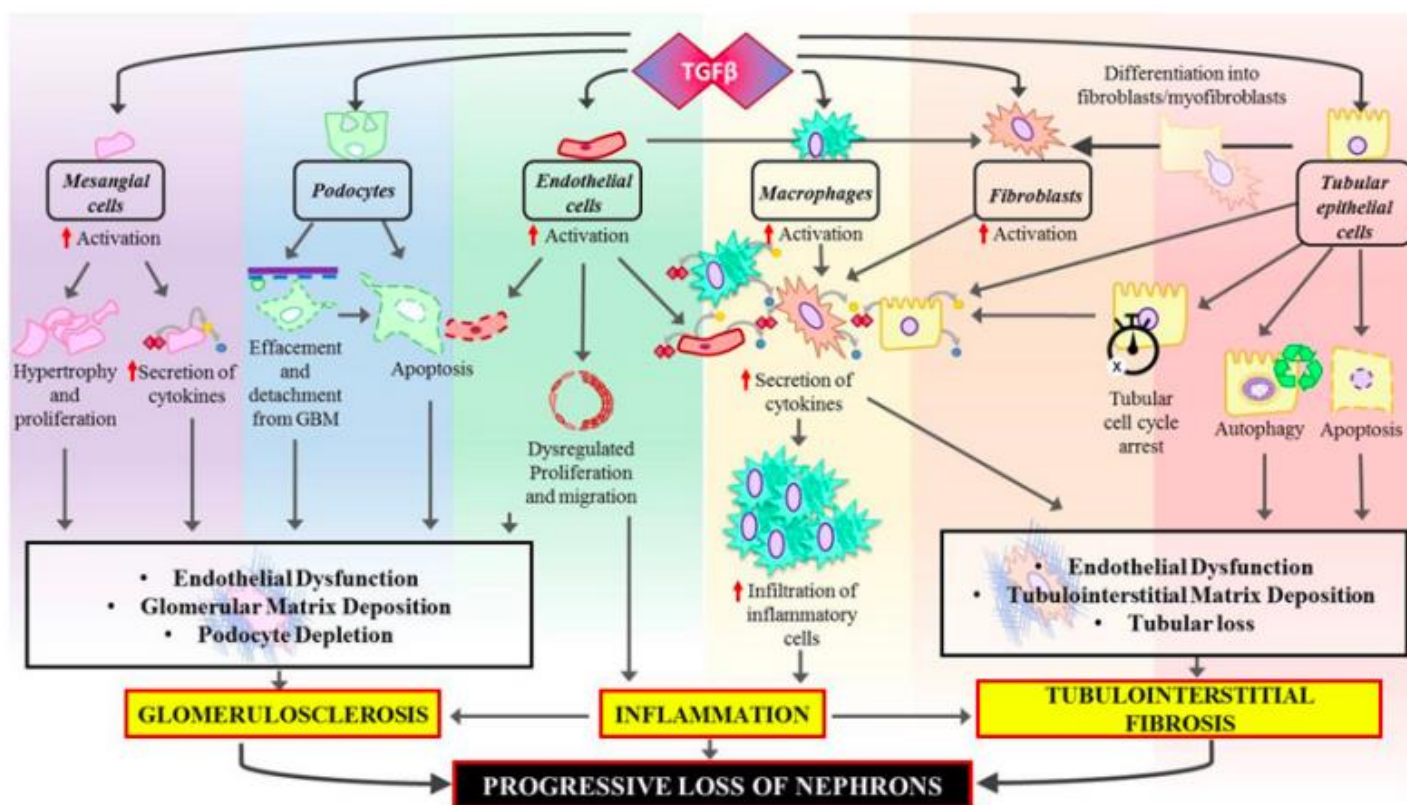


Figure 22 : TGFβ et ses rôles dans la maladie rénale chronique. (Adaptée de Huynh P et al., 2019)

TGFβ induit la différenciation des cellules rénales en myofibroblastes qui moduleront différentes réponses cellulaires.

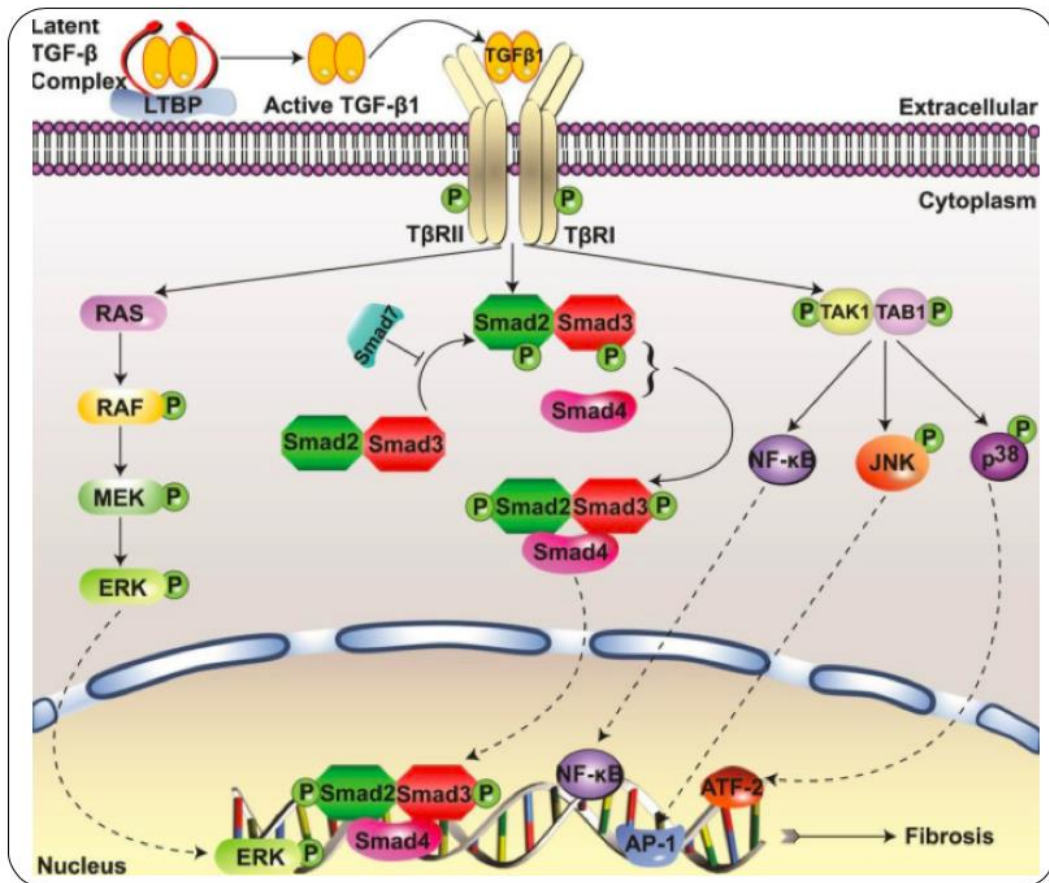
Chez le mammifère, le TGF-β existe sous 3 isoformes TGF-β1, TGF-β2 et TGF-β3 qui font partie de la superfamille des TGF qui comprend également les protéines osseuses morphogéniques (BMP). A noter que la BMP-7 est un inhibiteur naturel de la fibrose rénale (Zeisberg et al., 2005; Zhang et al., 2005). Le TGF-β1 est l'isoforme la plus impliquée dans la fibrose.

Lors de la phase inflammatoire, le TGF- $\beta$  est sécrétée sous une forme latente associée en N-terminal avec le pro-domaine LAP (Latency-Associated Peptide) qui permet sa liaison non-covalente avec des protéines appelées LTBP (latent-TGF $\beta$  binding proteins) de la MEC (Annes et al., 2003; Robertson et al., 2015). L'activation du TGF- $\beta$  peut être induite par diverses protéases (*i.e* MMP-2, MMP-9, plasmine, thrombospondine). Une fois libérée le TGF- $\beta$  se dimérise et peut interagir avec 3 types de récepteurs T $\beta$ RI, T $\beta$ RII et T $\beta$ RIII. T $\beta$ RI et T $\beta$ RII sont des récepteurs membranaires à activité sérine/thréonine kinase. T $\beta$ RIII est un protéoglycane (bétaglycan) ancré à la membrane, permet de présenter le TGF- $\beta$  aux récepteurs de type II (López-Casillas et al., 1994). L'interaction du dimère de TGF- $\beta$  avec le récepteur T $\beta$ RII induit un changement conformationnel permettant le recrutement de T $\beta$ RI et la phosphorylation de ce dernier. La transduction intracellulaire du signal est médiée par la phosphorylation des Smads associées au récepteur, R-Smads (Smad2/3) par la sous-unité T $\beta$ RI. Une fois phosphorylés, les R-Smads s'associent à la co-Smad (Smad4). Le complexe résultant est ensuite transloqué dans le noyau où il va pouvoir se lier aux Smad-binding elements (SBE) situés au niveau des promoteurs des gènes cibles via Smad3 ou smad2. L'interaction de Smad3 avec le SBE va induire la transcription de gènes profibrotiques, comme *ACTA2* (codant pour l' $\alpha$ -SMA), *Col1* (codant pour le collagène I) et *TIMP1 & 2* (codant pour les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases) (Edwards et al., 1987; Meng et al., 2016b). C'est la voie de signalisation dite « canonique » de TGF- $\beta$  dépendants des Smads.

Il est important de noter que des boucles de rétro-contrôles négatives existent via Smad7 et Smurf1/2 (SMAD ubiquitylation regulatory factor). Elles vont inhiber respectivement le recrutement de Smad4 et dégrader le complexe récepteurs T $\beta$ RII-T $\beta$ RI via le protéasome (Massagué, 2000; Böttinger and Bitzer, 2002; Brown et al., 2007). Ils existent d'autres voies de signalisations de TGF- $\beta$  non-Smads (**figure 24**). En effet, le complexe de récepteurs activés peut induire d'autres voies de signalisations comme la voie des MAPK

(mitogen-activated protein kinase), Rho-GTPase et PI3K/Akt/mTOR (Zhang, 2009). A titre d'exemple, le TGF- $\beta$  peut induire l'expression d' $\alpha$ -SMA durant le processus d'EMT via des voies de signalisations impliquant aussi bien la voie Wnt/ $\beta$ -caténine que la voie des Rho-GTPase (Masszi et al., 2003; Tan et al., 2014).





**Figure 24 : Le TGF-β, voie de signalisation classique par les Smads et les voies de signalisation « non-Smad » (Adaptée Sureshbabu et al., 2016)**

L'activation du TGF-β1 se produit avec la libération du complexe latent de protéine de liaison TGF-β (LTBP) par les protéases. La signalisation du TGF-β1 est initiée lors de la liaison du TGF-β1 actif avec le récepteur du TGF-β de type II (TβRII) et de la formation du complexe hétéromérique TβRI-TβRII, conduisant à la phosphorylation de Smad2 / 3, à l'oligomérisation avec Smad4 et à la translocation nucléaire ultérieure pour réguler la transcription des gènes ECM. Smad7 sert de régulateur négatif de la signalisation du TGF-β1. TGF-β1 active également la signalisation indépendante de Smad telle que la MAPK, médiée par la voie Ras-Raf-MEK-ERK, et la kinase 1 activée par TGF-β (TAK1), médiée par la protéine TAB1. L'activation de TAK1 induite par TGF-β1 conduit à l'activation des voies de signalisations MKK4-JNK et MKK3-p38 et à l'activation des facteurs de transcription activator protein 1 (AP-1) et du facteur de transcription activating transcription factor 2 (ATF-2), respectivement, et à l'activation de NF-κB pour médier les réponses profibrotiques.



## **IV. Les approches thérapeutiques**

La fibrose rénale est le principal processus sous-jacent à la progression de l'insuffisance rénale chronique vers l'insuffisance rénale terminale. A ce stade, la perte de la fonction rénale est tellement importante que les seules thérapies qui existent sont des thérapies de substitutions comme la dialyse et la transplantation rénale.

Depuis de nombreuses années, l'objectif de la communauté scientifique est de trouver une ou plusieurs thérapies pour ralentir voire stopper la progression de la fibrose rénale. Malgré de nombreuses études précliniques et cliniques réalisées ou en cours, il n'y a toujours pas de traitements efficaces pour la fibrose.

Dans cette partie, nous parlerons d'études précliniques et cliniques qui mettent en exergues des traitements qui semblent ou semblaient prometteurs.

Les thérapies employées ont pour cible les différentes phases de la fibrose tubulo-interstitielle : i) l'inflammation, ii) l'apparition des myofibroblastes et iii) l'accumulation de la matrice extra cellulaire.

### **IV.1 LES CIBLES**

#### **IV.1.1 L'inflammation**

Suite à une lésion rénale, quel que soit son étiologie, les cellules résidentes sécrètent des chimiokines pro-inflammatoires, notamment la chimiokine MCP-1/CCL2 (Monocyte chemoattractant protein-1) qui favorise le recrutement de monocytes sanguins vers le foyer

inflammatoire grâce à son interaction le récepteur CCL2R. Ces monocytes une fois dans le tissu se différencient en macrophages qui sont en partie responsables de la production de ROS et de cytokines profibrosantes (*i.e* TGF- $\beta$ ). Ces derniers favorisent l'activation des fibroblastes en myofibroblastes. Ainsi, le ligand-récepteur CCL2-CCL2R semble être une cible thérapeutique de choix.

Plusieurs études précliniques montrent que l'utilisation d'antagonistes au récepteur CCL2 réduisent la FTI (Anders et al., 2003). En effet, l'utilisation d'antagonistes comme le RS-504393 (petite molécule développée par Roche/iconix) et le propagermanium (connu sous le nom de DMX-200, un polymère) dans un modèle murin d'OUU diminuent l'infiltration macrophagique ainsi que l'expression de l' $\alpha$ -SMA et du collagène I (Kitagawa et al., 2004). Le propagermanium est en essai clinique de phase 2 (NCT03627715) en cours sur des patients atteints de néphropathie diabétique. Ce composé semble réduire de 36 % l'albuminurie. CCX140-B (un autre antagoniste, NCT01447147) quant à lui réduit l'albuminurie de 16 % (de Zeeuw et al., 2015).

Des antagonistes au récepteur CCL1 ont également été investigués. Anders et al. (2002) ont utilisé un antagoniste non-peptidique du récepteur CCL1, BX47. Ils ont montré dans un modèle d'OUU que ce dernier réduit entre 40 et 60 % l'infiltration macrophagique interstitielle. Une diminution de l'accumulation des collagènes interstitiels a été également observée (Anders et al., 2002). A ma connaissance, mise à part des études précliniques, aucune étude clinique utilisant des antagonistes aux récepteurs CCL1 n'a été entreprise.

#### **IV.1.2 L'apparition des myofibroblastes**

D'autres approches thérapeutiques consistent à cibler l'apparition des myofibroblastes incluant ainsi l'inhibition des facteurs pro-fibrosants et les cascades de signalisations qui y sont associées.

#### IV.1.2.1 Inhibition de la cytokine pro-fibrosante TGF- $\beta$

Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été utilisées pour inhiber la cytokine pro-fibrosante TGF- $\beta$ . Parmi elles, l'utilisation d'anticorps bloquants comme le fresolimumab (GC1008) (Trachtman et al., 2011; Vincenti et al., 2017). Cet anticorps de type IgG a été conçu de façon à neutraliser les 3 isoformes du TGF- $\beta$ . Les essais cliniques de phase 1 et 2 (NCT0046432, NTC01665391) réalisés sur des patients atteints de sclérose glomérulaire segmentaire focale ont permis de déterminer un temps de demi-vie de 14 jours et d'observer une diminution de 50 % voire totale de la protéinurie. Cependant, aucun marqueur de la FTI n'a été investigué. D'autres anticorps bloquants comme le LY2382770 ont été testé sur des patients atteints de néphropathie diabétique. Cependant, l'essai en phase 2 (NCT01113801) semble être interrompu pour un manque d'efficacité.

D'autres stratégies ont été mis en place pour inhiber TGF- $\beta$  par l'utilisation de petite molécules inhibitrices comme la pirfénidone dont les études précliniques ont montré la diminution de l'expression de TGF- $\beta$  et de certains collagènes (Col-I, Col-IV) (Cho and Kopp, 2010). Dans une étude clinique réalisée chez des patients atteints de sclérose glomérulaire segmentaire cette molécule semble ralentir la perte de la fonction rénale de 25 % (Cho et al., 2007). Par ailleurs, aucune amélioration du débit de filtration glomérulaire n'a été observée chez des patients atteints de néphropathie diabétique (Sharma et al., 2011). Néanmoins, cette molécule semble être prometteuse, qu'un nouvel essai clinique TOP-CKD (Trial of Pirfenidone to Prevent Progression in Chronic Kidney Disease - NCT04258397) a été amorcé. Cet essai clinique de phase 2 sera réalisé sur 200 patients atteints de MRC avec un eGFR  $\geq$  20 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>. Elle a pour objectif d'évaluer l'efficacité de la pirfénidone (1335 mg/jour) sur la FTI en utilisant l'imagerie à résonance magnétique (IRM) et le dosage de marqueurs urinaires (*i.e* MCP-1, propeptide N-terminale du procollagène de type III (PIIINP)).

#### IV.1.2.2 Inhibition de récepteurs à tyrosine kinase

Parmi les traitements les plus prometteurs, le Nintedanib (BIBF1120) est une petite molécule inhibitrice ciblant plusieurs récepteurs de type tyrosine kinase (*i.e* PDGFR, FGFR, VEGFR). Depuis 2020, elle est approuvée par la FDA (Food Drug administration) pour traiter la fibrose pulmonaire (Richeldi et al., 2014). Ce traitement semble être prometteur pour la FTI rénale. D'autant plus, qu'il a été montré sur un modèle de fibrose rénal induit par l'acide folique que la molécule atténuait la fibrose rénale, en inhibant l'activation des fibroblastes en myofibroblastes, en diminuant ainsi la surproduction et l'accumulation de protéines de la matrice extracellulaire (Liu et al., 2017).

#### IV.1.3 L'accumulation de la matrice extra cellulaire

L'augmentation de la synthèse et une diminution de la dégradation de la MEC conduisent progressivement à son accumulation dans l'interstitium rénal formant ainsi un tissu cicatriciel. Un tissu cicatriciel qui dans le temps est moins facile voire impossible à remodeler par les métalloprotéinases (*i.e* MMP-2, MMP-9) (Lampi and Reinhart-King, 2018).

Dans le contexte de la FTI, aucune stratégie thérapeutique n'a été considéré pour cibler la MEC. Néanmoins, des essais précliniques sur la fibrose pulmonaire et hépatique semblent montrer l'importance d'inhiber des acteurs clés dans la rigidification de la MEC.

##### IV.1.3.1 Inhibition de la lysyl oxidase

Une étude préclinique montre que l'utilisation d'un inhibiteur de la lysyl oxydase (LOX), l'aminopropionitrile (BAPN), réduit l'accumulation de collagènes liés de manière covalente. De

plus, une réversion de la fibrose hépatique a été observé (Liu et al., 2016). Cependant, aucune étude clinique n'a été menée à ce jour.

Quel que soit la stratégie thérapeutique utilisée, petites molécules inhibitrices et anticorps monoclonaux la déstabilisation du réseau matriciel semble être un enjeu attrayant pour la réversion de la fibrose.

#### **IV.1.4 Blocage du système rénine-angiotensine**

A ce jour, le seul traitement qui semble ralentir l'évolution de la fibrose c'est le blocage du système rénine-angiotensine par l'utilisation seul ou combinés i) d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) de l'angiotensine I et des antagonistes du récepteur 1 à l'angiotensine II (ARAII). Dans la FTI, l'angiotensine II est un médiateur pro-fibrosant qui va contribuer à la production de cytokines pro-inflammatoires (*i.e* TNF- $\alpha$ ), pro-fibrosantes (*i.e* TGF- $\beta$ , CTGF), à l'accumulation de la MEC par la production d'inhibiteurs de l'activateur tissulaire du plasminogène (PAi) et à la génération de ROS par la stimulation de NADPH-oxydases par l'intermédiaire de son récepteur transmembranaire AT1R (Klahr et al., 1995; Wolf, 1998; Nguyen Dinh Cat et al., 2013; Ruiz-Ortega et al., 2006; Eddy and Fogo, 2006).

Ainsi, le blocage du système rénine-angiotensine par l'utilisation d'IEC et d'ARAII permet de ralentir la progression vers l'insuffisance rénale terminale et donc vraisemblablement la progression de la FTI.

#### **IV.1.5 Le stress oxydant**

Le stress oxydant joue un rôle important dans la pathogénèse de la maladie rénale chronique et sa progression vers l'insuffisance rénale terminale (Vodošek Hojs et al., 2020). Ce stress,

caractérisé par une production excessive d'espèces pro-oxydantes (*i.e* ROS) et une dégradation insuffisante de ces derniers par des espèces antioxydantes endogènes est une cible thérapeutique de choix. En effet, une augmentation de la défense antioxydante endogène ou l'apport d'antioxydants exogènes pourraient être bénéfique pour la résolution de la FTI.

#### IV.1.5.1 Les polyphénols

Les polyphénols sont l'un des groupes d'antioxydants naturels les plus retrouvés dans notre alimentation. On les retrouve dans les légumes, les fruits, les plantes, les céréales ainsi que dans les boissons et les aliments qui en sont dérivés (vin, thé...) (Manach et al., 2004; Pérez-Jiménez et al., 2010). Depuis ces dernières années, des études cliniques, épidémiologiques et nutritionnelles mettent en exergues les bienfaits d'une consommation de ces derniers dans la prévention des maladies métaboliques, neurodégénératives et du cancer (Scalbert et al., 2005; Afshin et al., 2014; Flores-Pérez et al., 2016; Colizzi, 2019). Par ailleurs, selon l'étude EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition), un total de 437 polyphénols différents sont consommés dont 94 polyphénols consommés à une concentration supérieure à 1 g par jour (Zamora-Ros et al., 2016). Les polyphénols pourraient être un atout majeur dans la régression de la FTI.

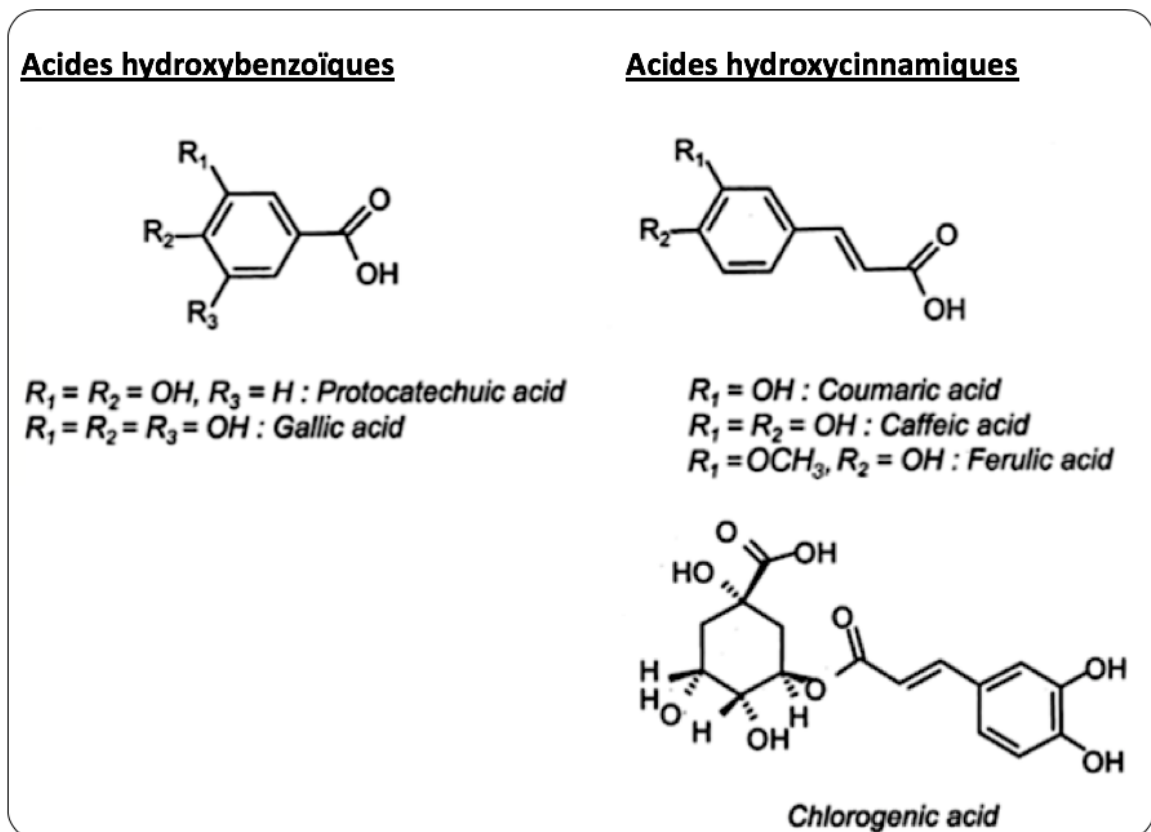
##### *IV.1.5.1.2 Classification et structure des polyphénols.*

A ce jour, il existe plus de 8000 composés polyphénoliques identifiés dans différentes plantes (Tsao, 2010). Ils sont classés dans différentes familles en fonction du nombre de noyaux aromatiques possédés et de nombre de groupements hydroxyles (-OH) liés.

Ils sont ainsi classés en 4 familles : i) les acides phénoliques, ii) les flavonoïdes, iii) les stilbènes et iv) les lignanes (Manach et al., 2004).

## a. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques peuvent être divisés en deux groupes : les dérivés d'acide benzoïque avec une structure de type C1-C6 et les dérivés d'acide cinnamique avec une structure de type C6-C3. Parmi, les acides hydroxybenzoïques nous pouvons citer : l'acide gallique, l'acide protocatéchique et l'acide syringique. Quant aux acides hydroxycinnamiques nous pouvons citer : l'acide caféique, l'acide coumarique, l'acide férulique et l'acide chlorogénique (**figure 25**). Ces derniers peuvent être libre ou sous forme estérifiés. Pour exemple, l'acide chlorogénique est un acide caféique estérifié avec un acide quinique.

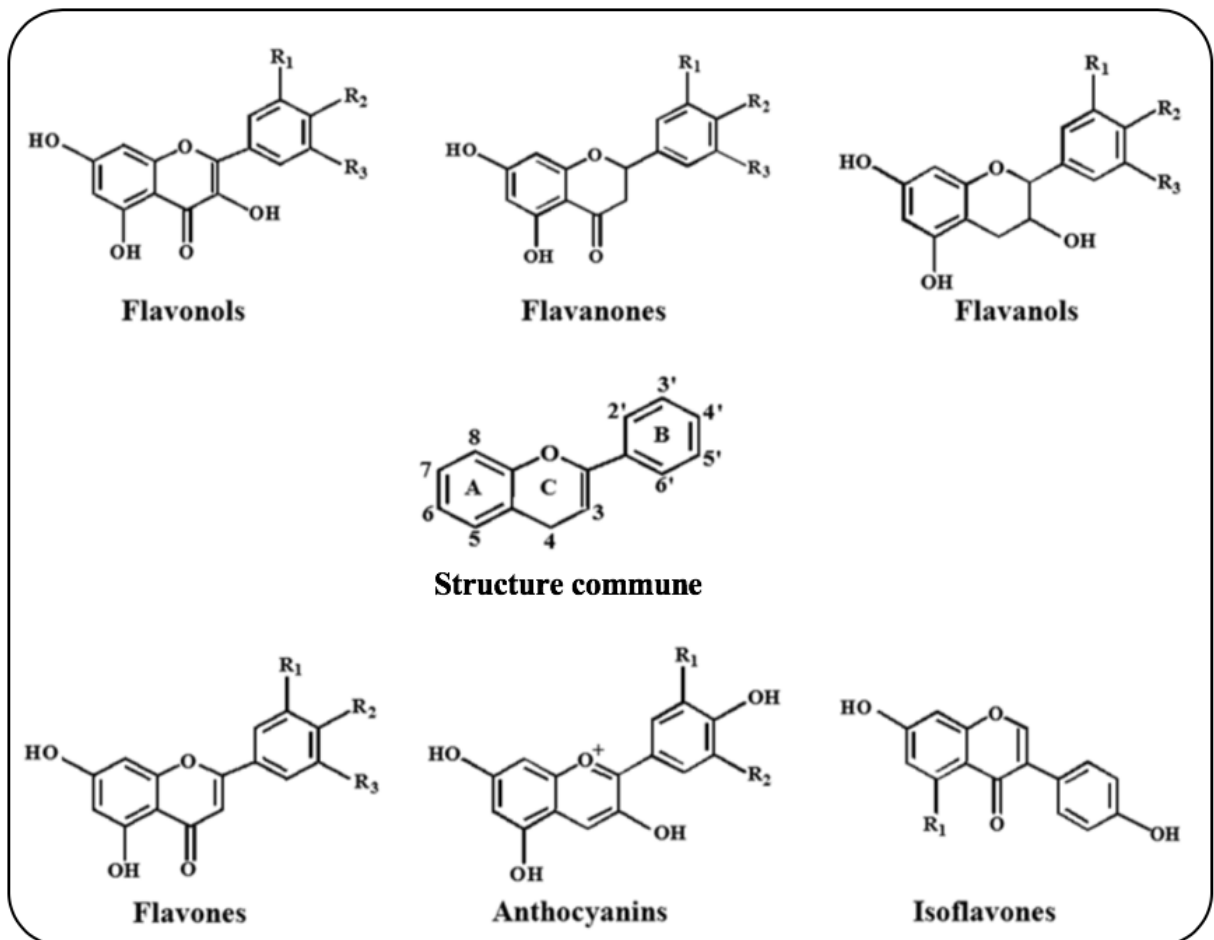


**Figure 25 : Structure des acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont divisés en deux groupes : les dérivés d'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique.

## b. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules ayant une structure de type C6-C3-C6. Ils sont constitués de deux noyaux aromatiques (A et B) reliés à un hétérocycle oxygéné (cycle C). Le niveau d'hydroxylation de l'hétérocycle C permet de distinguer différents sous-groupes comme les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavanols, les isoflavones, les chalcones et les anthocyanes (**figure 26**). Parmi les flavonols, nous avons des composés comme la quercétine et le kaempférol. Ces derniers existent majoritairement sous forme glycosylée (*i.e* quercétine-3-O-rutinoside (Rutine)).



**Figure 26 : La famille des flavonoïdes (Adaptée Bhooshan K et al., 2009)**

Ils sont constitués de deux noyaux aromatiques (A et B) reliés à un hétérocycle oxygéné (cycle C). Ils sont divisés en flavonols, les flavones, les flavanones, les flavanols, les isoflavones, les chalcones et les anthocyanes.



### c. Les stilbènes

Les stilbènes sont composés de 2 noyaux aromatiques liés par un groupe éthylénique (**figure 27**). Parmi les stilbènes, nous avons le resvératrol. Ce dernier est retrouvé dans le vin rouge à des concentrations comprises entre 0,3 et 2 mg/L. Il possède des effets cardioprotecteurs (Magyar et al., 2012; Scalbert and Williamson, 2000).

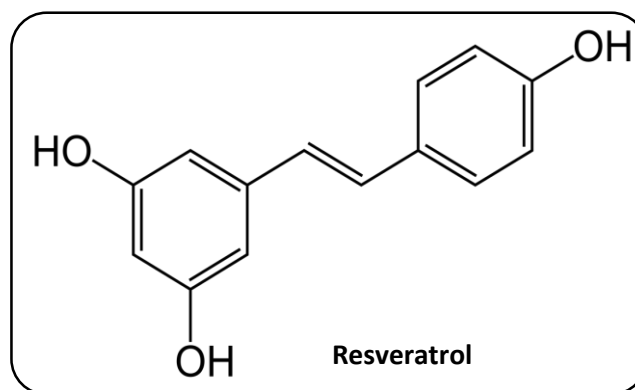


Figure 27 : Structure du resvératrol

### d. Les lignanes

Les lignanes sont caractérisés par une structure de type C6-C3-C3-C6 comportant deux unités phénylpropanes qui sont formées par la dimérisation de deux résidues d'acides cinnamiques (**figure 28**). Parmi les lignanes, nous retrouvons le secoisolariciresinol qui est considéré comme un phyto-oestrogène.

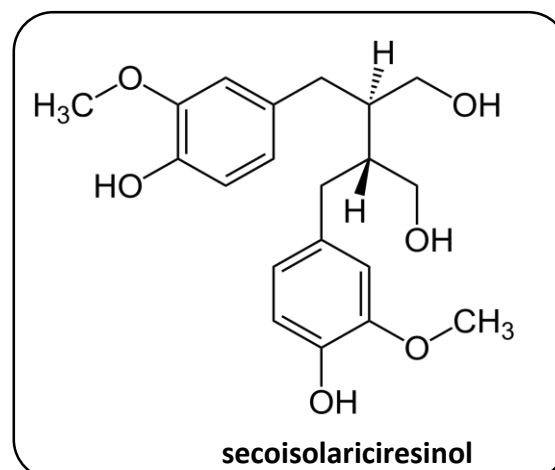


Figure 28 : Structure du secoisolariciresinol

#### *IV.1.5.1.3 Propriétés antioxydantes des polyphénols*

De par leurs structures, les polyphénols sont de puissants antioxydants qui sont capable de neutraliser les radicaux libres (ROS, RNS) en leur donnant soit un électron soit un atome d'hydrogène. En plus du piégeage de radicaux libres, les polyphénols sont capables de chélater les métaux. En effet, ils peuvent directement inhiber la réduction de  $Fe^{3+}$  lors des réactions de Fenton, empêchant ainsi la formation de radicaux hydroxyles ( $OH^\bullet$ ) (Perron and Brumaghim, 2009). Leurs capacités de neutraliser directement les radicaux libres dépend du degré d'hydroxylation et de la position des groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques. En effet, des groupements hydroxyles positionnés en *ortho*- et /ou en *para*- augmentent leurs activité antioxydantes de certains polyphénols (Rice-Evans et al., 1996; Göçer and Gülçin, 2011).

A cette capacité antioxydante intrinsèque des polyphénols s'ajoute leurs capacités à moduler l'expression d'enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathione peroxydase via la voie de signalisation Nrf2/keap1/ARE. Cependant, le mécanisme d'activation de cette voie par les polyphénols est encore mal connu. La translocation du facteur de transcription Nrf2 serait induite par l'interaction des polyphénols avec le récepteur Ah (aryl hydrocarbon) cytosolique (Zhang et al., 2003; Köhle and Bock, 2006).

#### *IV.1.5.1.4 Polyphénols et Fibrose tubulo-interstielle*

Plusieurs études précliniques et cliniques montrent que l'utilisation des polyphénols pourraient ralentir la progression de la FTI.

Le resvératrol appartenant à la famille des stilbènes, possède des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (Kitada et al., 2011). Dans un modèle murin de fibrose rénale accélérée (OUU), Liang et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence que le resvératrol diminuait le dépôt de

collagènes dans l'interstitium, diminuait l'expression génique de cytokines pro-inflammatoire (TNF- $\alpha$ ), et pro-fibrosantes (TGF- $\beta$ ) et diminuait la concentration de malondialdéhyde (MDA), un marqueur du stress oxydant. Ces résultats suggèrent que le resvératrol possède des propriétés anti-fibrosantes qui pourrait être intéressantes dans le cadre de la FTI. Cependant, une étude pilote dont l'objectif a été d'évaluer les effets du resvératrol sur l'inflammation et le stress oxydant chez des patients non-dialysés atteints de MRC révèle qu'une supplémentation de 500mg en resvératrol pendant 4 semaines ne permettait pas d'avoir des effets anti-inflammatoires et antioxydants sur ces patients (Saldanha et al., 2016). Les auteurs suggèrent une autre étude avec une dose plus élevée et sur une durée plus longue.

D'autres polyphénols comme l'acide caféique phenetyl ester (CAPE) semble réduire la FTI chez des souris atteintes de néphropathie diabétique via les voies de signalisation TGF/Smad et Akt/NFkb/iNOS (Wang et al., 2017a). Dans le modèle murin d'OUU, l'épigallocatechine 3-O-gallate, diminue le dépôt de collagènes/fibronectine dans l'interstitium, diminue l'expression protéique de cytokines pro-inflammatoire (TNF $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$ ) et inhibe la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Wang et al., 2015b). Le tableau 5 résume les polyphénols qui ont été étudiés pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires dans le cadre de la MRC.

**Tableau 5. Les polyphénols ayant des effets néphroprotecteurs dans le cadre de la MRC.**

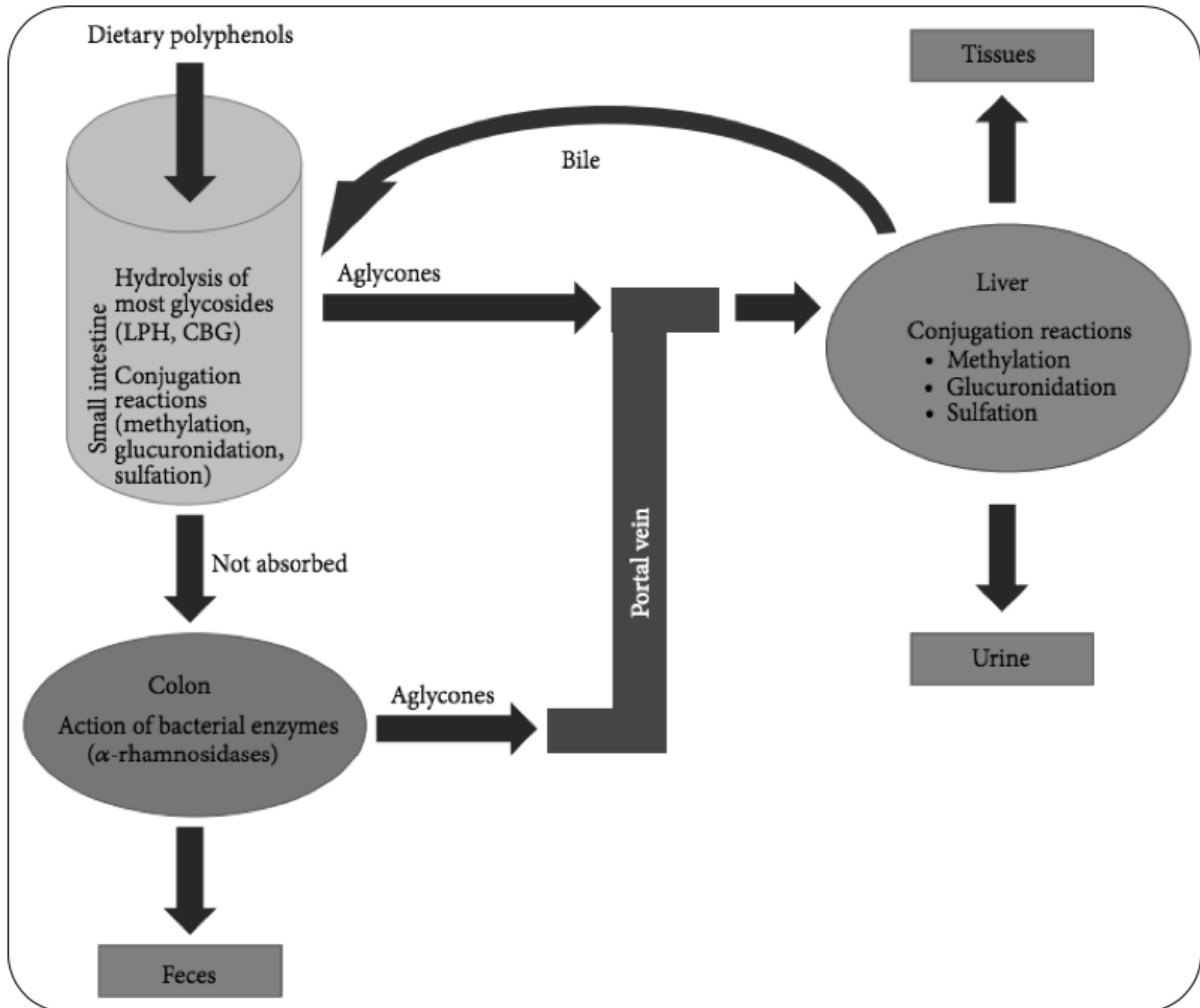
	<b>Activité anti-inflammatoire/ anti-fibrosante</b>	<b>Activité antioxydante</b>
<b>Quercetin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ FGF</li> <li>↓ Protéinurie et glucosurie</li> <li>↓ Protéinurie</li> <li>↓ NLRP3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ SOD</li> </ul>
<b>Curcumin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ VEGF</li> <li>↓ TGF-β</li> <li>↓ CTGF</li> <li>↓ Excretion Albumine dans urine</li> <li>↓ Créatinine plasmatique</li> <li>↓ iNOS and ↓ COX-2</li> <li>↓ TNF-α</li> <li>↓ MCP-1</li> <li>↓ JNK/NF-κB</li> <li>↓ NLRP3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ NO and ↓ ONOO-</li> <li>↓ O<sub>2</sub><sup>-</sup> and ↓ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> <li>↑ SOD</li> <li>↑ CAT</li> <li>↑ Nrf2</li> <li>↓ Péroxydation lipidique</li> <li>↑ GST</li> <li>↑ HO-1</li> <li>↑ GPX</li> </ul>
<b>Resveratrol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ NF-κB</li> <li>↓ Excretion Albumine dans urine</li> <li>↓ Hémoglobine glyquée</li> <li>↓ F4/80</li> <li>↓ Fibronectine et collagènes</li> <li>↓ Smad 3</li> <li>↓ Cytokines pro-inflammatoires</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Nrf2</li> <li>↓ Hémoglobine glyquée</li> <li>↓ ROS</li> <li>↓ 8-OHdG</li> <li>↓ Péroxydation lipidique</li> <li>↑ Enzymes antioxydantes</li> </ul>
<b>Ursolic acid</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ IL-6</li> <li>↓ NF-κB</li> <li>↓ TNF-α</li> <li>↓ MCP-1</li> <li>↓ IL-1β</li> <li>↓ Excretion Albumine dans urine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Péroxydation lipidique</li> <li>↑ SOD</li> </ul>
<b>Epigallocatechin-3-gallate</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ NF-κB</li> <li>↓ NLRP3</li> <li>↓ MCP-1</li> <li>↓ TNF-α</li> <li>↓ IL-1β</li> <li>↓ TGF-β</li> <li>↓ pSmad 2/3</li> <li>↓ α-SMA</li> <li>↓ Collagènes I et III</li> <li>↓ Snai 1 (TEM)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Nrf2</li> <li>↑ GPx</li> <li>↑ HO-1</li> <li>↓ AGE et peroxydation lipidique</li> <li>↓ ROS</li> </ul>
<b>Caffeic acid</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ NF-κB</li> <li>↓ MCP-1</li> <li>↓ TNF-α</li> <li>↓ IL-1β</li> <li>↓ F4/80</li> <li>↓ TGF-β</li> <li>↓ α-SMA</li> <li>↓ Collagènes I, III et fibronectine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ SOD</li> <li>↑ CAT</li> <li>↑ Nrf2</li> <li>↑ GPx</li> <li>↓ Péroxydation lipidique</li> <li>↓ Oxydation protéique</li> </ul>

Ces quelques exemples montrent bien que les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-fibrosantes des polyphénols sont des propriétés recherchées pour ralentir voire stopper l'évolution de la FTI.

#### *IV.1.5.1.5 Biodisponibilité des polyphénols*

La bioactivité des polyphénols dépend d'un paramètre important, la biodisponibilité. La biodisponibilité des polyphénols est la proportion de polyphénols qui est digérée, absorbée et métabolisée par notre organisme. La biodisponibilité diffère selon le type de polyphénols absorbés (Manach et al., 2004). Après ingestion, les polyphénols pourront soit traverser directement la barrière intestinale ou soit être métabolisés dans les entérocytes de l'intestin grêle via les systèmes enzymatiques de désintoxication de phase I (oxydation, réduction et hydrolyse) et de phase II (glucuronidation, méthylation et sulfatation). Les polyphénols ou les métabolites formés rejoignent le foie via la veine porte. Au niveau du foie, les polyphénols non conjugués ou les métabolites vont subir des modifications par les enzymes de phase I et II et être libérés dans la circulation systémique. Une fois dans la circulation systémique, le polyphénol parent ou ses métabolites peuvent aller dans les tissus afin d'y exercer leurs bioactivités, ou être excrétés dans la bile ou par les reins. Les métabolites sécrétés par la voie biliaire subiront une déconjugaison (glucuronidase) afin d'être réabsorbés. Ce recyclage entérohépatique pourrait expliquer le fait que certains polyphénols restent plus longtemps dans l'organisme (Cardona et al., 2013; Manach et al., 2004). Ainsi, les métabolites circulants peuvent différer tant de la structure et de la bioactivité du composé parent dont ils sont issus. La microflore du système digestif est également un déterminant important dans la biodisponibilité des polyphénols conjugués avec des sucres (forme glycosylée). Une partie de ces polyphénols conjugués peuvent être hydrolysés au niveau de l'intestin grêle, être absorbés et pourront rejoindre la circulation systémique via le système porte hépatique. Les autres

polyphénols non absorbés peuvent être métabolisés par la microflore présente au niveau du colon afin de rejoindre de la même manière la circulation systémique via le système porte hépatique. Les polyphénols non absorbés sont excrétés par voie fécale (Cardona et al., 2013; Marín et al., 2015).



**Figure 30 : Absorption et métabolisme des polyphénols issus de l'alimentation (Marín L et al., 2015)**

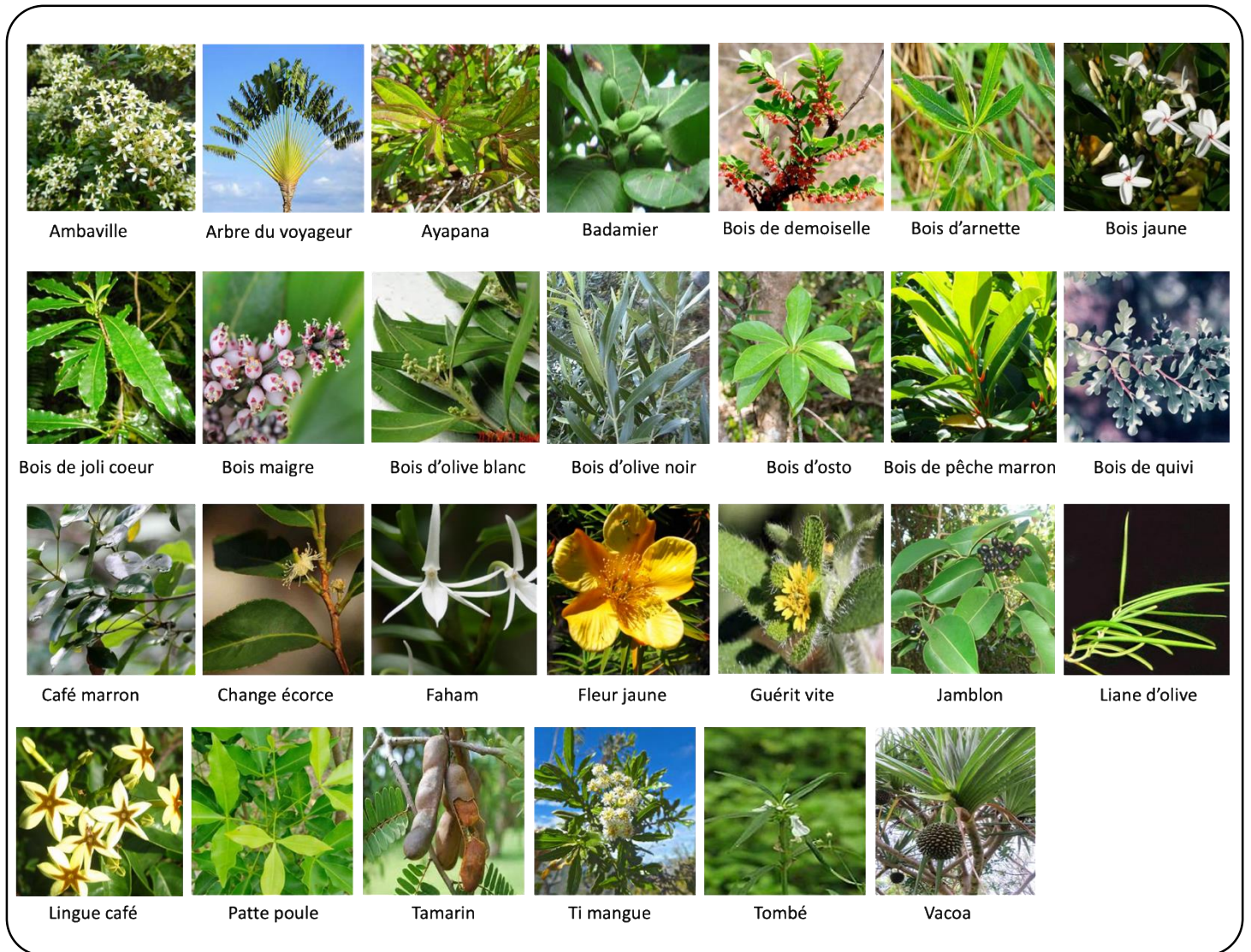
#### IV.1.5.2 Les plantes médicinales de la Réunion : riche en polyphénols

Depuis des millénaires, les plantes médicinales sont utilisées par l'homme pour leurs nombreuses propriétés thérapeutiques. Des vertus thérapeutiques qui sont associées à une richesse en composés phytochimiques biologiquement actifs. Aujourd'hui, avec l'évolution technologique dans le fractionnement, l'isolation et la caractérisation structurales / physico-chimique de ces composés font que la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques à partir de plante est en plein essor.

Nous avons la chance à La Réunion d'avoir une biodiversité végétale qui est riche. En effet, selon l'union internationale pour la conservation de la nature (IUCN), La Réunion possède 848 espèces de plantes indigènes dont 254 espèces endémiques de La Réunion. Grâce à un travail collaboratif entre l'APLAMEDOM (Association pour les Plantes Aromatiques et Médicinales de La Réunion), l'ADPAPAM (Association pour le Développement, la Défense et la Promotion des Plantes à Parfums Aromatiques et Médicinales), des botanistes et des pharmaciens, La Réunion possède à ce jour 27 plantes médicinales inscrites à la pharmacopée française (**figure 31**). Certaines de ces plantes sont utilisées en médecine traditionnelle pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, antidiabétiques et hypocholestérolémiantes (Poullain et al., 2004).

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à une de ces plantes médicinales, *Antirhea Borbonica*.





**Figure 31** : Les 27 plantes médicinales de La Réunion inscrites à la pharmacopée française



#### IV.1.5.2.1 *Antirhea Borbonica*

##### a. Généralités



*Antirhea Borbonica* plus communément connu sous son nom vernaculaire de Bois d'Osto, est une plante endémique de la Réunion appartenant à la famille des *Rubiacees*. Cette plante pousse dans les forêts humides entre 150 et 1200 mètres d'altitude. Elle peut atteindre 10 mètres de hauteur.

En médecine traditionnelle, cette plante est consommée sous forme de tisane ou de décoction. Elle possède des propriétés anti-inflammatoires, anti-diarrhéiques, antidiabétique et antiulcéreuses gastriques. En usage externe, elle favorise la cicatrisation (Lavergne, 2016).

##### b. Données scientifiques

Des études récentes reportent que cette plante préparée sous forme d'infusion possède de fortes propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Ces propriétés ont été associées à une forte teneur en polyphénols (3%). En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré sur différents modèles cellulaires et animaux qu'un extrait enrichi en polyphénols de la plante médicinale *Antirhea borbonica* diminuait la concentration de ROS et diminuait la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF-  $\alpha$ , MCP-1) (Marimoutou et al., 2015; Arcambal et al., 2020; Ghaddar et al., 2020). Les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de cette plante médicinale pourraient probablement permettre de ralentir l'évolution de la FTI.

# **OBJECTIF DE THESE**



Nous avons vu dans la partie bibliographique l'importance des phénomènes inflammatoires et du stress oxydant dans le processus de fibrose rénale. Nous avons également montré que, à l'exception des inhibiteurs de l'enzyme de conversion et des antagonistes du récepteur AT1 de l'angiotensine II qui sont les seuls médicaments à être utilisés en clinique permettant un ralentissement de la progression de la fibrose rénale et donc un ralentissement de la progression vers l'insuffisance rénale terminale, il n'y avait, à ce jour, aucun traitement anti-fibrosant. D'autre part, nous avons montré que les vertus thérapeutiques des plantes médicinales de la Réunion qui sont inscrites à la pharmacopée française étaient vraisemblablement associées aux polyphénols (molécules aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires) présents dans ces plantes. Toutefois il n'existe que très peu de preuves scientifiques permettant de valider *in vivo* ces vertus thérapeutiques.

**En me focalisant sur une plante médicinale (*Antirhea borbonica*), endémique de la Réunion, et la fibrose rénale, l'objectif principal de mon projet de thèse a été d'étudier le potentiel thérapeutique anti-fibrosant des polyphénols présents dans cette plante.**

Mes travaux ont été rapportés dans deux publications :

- *Article 1* : **Veeran B**, Ghaddar B, Bringart M, Khazaal S, Gonthier MP, Meilhac O, Diotel N, Bascands JL. 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*. 2020 Sep 29;25(19):4482. doi:10.3390/molecules25194482.

- *Article 2* : **Veeran B**, Bringart M, Turpin C, Rondeau P, Planesse C, Ait-Arsa I, Gimié F, Marodon C, Meilhac O, Gonthier MP, Diotel N, Bascands JL. (Scalbert and Williamson, 2000; Magyar et al., 2012) *Biomedicines*. 2021 Mar 30;9(4):358. doi: 10.3390/biomedicines9040358.



# TRAVAUX PERSONNELS

*We make these memories for ourselves,  
Ed Sheeran*



**Article 1 : Profil phénolique d'une infusion et d'un extrait enrichi en polyphénols préparés à partir de feuilles de la plante médicinale *Antirhea borbonica* : détermination de la toxicité chez les embryons et les larves de poisson zèbre.**

**Bryan Veeren**, Batoul Ghaddar, Matthieu Bringart, Shaymaa Khazaal, Marie-Paule Gonthier, Olivier Meilhac, Nicolas Diotel, Jean-Loup Bascands

*Publié dans Molecules 2020, 25, 4482*

Dans ce premier article, nous avons procédé à la caractérisation des composés polyphénoliques de deux préparations de plantes. A partir de broyat de feuilles séchées d'*Antirhea borbonica*, nous avons procédé à une extraction aqueuse (infusion) et à une extraction hydro-acétonique. A partir de ces extraits, nous avons respectivement déterminé la teneur en acides phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux grâce aux tests colorimétriques de Folin-Ciocalteu et de Zychen. Afin de procéder à l'identification et à la quantification précise de ces polyphénols, nous avons développé une méthode de séparation par chromatographie liquide couplée à un détecteur UV et à un spectromètre de masse de haute résolution de type Q-orbitrap (HPLC-ESI-UV-MS/MS). Nous avons retrouvé les mêmes composés phénoliques et flavonoïdes dans les deux types d'extraits mais bien sûr dans des proportions différentes.

La capacité antioxydante des extraits a également été évalué par le test de DPPH.

Une fois la caractérisation de ces extraits faites, nous avons déterminé la dose létale 50 (DL<sub>50</sub> : dose à laquelle est observée 50% de mortalité) de ces extraits sur le modèle de poisson zèbre (embryons et larves). Ce test de toxicité a été mis en place sur la base des directives de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques) qui définissent les différents « endpoints » comme la coagulation des embryons, l'absence de formation de somites, le non-détachement de la



queue, l'absence de battements du cœur à suivre sur les 96 H du test pour les embryons. Pour les larves, seul l'absence de battements cardiaque est suivie. Dans cette étude nous avons pu déterminer les  $DL_{50}$  ainsi que les doses maximales qui n'induisent pas de mortalité ou d'anomalies morphologiques.



# 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.

Bryan Veeren<sup>1</sup>, Batoul Ghaddar<sup>1</sup>, Matthieu Bringart<sup>1</sup>, Shaymaa Khazaal<sup>1</sup>, Marie-Paule Gonthier<sup>1</sup>, Olivier Meilhac<sup>1</sup>, Nicolas Diotel<sup>1</sup>, Jean-Loup Bascands<sup>1\*</sup>

1. Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188, Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DéTROI), Plateforme CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490, Sainte-Clotilde, Réunion, France.

\* Correspondence: jean-loup.bascands@inserm.fr

**Abstract:** *Antirhea borbonica* (*A. borbonica*) is an endemic plant from Mascarene archipelago in Indian Ocean commonly used in traditional medicine for its health benefits. This study aims (1) at exploring polyphenols profiles from two types of extracts: aqueous (herbal infusion)- and acetonic (polyphenol rich)- extracts from *A. borbonica* leaves and (2) at evaluating their potential toxicity in vivo for the first time. We first demonstrated that whatever the type of extraction both extracts displayed significant antioxidant properties, acid phenolic and flavonoid contents. By using selective liquid chromatography–tandem mass spectrometry, we performed the polyphenol identification and quantification. Among the 19 identified polyphenols, we reported that the main ones were caffeic acid derivatives and quercetin-3-O-rutinoside. Then, we did a Fish Embryo Acute Toxicity to assess the toxicity of both extracts following the OECD guidelines. In both zebrafish embryos and larvae, the polyphenols-rich extract obtained by acetonic extraction followed by evaporation and resuspension in water exhibits a higher toxic effect with a median lethal concentration (LC<sub>50</sub>: 5.6 g/L) compared to the aqueous extract (LC<sub>50</sub>: 20.3 g/L). Our data also reveal that at non-lethal concentrations 2.3 and 7.2 g/L for polyphenol-rich extract and herbal infusion respectively, morphological malformations such as spinal curvature, pericardial edema and developmental delay may occur. In conclusion, our study strongly suggests that toxicity of medicinal plants should be systematically carried out and considered when studying therapeutic effects on living organisms.

**Keywords:** *Antirhea borbonica*; medicinal plants; polyphenols; Zebrafish; toxicity; LC-MS/MS.

## 1. Introduction

Réunion island, a French volcanic overseas department belonging to the Mascarene Archipelago (Indian ocean) has never been connected to any other landmasses [1] and is described as one of the 36 world's biodiversity hotspots [2]. It displays a wide and rich flora with a high percentage of endemic species. Many of the indigenous and endemic plants from Reunion island have been and are still used for traditional medicine [3]. Although some studies have reported potential therapeutic effects of these plants in order to combat hypertension [4], oxidative stress, inflammation [5], parasitosis (i.e. plasmodium) and virus (i.e Chikungunya, Dengue and Zika) [6–8], their deep content characterization as well as their real efficiency in vivo remains largely unknown.

Since 2012, 22 medicinal plants have been registered at the French pharmacopeia [9]. Among these medicinal plants, *Antirhea borbonica* (*A. borbonica*) leaves are peculiarly interesting as widely used in traditional medicine for treating among others diabetes, urinary tract infection, diarrhoea, haemorrhage, rheumatism and also kidney stones [3,10]. Most of these interesting presumptive effects have been

attributed to the antioxidant and anti-inflammatory properties of *A. borbonica* leaves. Based on these beneficial effects, it has been previously reported that polyphenol-rich extracts from *A. borbonica* exhibited strong antioxidant and anti-inflammatory effect, *in vitro*, on preadipocytes, cerebral endothelial cells and red blood cells [5,11,12] as well as, *in vivo*, in a mouse stroke model [13] and a diet-induced overweight zebrafish model [14]. Importantly these antioxidant and anti-inflammatory biological effects were associated to the capacity of polyphenols to regulate key molecular targets such as ROS-producing and detoxifying enzymes, the redox-sensitive translational factor Nrf2 and improve vasoactive markers in these *in vitro* and *in vivo* pathological models [5, 11, 12, 13, 14].

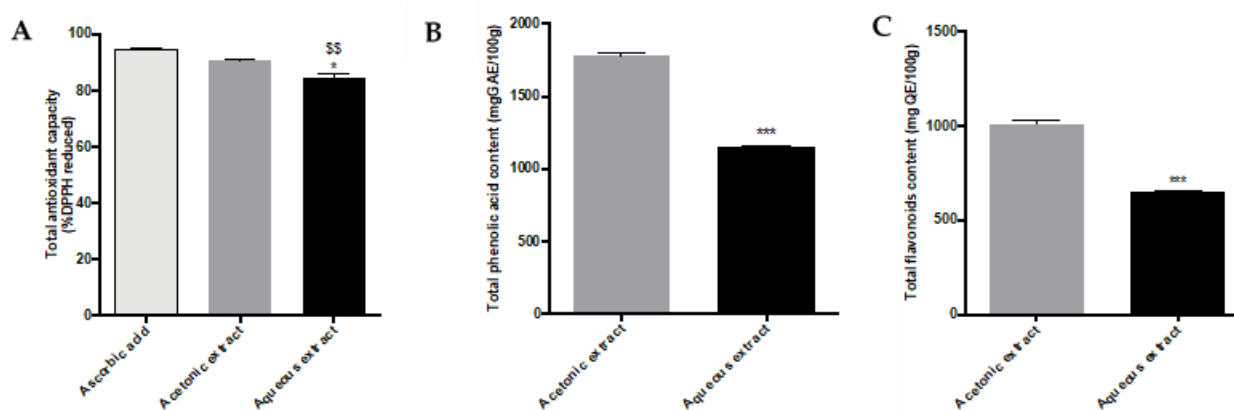
Because *A. borbonica* seems to display therapeutic effects correlated to its polyphenol content, a thorough investigation was required to determine its precise phenolic profile composition and its subsequent potential toxicity. To the best of our knowledge, although registered in French pharmacopeia and despite the various therapeutic effects suggested in a number of *in vitro* studies (see above), no developmental toxicity study has been reported for none of these 22 medicinal plants.

In the present study, we compared the precise phenolic profile of aqueous- and acetonc (polyphenol rich)- extracts from dried leaves of *A. borbonica* by performing LC-MS/MS analysis. In a second part, we investigated the potential toxicity of several concentrations of these extracts using zebrafish model. Zebrafish (*Danio rerio*) due to its small-size, high reproductive ability, rapid embryogenesis and organogenesis, has become the most famous cost-effective alternative model used for large-scale and high-throughput toxicological and physiopathological studies [15,16]. The transparency of zebrafish embryos and larvae enables real-time visualization and imaging of drug-effects throughout the developmental process. This laboratory model is widely used to test compounds toxicity. We consequently determine the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) in a zebrafish embryo and larvae models.

## 2. Results

### 2.1. Determination of total antioxidant activity and phenolic / flavonoid contents aqueous and acetonc extracts.

Due to their traditional use, *A. borbonica* leaves are used for herbal infusion, we assessed the antioxidant capacity of *A. borbonica* aqueous extract and to parallel it with polyphenols-rich extract obtained by acetonc solvent-assisted extraction, supposed to contain the maximal yield of polyphenols. To this end the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay was performed. As shown in Figure 1A, both extracts displayed, compared to ascorbic acid (40 g GAE/L) (94.7 ± 0.5%), an important antioxidant capacity, up to 90.7 ± 0.6% and 84.8 ± 1.2% (\*  $p < 0.05$  vs. 40 g/L of acetonc extract and  $^{**} p < 0.01$  vs. 40 g/L (GAE) ascorbic acid) for polyphenol rich- and aqueous-extracts, respectively. The DPPH assay on both *A. borbonica* extracts at different concentrations (40, 30, 22.5, 16.9, 12.7, 9.5, 7.2 and 2.3 g GAE/L is shown in Figure S1 A. The antioxidant activity is reported in Table 1 as IC<sub>50</sub>, the required concentration for 50% reduction of the DPPH radical. A minimum IC<sub>50</sub> value of 3.1 ± 0.3 g/L for the acetonc extract, followed by the IC<sub>50</sub> value of aqueous extract (3.3 ± 0.3 g/L). These results confirm an important free radical-scavenging activity of both extracts compared to ascorbic acid (2.8 ± 0.1 g/L).



**Figure 1.** Antioxidant capacity, total phenolic acid and flavonoid contents from *A. borbonica* extracts. (A) Total antioxidant capacity of polyphenols-rich extracts from *A. borbonica* was measured by DPPH assay. Ascorbic acid was used as positive control. The results are expressed as % of reduced DPPH. (B) Total phenolic contents of acetonic and aqueous extracts from *A. borbonica* were determined by using the Folin-Ciocalteu colorimetric assay at concentration 40 g/L (plant dried powder). The results are expressed as mg gallic acid equivalent (GAE)/100 g plant dried powder. (C) Total flavonoid contents determined by using the aluminum chloride colorimetric assay. The results are expressed as mg quercetin equivalent (QE)/100g plant dried powder. Data are means  $\pm$  SD of three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (vs. 40 g/L of acetonic extract) and SS  $p < 0.01$  (vs. 40 g/L (GAE) ascorbic acid).

**Table 1.** Antioxidant activities of polyphenols-rich extracts from *A. borbonica* were measured by DPPH assay. Ascorbic acid was used as positive control. The IC<sub>50</sub> values were obtained by plotting the percentage of free radical-quenching activity against logarithm of the different concentrations ranging from 40-2.3 g/L (plant dried powder) for aqueous and acetonic extracts. The results were expressed in g/L. Data are mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

IC <sub>50</sub> (g/L)		
Ascorbic acid	Acetonic extract	Aqueous extract
2.8 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.3

Total phenolic acid and flavonoid contents of acetonic and aqueous extracts were measured by the Folin-Ciocalteu and aluminum chloride colorimetric methods, respectively, for the following range of concentration of *A. borbonica* (40, 30, 22.5, 16.9, 12.7, 9.5, 7.2 and 2.3 g/L) (Figure S1 B, C). The highest phenolic content was exhibited by the acetonic extract with 1778.9  $\pm$  34.1 (\*\*\*)  $p < 0.001$  (vs. 40 g/L of acetonic extract) mg GAE/100 g dried powder followed by the aqueous extract with 1146.9  $\pm$  14.7 mg GAE/100 g dried powder at a concentration of 40 g/L (Figure 1B). As shown in Figure 1C, the acetonic extract exhibited the highest flavonoid content with 1005.6  $\pm$  19.3 mg QE/100 g dried powder followed by the aqueous extract with 648.3  $\pm$  8 (\*\*\*)  $p < 0.001$  (vs. 40 g/L of acetonic extract) mg QE/100 g dry powder at the concentration 40 g/L.

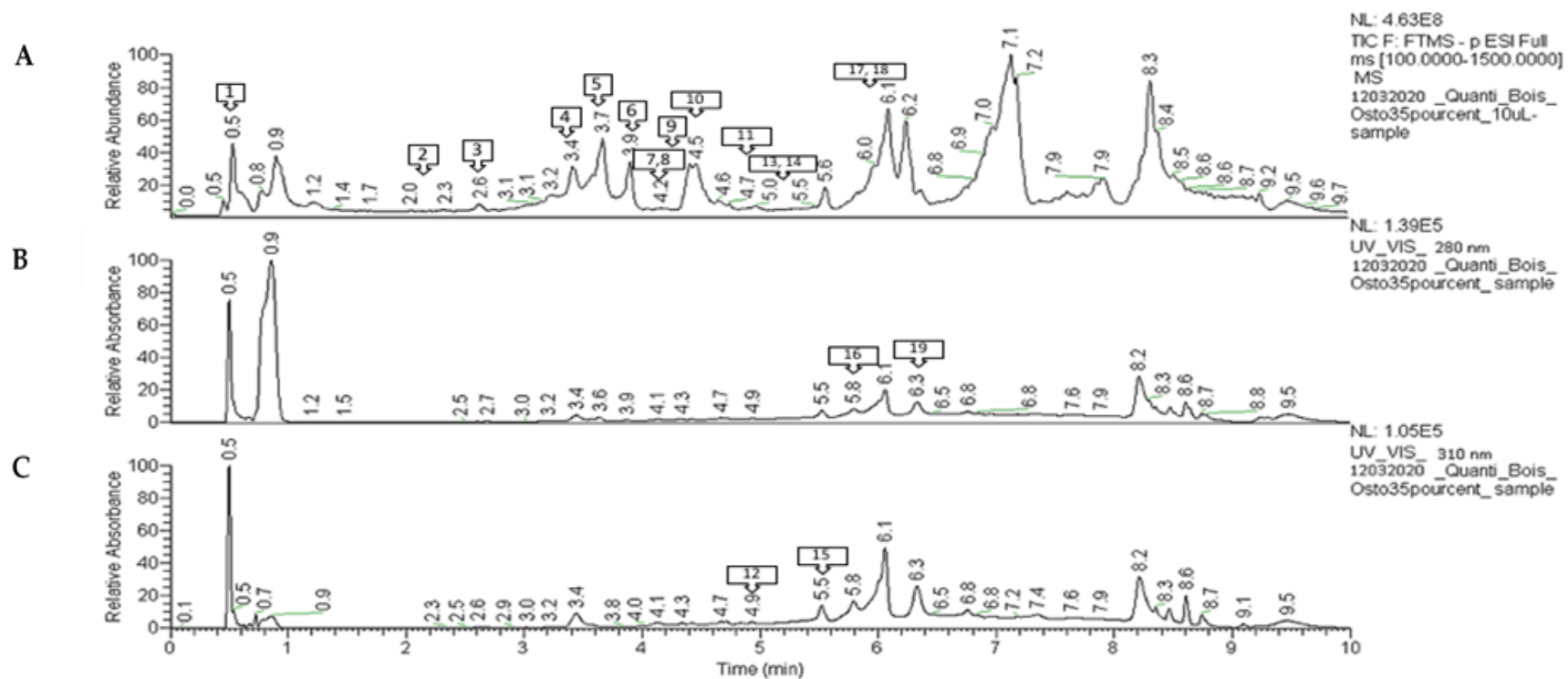
## 2.2. Characterization of polyphenols from *Antirhea borbonica* acetonic extract

In order to determine the composition of *A. borbonica* acetonic extract, a high-resolution accurate mass spectrometry analysis was performed using a Q-Exactive™ Plus mass spectrometer (Table 2). The identification of polyphenols was based on their exact mass, their elemental composition, and their

fragmentation behavior (Figure S2) in comparison with standards and databases. The high-resolution accurate mass spectrometry analysis revealed the presence of 19 compounds including phenolic acids and flavonoids in *A. borbonica* acetonic extracts (Table 2). Similar profiles were obtained from *A. borbonica* aqueous extract (Table S1).

**Table 2.** Identification of 19 compounds in *Antirhea borbonica* acetonic extract by LC HESI-UV-MS/MS in negative mode.

Peak number	RT (min)	Compound	Molecular formula	Mass error (ppm)	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS fragments	mzCloud Best Match (%)
1	0.52	D-Quinic acid	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0.4	191.0554	111.0076	85.5
2	2.17	Protocatechuic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	0.13	153.0184	109.0283	82.7
3	2.63	3-Caffeoylquinic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	1.03	353.0877	191.0554, 179.0343, 173.0447, 135.0441	85
4	3.47	5-Caffeoylquinic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	1.03	353.0877	191.0554, 179.0343, 173.0447, 135.0441	88.3
5	3.68	Caffeic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	0.2	179.0341	135.0441	80.2
6	4.09	<i>p</i> -Coumaroyl quinic acid isomer	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	1.3	337.0931	191.0550, 173.0446, 163,0392	84.6
7	4.18	<i>p</i> -Coumaroyl quinic acid isomer	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	1.3	337.0931	191.0550, 173.0446, 163,0392	84.6
8	4.2	<i>o/m</i> -Coumaric acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0.2	163.0391	119.049	81.2
9	4.36	Feruloylquinic acid	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	0.5	367.1035	191.0550, 173.0446	–
10	4.43	<i>p</i> -Coumaric acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0.1	163.0391	119.049	81.2
11	4.74	Quercetin-3-O-rutinoside (Rutin)	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	1.6	609.1466	300.0274	94.8
12	4.94	Quercetin-3-O-galactoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	1.33	463.0884	300.0274	90.9
13	5.01	Quercetin-3-O-glucoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	1.33	463.0884	300.0274	90.9
14	5.26	Kaempferol-O-hexoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	1.35	447.0935	284.0326	83.7
15	5.45	Kaempferol-O-hexoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	1.35	447.0935	284.0326	83.7
16	5.82	3,5-Dicaffeoylquinic acid	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	1.04	515.1196	353.0878, 191.0554, 179.0343, 173.0447, 135.0441	83.6
17	6.02	3,4-Dicaffeoylquinic acid	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	1.04	515.1195	353.0878, 173.0447, 191.0554, 179.0343, 135.0441	88.1
18	6.2	4-Caffeoylquinic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	1.03	353.0877	173.0447, 191.0554, 179.0343, 173.0447, 135.0441	86.3
19	6.36	1,4/4,5-Dicaffeoylquinic acid	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	1.04	515.1194	353.0878, 173.0447, 191.0554, 179.0343, 135.0441	89.1



**Figure 2.** Spectra obtained for a representative *A. borbonica* acetone-evaporated extract. (A) Representative total ion chromatogram obtained in negative mode. (B) UHPLC-UV chromatograms obtained at 280 nm (C) and 310 nm. Typical total ion chromatogram obtained in negative mode and UV chromatograms at 280 nm/ 310 nm. The different molecules are numbered according to their retention times.



Chromatographic peak 1 (0.52 min) (Figure 2A) showed a precursor ion [M-H]<sup>-</sup> at m/z 191.0554 with a predicted molecular formula C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub> (mass error 0.4 ppm), suggesting the presence of quinic acid. MS2 spectrum (Figure S2 A) indicated a base peak at m/z 111.0076 associated with successive loss of two water molecules and a -CO<sub>2</sub> group from quinic acid.

Chromatographic peak 2 (2.17 min) showed a precursor ion [M-H]<sup>-</sup> at m/z 153.0184, with the following composition C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (mass error 0.13 ppm) and a MS2 base peak at m/z 109.0283 resulting from removal of a -CO<sub>2</sub> group (Figure S2 B). Assignment to protocatechuic acid was achieved by using a commercial standard.

Chromatographic peaks 3, 4 and 18 showed a precursor ion [M-H]<sup>-</sup> at m/z 353.0878 with the following predicted molecular formula C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>9</sub> (mass error 1.03 ppm), suggesting the presence of caffeoylquinic acid isomers (CQA). Indeed, the MS2 spectra (Figure S2 J, C, D) shows the same fragmentation pattern with a base peak at m/z 191.0554 due to the loss of caffeic acid moiety, main product ions at m/z 179.0343 corresponding to loss of quinic acid moiety, m/z 173.0447 to water loss from quinic acid and m/z 135.0441 to loss of a -CO<sub>2</sub> group from caffeic acid. Among these three isomers, only peak 18 (6.2 min) had a MS2 base peak at m/z 173.0447 allowing the identification of 4-CQA, which is consistent with the 4-acylated mono-acyl CGAs [17] (Figure S2 J). Peaks 3 (2.63 min) and 4 (3.47 min) (Figure 2A) can be easily distinguished by their fragmentation. These peaks had both the same MS2 base peak at m/z 191.0554 which is consistent with 3-CQA and 5-CQA acylation but different intensities for the MS2 ion at m/z 179.0343 as previously reported [18–20]. They were identified as 3-CQA and 5-CQA, respectively (Figure S2 C,D).

Chromatographic peak 5 (3.68 min) had a precursor ion [M-H]<sup>-</sup> at m/z 179.0350 with a predicted molecular formula C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub> (mass error 0.2 ppm), suggesting the presence of caffeic acid. A MS2 base peak was observed at m/z 135.0441 corresponding to loss of -CO<sub>2</sub> group from caffeic acid. Furthermore, its identity was confirmed by comparing the fragmentation spectra and the retention time of a caffeic acid reference standard.

Chromatographic peaks 6 (4.09 min) and 7 (4.18 min) showed a precursor ion [M-H]<sup>-</sup> at m/z 337.0931, which has the predicted molecular formula C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>8</sub> (mass error 0.1 ppm), corresponding to p-coumaroylquinic acid isomers (p-CoQA). These two peaks had the same MS2 base peak at m/z 191.0550 and secondary ions at m/z 173.0446 and 163.0392 corresponding to the dehydrated forms of quinic acid and coumaric acid, respectively. Peaks 6 and 7 were identified as 3-or 5- p-coumaroylquinic acids [21, 22] (Figure S2 L, M).

Chromatographic peaks 8 (4.2 min) and 10 (4.43 min) with a precursor ion [M-H]<sup>-</sup> at m/z 163.0391 which had the predicted molecular formula C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>9</sub> (mass error 0.2 ppm), could be coumaric acid isomers. Indeed, these two peaks had the same MS2 ion at m/z 119.049 corresponding to removal of a -CO<sub>2</sub> group from coumaric acid. The identification was further confirmed by comparing the MS2 fragmentation behaviour and the retention time of a p-coumaric acid reference standard. Therefore, peak 8 was identified as m/o-coumaric acid and peak 10 as p-coumaric acid (Figure S1 P).

For the chromatographic peak 9 (4.36 min), a precursor ion [M-H]<sup>-</sup> at m/z 367.1035 with a predicted molecular formula C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub> (mass error 0.5 ppm) was detected, suggesting the presence of feruloylquinic acid (FQA). The MS2 base peak at m/z 191.0550 associated with quinic acid and product ion at m/z 173.0444 were often found for the 5-FQA [23] (Figure S2 O).

Chromatographic peak 11 (4.74 min) shows a precursor ion [M-H]<sup>-</sup> at m/z 609.1464, with the following composition C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>O<sub>16</sub> (mass error 1.6 ppm) and a MS2 base peak at m/z 300.0274 resulting from the neutral loss of a disaccharide rutinose linked to quercetin. Its identification as quercetin-3-O-rutinoside (rutin) was confirmed by comparing the MS2 fragmentation pattern and the retention time of its commercial standard (Figure S1 E).

Chromatographic peak 12 (4.94 min) and 13 (5.01 min) show a precursor ion [M-H]<sup>-</sup> at m/z 463.0884, with the following composition C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>O<sub>12</sub> (mass error 1.33 ppm) and a MS2 base peak at m/z 300.0274 resulting from the neutral loss of a hexose linked to quercetin. Their identification as quercetin-3-O-galactoside (hyperoside) (peak 12) and quercetin-3-O-glucoside (peak 13) (Figure S2 F) was solved by comparing their MS2 fragmentation pattern and their retention time to a hyperoside commercial standard that allowed a reliable discrimination.

For the chromatographic peaks 14 (5.26 min) and 15 (6.45 min), a precursor ion [M-H]<sup>-</sup> at m/z 447.0935 with a predicted molecular formula C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>O<sub>11</sub> (mass error 1.35 ppm) was detected, suggesting the presence of kaempferol hexosides. The MS2 base peak at m/z 284.0326 linked to the loss of hexoside part, reinforced their identification (Figure S2 G).

For the chromatographic peaks 16, 17 and 19, a precursor ion [M-H]<sup>-</sup> at m/z 515.1195 with a predicted molecular formula C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>O<sub>12</sub> (mass error 1.04 ppm) was detected, suggesting the presence of di-caffeoylquinic acid isomers (di-CQA). The main MS2 product ions were at m/z 353.0878 due to the loss of the caffeic acid moiety, m/z 191.0554 corresponding to quinic acid, m/z 179.0342 corresponding to caffeic acid, m/z 173.0447 corresponding to a dehydrated quinic acid and m/z 135.0440 corresponding to a decarboxylated form of caffeic acid. Interestingly, among these four isomers, only peak 16 (5.82 min) had a MS2 base peak at m/z 191.0554, allowing the identification of the 3,5-diCQA (Figure S2 H). The other three isomers had a MS2 base peak at m/z 173.0447 which is consistent with the 4-acylated mono-acyl CGAs. In this way, the peak 17 (6.02 min) was assigned to 3,4-diCQA due to a higher intensity of the quinic acid product ion (m/z 191.0554) than the remaining peaks (Figure S2 I). Due to the lack of standards, peak 19 (6.36 min) was tentatively characterized as either 1,4-diCQA or 4,5-diCQA (Figure S2 Q) [17,18]. Of note, for most of the identified compounds we found an 80% coverage with the MS2 spectra from the mzCloud Database.

### 2.2.1. Phenolic acids quantification by UHPLC-ESI-MS

Quantification by mass spectrometry highlighted a high abundance of cinnamic and benzoic acid derivatives in both extracts (Table 3, Figure S3). Most of the compounds were found in significantly higher concentration in acetonic versus aqueous extracts: 0.002162 *vs* 0.000703 mg/mL of caffeic acid, 0.007596 and 0.001437 mg/mL of dicaffeoylquinic acids isomers and 0.004070 and 0.002415 mg/mL of protocatechuic acid. Interestingly, the concentration of caffeoylquinic acid isomers (5-CQA / 3-CQA) was higher in aqueous relative to acetonic extracts (0.010163 *vs* 0.005559 mg/mL). Anyway, the total amount of phenolic acids and flavonoids is higher in the acetonic extract than the aqueous extract. These results highlight a notable amount of phenolic acids in both *A. borbonica* extracts.

**Table 3.** Quantification of polyphenols-rich acetonic and aqueous extracts from *A. borbonica* by HPLC-ESI-MS. The analysis was performed by using a Q-Exactive™ Plus mass spectrometer at a concentration of 40 g/L. The concentrations of the different compounds were expressed as ng/mL. Data are mean ± SD of three independent experiments. \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01 \*\*\* *p* < 0.001 (*vs.* 40 g/L of acetonic extract). CQA: Caffeoylquinic acid. Di-CQA: Dicafeoylquinic acid.

Peak		Concentration in acetonic extract (mg/mL)	Concentration in aqueous extract (mg/mL)
		Phenolic acids	
5	<b>Caffeic acid</b>	0.002162 ± 0.000066	0.000703 ± 0.000039***
10	<b><i>p</i>-Coumaric acid</b>	0.002755 ± 0.000728	0.001768 ± 0.000176*
8	<b><i>m/o</i>-Coumaric acid</b>	0.000470 ± 0.000003	0.000208 ± 0.000004
4	<b>5-CQA</b>	0.004718 ± 0.000279	0.008558 ± 0.000477***
3	<b>3-CQA</b>	0.000840 ± 0.000093	0.001604 ± 0.000157***
17	<b>3,4-diCQA</b>	0.004704 ± 0.000326	0.000503 ± 0.000034***
19	<b>1,4/4,5-diCQA</b>	0.000262 ± 0.000020	0.000090 ± 0.000003**

16	<b>3,5-diCQA</b>	0.002629 ± 0.000161	0.000842 ± 0.000029***
2	<b>Protocatechuic acid</b>	0.004070 ± 0.000250	0.002415 ± 0.000387***
	<b>Total</b>	0.023061	0.016693
<b>Flavonols</b>			
11	<b>Quercetin-3-O-rutinoside</b>	0.011933 ± 0.002018	0.003977 ± 0.000473***
12	<b>Quercetin-3-O-galactoside</b>	0.001791 ± 0.000204	0.000591 ± 0.000033***
14/15	<b>Kaempferol hexosides</b>	0.000216 ± 0.000054	0.000044 ± 0.000005**
	<b>Total</b>	0.013941	0.004612

Quantification by mass spectrometry confirmed the abundance of flavonol derivatives in both extracts (Table 3, Figure S3). Interestingly, we found 3 times more quercetin-3-O-rutinoside and quercetin-3-O-galactoside in acetonic than in aqueous extract, and 5 times more kaempferol-hexoxides in acetonic than in aqueous extract. These results confirmed the presence of notable amounts of flavonoids in both *A. borbonica* extracts.

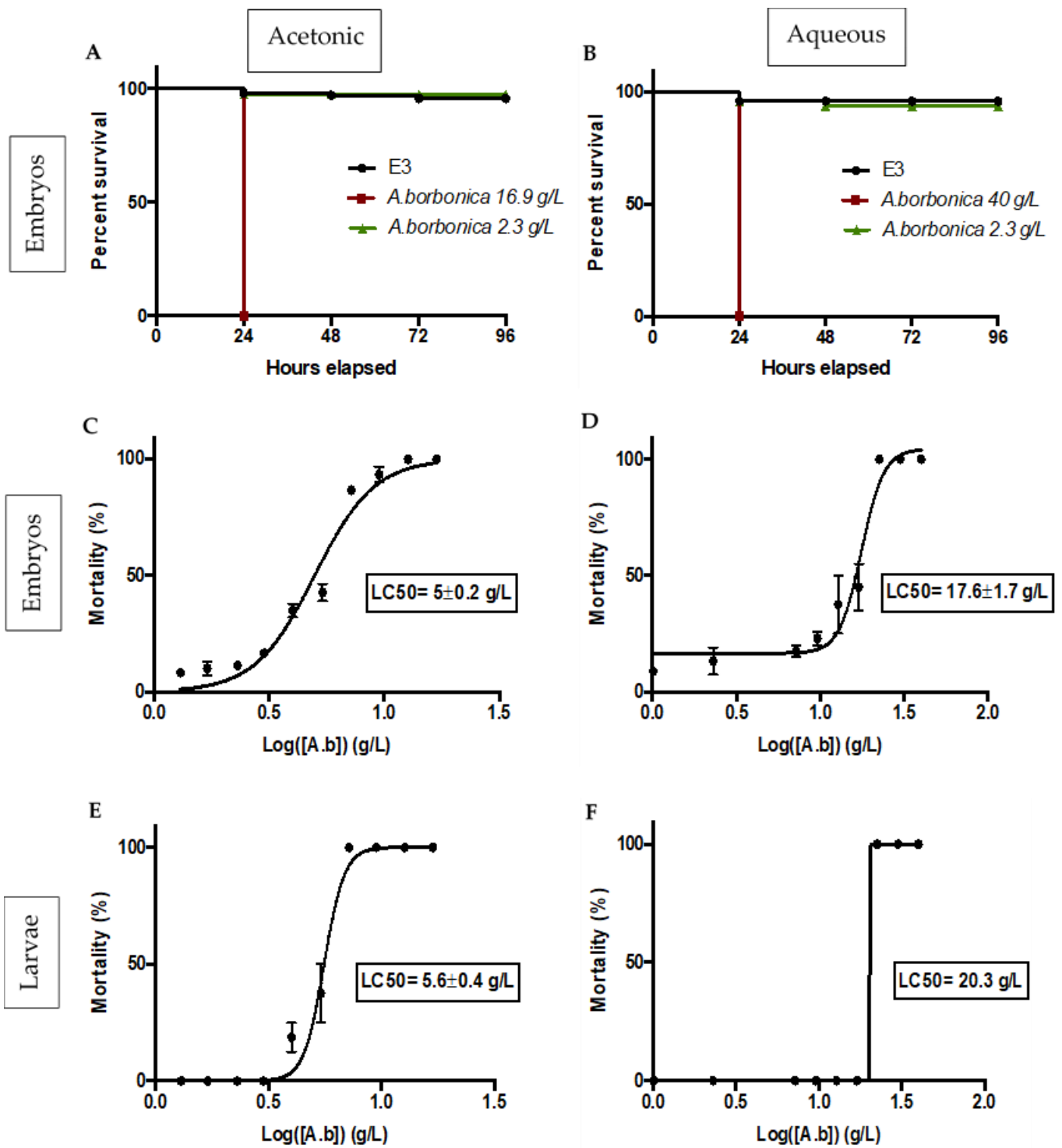
### 2.3. Zebrafish embryo and larvae acute toxicity test.

#### 2.3.1. Survival and lethality curves on zebrafish embryos

In order to investigate the toxic effect of polyphenols-rich acetonic and aqueous extracts from *A. borbonica*, a Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test was performed according to the OECD guidelines [24]. Briefly, fertilized zebrafish eggs (0-3 hpf) were incubated with different concentrations of *A. borbonica* (acetonic or aqueous extract) until 96 hpf (developmental day 4), the extract being freshly renewed every day. Within the first day (0 hpf – 24 hpf), none of the embryos survived at the highest concentrations of acetonic (16.9 g/L) and aqueous (40-22.5 g/L) extracts (Figure 3A, B) as shown by coagulated eggs (Figure 4A, representative picture).

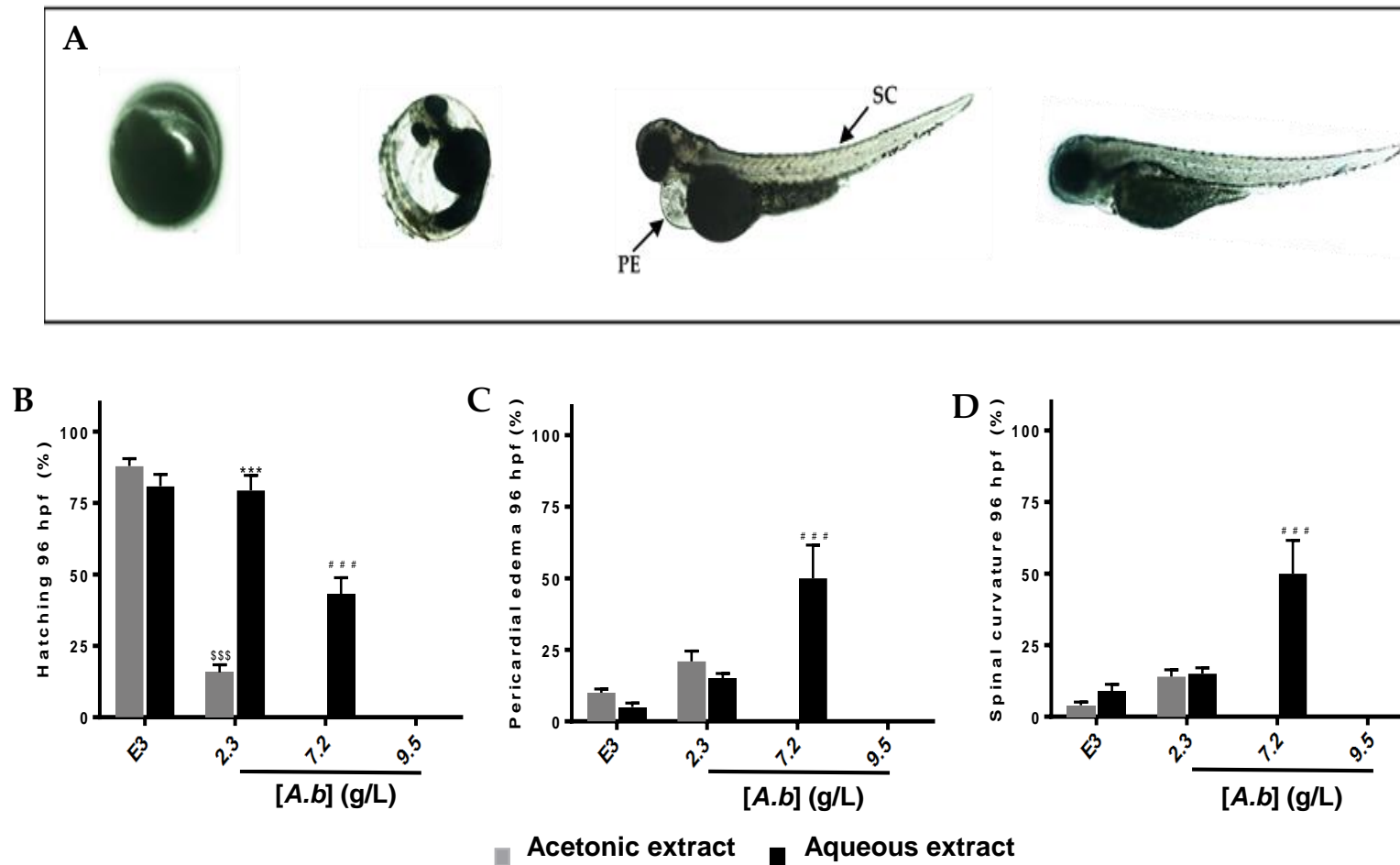
Obviously, the mortality rate is dose dependent (Figure 3A-F). As shown in Figure 3C and D, the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) corresponding to the concentration that induced 50% of mortality, was lower with the acetonic extract than with the aqueous extract (5 ± 0.2 g/L vs 17.6 ± 1.7 g/L, respectively), demonstrating the higher toxicity of the acetonic extract. At non-lethal concentrations (2.3 g/L and 7.2 g/L for acetonic and aqueous extracts, respectively), incubation with polyphenols-rich acetonic and aqueous extracts from *A. borbonica* leads to developmental delay and malformations (Figure 4A-D). Although 90% hatching was measured in the E3 medium, a significant decrease of 75% and 38% in hatching was observed at 96hpf for the acetonic (2.3 g/L) and aqueous (7.2 g/L) extracts, respectively. This percentage reached 0% at 7.2 g/L (acetonic) and 9.5 g/L (aqueous) (Figure 4B). For the hatched embryos, who have been exposed to the two types of extracts we observed 21 ± 3 % and 15 ± 1.6% of pericardial edema with 2.3g/l of acetonic and aqueous extracts respectively, this percentage reaching 50% with 7.2g/L of aqueous extract (Figure 4C). Spinal curvature was observed in 14 ± 2 % and 15 ± 1.5 % of these hatched embryos exposed respectively to acetonic and aqueous extracts and reached 50% at 7.2 g/l of aqueous extract of *A. borbonica* (Figure 4D). Taken together these data demonstrate the deleterious impact of such non-lethal concentrations during zebrafish development.

The toxicity of polyphenols-rich acetonic and aqueous extracts from *A. borbonica* was also studied in zebrafish larvae from 3 to 5 dpf. Indeed, at 3 dpf the swimming larvae already displayed functional livers and kidney allowing to metabolize a variety of compounds [25–27]. As a consequence, the toxicity of the respective extracts could be different in zebrafish embryos and larvae. By treating the zebrafish larvae for 2 days in a way similar than in embryos, the respective LC<sub>50</sub> values were determined for both extracts (Figure 3E, 3F). As in embryo, the LC<sub>50</sub> is higher with the aqueous extract than with the acetonic one (20.3 g/L vs 5.6



**Figure 3.** Survival curves for 96 hpf zebrafish embryos exposed with acetonic (A) or aqueous (B) extracts from *A. borbonica* at high concentrations 16.9 g/L (acetonic) and 40 g/L (aqueous), low concentration 2.3 g/L (acetonic and aqueous), and E3 was considered as control. Median lethal concentration curves (LC<sub>50</sub>) for 96 hpf zebrafish embryos and 72 hpf larvae exposed to acetonic (C & E) or aqueous (D & F) extracts at different concentrations ranging from 16.9-1.3 g/L (acetonic) and 40-2.3 g/L (aqueous) during 4 and 2 days, respectively. The LC<sub>50</sub> values were expressed in g/L. Data are mean ± SD of three independent experiments.

$\pm 0.4$  g/L). In addition, although no significant differences in  $LC_{50}$  were observed between embryos and larvae, the  $LC_{50}$  is weakly higher for larvae than for embryo (20.3 g/L vs  $17.6 \pm 1.7$  g/L, respectively). Our data strongly suggest that even at non-lethal concentrations, these extracts can lead to developmental defects.



**Figure 4.** Morphological malformations and delayed development of zebrafish embryos/larvae exposed to *A. borbonica* extracts. Panel A: From left to right, coagulated egg (at 24 hpf), delayed hatching, spinal curvature, pericardial edema and control embryos/larvae (96 hpf). Arrows indicated the presence of pericardial edema (PE) and spinal curvature (SC). Hatchability rates after 4 days of exposure with acetonic and aqueous extracts at 2.3, 7.2 and 9.5 g/L were represented in B. C and D represent the

percentage of PE and SC, respectively. E3 medium was used as positive control. Data are mean  $\pm$  SD of three independent experiments.  $^{***}p < 0.001$  (vs. E3 (acetic)),  $^{***}p < 0.001$  (vs. acetic extract) and  $^{###}p < 0.001$  (vs. E3 (aqueous)).

### 3. Discussion

Over years, natural phenolic compounds have represented major preventive and/or therapeutic compounds for improving health issue. Indeed, many epidemiological studies have exhibited the beneficial effect of polyphenol-rich diet on cancer, diabetes, obesity, cardiovascular and neurodegenerative diseases [28–35]. Réunion island, a famous biodiversity hotspot, exhibits a wide and rich flora with 22 medicinal plants registered to the French pharmacopeia [9]. These plants are known for their use in traditional medicine [3], and have been reported to be rich in polyphenols [36]. However, they are only poorly characterized concerning their contents, toxicities and their real *in vivo* preventive and/or therapeutic properties.

Among these medicinal plants, *A. borbonica* belonging to *Rubiaceae* family, is peculiarly interesting as widely used in traditional medicine for treating among others diabetes, urinary tract infection, diarrhoea, haemorrhage, rheumatism and also kidney stones [10]. Interestingly, in an ischemia-reperfusion stroke mouse model exposed to hyperglycemia, *A. borbonica* polyphenols display neuroprotective effects preventing the elevation of brain pro-inflammatory cytokine (IL-6) level and exerting its antioxidant property by decreasing reactive oxygen species (ROS) [13]. More recently a preventive protective effect of *A. borbonica* aqueous extract was evidenced in a diet-induced overweight model in zebrafish displaying oxidative stress and blood-brain barrier leakage [14].

In this work, to the best of our knowledge, we performed for the first time the in-depth characterization of the polyphenol content of *A. borbonica* aqueous and acetonetic extracts demonstrating the presence of new molecules never described before for that plant. Furthermore, although used in humans, the safety profile of *A. borbonica* is largely unknown and no toxicological studies have been carried out so far. We consequently provided data concerning the toxicity of the *A. borbonica* aqueous and acetonetic extracts on relevant *in vivo* physiological models using zebrafish embryo and larvae.

#### *Polyphenol content of aqueous and acetonetic extracts*

A quantification by high resolution-mass spectrometry of the acetonetic and aqueous extracts revealed the presence of polyphenols derivatives belonging to phenolic acid and flavonoid classes known to be the most abundant in plant and plant-based foods [37, 38]. From a qualitative point of view, no difference was observed between both extracts. Interestingly, although herbal infusion allows a very powerful polyphenols extraction yield, from a quantitative point of view, the total amount of phenolic acids and flavonoids remains a little higher in the acetonetic extract than the aqueous extract. This result was expected since it is well known that the polyphenols solubility depends on the solvent polarity and the kind of extraction used [39–41].

In this work, we have identified 19 main polyphenols. Among them, we observed that the major compounds of both extracts were quercetin-3-O-rutinoside, caffeoyl- and dicaffeoyl- quinic acids isomers, protocatechuic acid, coumaric acids isomers and caffeic acid. These results were consistent with previous ones reported from our laboratory [5]. However, we provide a significant input to this previous work since our MS<sup>2</sup> spectral analysis identified new compounds such as quercetin-3-O-rutinoside, protocatechuic acid and coumaric acids isomers.

The identification of these new compounds could be explained by a different geographical location of *A. borbonica* leading to different environmental conditions such as moisture, illumination, altitude and temperature [42]. Furthermore, in these previous studies, conventional C18 reverse-phase column was used while in the present study we used a pentafluorophenyl-phase column known to offer a greater selectivity for several compound classes such as aromatic, isomeric compounds, achieved not only by hydrophobic interactions as C18 reverse-phase but also by aromatic,  $\pi$ - $\pi$ , dipole-dipole, ionic interactions and hydrogen bonding [43].

High phenolic acid and flavonoid contents are often associated with high antioxidant capacity of plant extract [44, 45]. These compounds are characterized by one or several aromatic rings with at least one hydroxyl group [37]. This particular chemical structure conferred them different antioxidant activities, due to their ability to directly scavenge free radicals by donating proton/electron [46,47] or by activating antioxidant signaling pathways [48]. Interestingly, DPPH experiment highlighted the strong



capacity of both extracts to reduce the DPPH radicals due to their high content in bioactive molecules. These high antioxidant properties for the acetonic extract are consistent with previous study [5].

*Aqueous and acetonic extracts of Antirhea borbonica exhibit developmental and toxicity at high concentrations.*

Despite the beneficial effects of natural polyphenols, the safe consumption of beverages from medicinal plants remains poorly studied. Indeed, polyphenols can also display adverse effects including carcinogenic/genotoxic ones, act as endocrine disruptors, disturb iron absorption, and also interact with drugs [49]. We consequently decided to investigate for the first time the potential toxicity of the medicinal plant *A. borbonica* by using the zebrafish model. Whilst classical approach for assessment of drugs and plant extracts toxicity is time consuming, expensive and requires *in vitro* and *in vivo* models (mainly rodents), the zebrafish embryo model emerged as a relevant tool for a first toxicological screening approach. This developmental model is widely used to assess drug toxicity [15], and appears as a relevant model given the strong genic homology (more than 70% of human genes have an orthologue in zebrafish). As well, zebrafish display many evolutionary conserved organs and physiological processes [16], and exhibits a high fertility rate as well as transparent eggs allowing their easily monitoring at the different stages of organogenesis [50].

In the present study, we used the fish embryo acute toxicity test (FET) designed by OECD and known to be a reference in the field [24]. At the highest doses tested (40-16.9 g/L), 100% of mortality was observed at 24 hpf for both extracts, in spite of the chorion presence which potentially acts as a barrier. The toxicity of both plant extracts evidenced that the acetonic extract was more toxic than the aqueous extract (LC<sub>50</sub>: 5 ± 0.2 g/L vs 17.6 ± 1.7 g/L, respectively). Such a toxicity may be associated with the high bioactivity of the plant extracts or the presence of others phytochemical compounds such as alkaloids and terpenes known to be produced for the defense against abiotic and probiotic stresses in plants. Previous studies have reported that alkaloids significantly contribute to the toxic effect of various plants [51–53].

Interestingly, for the highest non-lethal concentrations (2.3 g/L (acetonic), 7.2 g/L (aqueous)), we observed a delay in hatching in a concentration- and exposure time-dependent manner. A significant hatching reduction of 38% and 75% was observed at 96 hpf for the aqueous (7.2 g/L) and acetonic (2.3 g/L) extracts, respectively. Hatching normally occurs between 72-96 hpf. Although this remains to be investigated, we can speculate that the delayed hatching observed in our experimental conditions for treated embryo may be induced by an impairment in the hatching process such as the production-secretion of hatching enzymes (zhe1), cathepsin L (catL1) involved in this physiological process [54] as well as in the expression of genes (Zip10 and Znt1a) involved in zinc metabolism known to be essential in the development of the hatching gland [55]. In the chorion, a decrease in larvae motricity due to a delay in the muscular development or an altered larval morphology may also explain the delayed hatching.

As well, we noticed several malformations such as spinal curvature and presence of pericardium edema. These defects are known to occur in presence of toxic molecules leading to kidney impairments or kidney malformations [56–58]. Further investigations are needed to identify the presence of compounds or metabolites inside the zebrafish embryos responsible for the acute toxicity of *A. borbonica* extracts.

We also aimed at identifying the potential toxicity of our extracts in larvae (from 3 to 5 dpf). At 3 dpf, zebrafish larvae exhibit functional liver and kidney suggesting the possible metabolism of several compounds [59, 60]. Interestingly, the study of the toxicity of polyphenols-rich acetonic and aqueous extracts from *A. borbonica* in zebrafish larvae from 3 to 5 dpf, revealed no significant differences in the median lethal concentrations between larvae and embryos, 5±0.2 g/L vs 5.6±0.4 g/L and 17.6 ± 1.7 g/L vs 20.3 g/L for acetonic and aqueous extracts, respectively.

Medicinal plants known as “green gold” are widely used in traditional medicine for centuries across the world. The relatively toxic effect of the medicinal plant relies on different parameters such as plant part used, composition, preparation method and concentration. Among plant-based beverages preparation, the infusion is the most commonly used after decoction. Therefore, we studied the

potential toxic effect of an aqueous extract from *A. borbonica* on zebrafish embryos. A median lethal concentration of  $17.6 \pm 1.7$  g/L was found. This concentration is higher than the concentration recommended by the herbalist for this method of preparation, around 1-4 g for 1 liter. However, we must remain vigilant about taking this aqueous extract which can have teratogenic effects, especially during pregnancy.

## Conclusions

In this study, we identified new major polyphenols such as quercetine-3-O-rutinoside, protocatechuic acid and coumaric acids isomers which have to be taken into account regarding anti-oxidant and anti-inflammatory effect of *A. borbonica*. We report for the first time the potential embryonic and larval toxicity at high concentrations of both acetonic and aqueous extracts from the medicinal plant *A. borbonica* by using the zebrafish embryo model. The present work will be useful to supplement current data on medicinal plant registered at the French pharmacopeia and more generally can be considered as a “proof of concept study” for further analysis of medicinal plants.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Reagents/Standards

Folin-Ciocalteu reagent, sodium carbonate, sodium nitrite, aluminum chloride, DPPH, caffeic acid, caffeoyquinic acid, p-coumaric acid, protocatechuic acid, kaempferol, hyperoside, rutin hydrate and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Solvents as acetone, acetonitrile, methanol and water (HPLC-MS grade) were purchased from Carlo erba (Peypin, France).

### 4.2. Plant material

*Antirhea borbonica* J.F Gmelin (*A. borbonica*) powder (leaves) was obtained from APLAMEDOM institute (Association pour les plantes aromatiques et médicinales de La Réunion) and registered under the following code: DÉTROI.002/2018 stating the date of collection and the GPS coordinates (21°05'44.9"S, 55°39'06.6"E), altitude: 770m. The pharmacist and director of APLAMEDOM performed the botanical identification of *A. borbonica*. The dried (air-dried protected from direct light) leaves were reduced to powder by using a laboratory grinder. Crushed leaves of *A. borbonica* were conserved at -20°C.

### 4.3. Preparation of the plant extracts

Acetonic extract from *A. borbonica* was obtained after dissolving 1g of crushed leaves in 25 mL of an aqueous acetonic solution (70%, v/v). After incubation at 4°C for 90 min, the mixture was centrifuged at 3500 rpm at 4°C for 20 min and polyphenol-rich supernatant was collected and dried by using a rotary evaporator. The extract was resuspended with identical volume of E3 medium (classical embryonic medium), filtered with 20 µm membrane and stored at -20°C until analysis.

Aqueous plant extract (40 g/L) was prepared by infusion technique. Briefly, 1 g of crushed leaves was added with 25 mL of boiled E3 medium for 10 minutes under stirring. The resultant extract was filtered with 20 µm membrane, aliquoted and stored at -20°C until analysis.

For toxicity test using fertilized eggs and larvae zebrafish, aqueous extract was prepared every day extemporaneously.

### 4.4. Measurement of the total antioxidant capacity of polyphenol-rich plant extracts

The total antioxidant capacity was assessed by using the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay. Briefly, in a 96-well microplate, 200 µL of a 0.25 mM DPPH solution and 40 µL from different concentrations (40-2.5 g/L (GAE)) of acetone-evaporated or aqueous extracts were

added and incubated at 25 °C for 30 min. Ascorbic acid solutions prepared at the same concentrations range (gallic acid equivalent) were used as antioxidant standard. The absorbance (Abs) was read at 517 nm (FLUOstar Optima, Bmg Labtech). The percentage of free radical-quenching activity of DPPH was calculated from the following formula:

$$(1) \text{ Antioxidant capacity (\%)} = [(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{sample}}) / Abs_{\text{control}}] \times 100$$

Inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) values corresponding to the concentrations reducing 50% of the initial DPPH• values were obtained by plotting the percentage of free radical-quenching activity against logarithm of the different concentrations ranging from 16.9-1.4 g/L (acetic) and 40-2.5 g/L (aqueous). Once the concentration values were transformed, a nonlinear regression (log (inhibitor) *vs.* response-variable slope) was applied to obtain a sigmoid curve.

#### 4.5. Determination of phenolic acid content

The total phenolic acid contents in acetone-evaporated and aqueous extracts were determined by using the Folin–Ciocalteu assay [61] with slight modifications. Briefly, in a 96-well microplate, 25 µL of plant extract, 125 µL of Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma Aldrich) and 100 µL of 75 g/L sodium carbonate (Sigma) were added and incubated at 50°C for 15 min and then at 4°C for 3 min. The absorbance was measured at 760 nm (FLUOstar Optima, Bmg Labtech). A calibration curve between 12.5-300 µM was prepared using a standard solution of gallic acid (Sigma-Aldrich, Germany). The total phenolic acid contents were expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per 100 g dried plant powder.

#### 4.6. Determination of flavonoid content

The total flavonoid content was determined by using the aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) colorimetric assay, adapted from Zhishen et al. [62]. For this measurement, 100 µL of sample were mixed in a 96-well microplate with 6 µL of 5% aqueous sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>) solution. After 5 min, 6 µL of 10% aqueous AlCl<sub>3</sub> were added and the mixture was vortexed. Then, after 1 min incubation, 40 µL of 1 M NaOH were added. The absorbance was read at 510 nm (FLUOstar Optima, BMG Labtech). A calibration curve between 6.25-300 µM was prepared using a standard solution of quercetin. The total flavonoid contents were expressed as mg quercetin equivalent (QE) per 100 g dried plant powder.

#### 4.7. Polyphenolic compounds identification and quantification by LC-UV-ESI-MS/MS

Polyphenols extracted from *A. borbonica* acetone-evaporated or aqueous extracts were identified by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and HESI-Orbitrap mass spectrometer (Q-Exactive™ Plus, Thermo Scientific). Briefly, 10 µL of sample were injected using an UHPLC system equipped with a Thermo Fisher Ultimate 3000 series WPS-3000 RS autosampler and then separated on a PFP column (2.6 µm, 100 mm × 2.1 mm, Phenomenex, Torrance, CA, United States). 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 0.450 mL/min, with 5% B at 0.00 to 0.1 min, 35% B at 0.1 to 7.1 min, 95% B at 7.2 to 7.9 min and 5% B at 8.0 to 10 min. The column temperature was held at 30°C and the detection wavelength were set to 280 nm and 310 nm allowing identification of phenolic acids and flavonoids, respectively.

For mass spectrometer conditions, a Heated Electrospray Ionization source II (HESI II) was used. Nitrogen was used as drying gas. The mass spectrometric conditions were optimized as follows: spray voltage 2.8 kV, capillary temperature 350°C, sheath gas flow rate 60 units, aux gas flow rate 20 units and S lens RF level 50. Mass spectra were registered in full scan mode from m/z 100 to 1500 in negative ion mode at a resolving power of 70,000 FWHM at m/z 400. The automatic gain control (AGC) was set at 1e6. The MS/MS spectra were obtained by applying a relative higher energy collisional dissociation

(HCD) energy of 25%. Identification of the compounds of interest was based on their retention time, exact mass, elemental composition, MS fragmentation pattern and comparisons with available standards and the advanced mass spectral database, m/z Cloud, <https://www.mzcloud.org>. Data were acquired by XCalibur 4.1 software (Thermo Fisher Scientific Inc.) and processed with compound discoverer 2.1 and Skyline 20.1 software. (MacCoss Lab.)

#### 4.7.1. Preparation of standard solution, calibration curves and method validation

Standard stock solutions of caffeic acid, caffeoylquinic acid, kaempferol, quercetin-3-O-rutinoside, quercetin-3-O-galactoside, protocatechuic acid, coumaric acid were dissolved in methanol at concentration of 1 mg/mL. A mixed stock solution containing 10 µg/mL of each polyphenol standard was prepared in methanol. Calibration standard solutions were prepared by dilution of the mixed stock solutions in 0.1% formic acid in water to obtain the desired calibration curves ranging from 10 to 4000 ng/mL. The quality control (QC) samples were prepared at 25 ng/mL, 250 ng/mL and 4000 ng/mL and analysed in triplicate within each batch.

The calibration curves were built by plotting the peak area of the analytes against the corresponding analytes concentrations with linear regression using standard samples at nine concentrations. The calibration curves of each polyphenols had a correlation coefficient (R<sup>2</sup>) of 0.99. Method accuracy was estimated by calculating the percent deviation observed in the analysis of QC samples and expressed by relative error. Intraday precision was estimated by analysing QC samples at three concentration levels (25, 250, 4000 ng/mL) of the seven analytes within 24 h (n=8). Inter-day accuracy was estimated by repeated analysis of QC samples (n=8).

The variability was expressed as the relative standard deviation (RSD, %) and the accuracy was expressed as the relative error (RE, %). The limit of quantification (LOQ) was defined as the lowest analytical concentration of the calibration curve at which the measured precision expressed as relative standard deviation (RSD) was within 20% and the accuracy expressed as relative error (RE) was in the range of 20%.

#### 4.8. Zebrafish husbandry

Adult AB wildtype zebrafish (*Danio rerio*, AB strain) were housed in the zebrafish facility of the CYROI/DéTROI, La Réunion (A974001). They were maintained under standard conditions of photoperiod (14 hours dark/10 hours light), temperature (28.5°C), conductivity (400 µS) and pH (7.4). Zebrafish were fed daily (3 times a day) with commercially available food (Planktovie, GEMMA 300). All animal experiments were performed in CYROI/DéTROI (UMR 1188) and conducted in accordance with the French and European Community Guidelines for the Use of Animals in Research (86/609/EEC and 2010/63/EU).

#### 4.9. Developmental toxicity test (zebrafish embryos)

The day before the starting of the toxicity test assay, breeding males and females (optimal ratio 2:1) were placed in the same tank but were physically separated. The next day, 1h after light onset, fish couples were allowed to spawn for 1h. The eggs were collected, rinsed with fish water system, randomly mixed and quickly distributed in the different concentrations of *A. borbonica* aqueous and acetone-evaporated extracts prepared with E3 medium. The treatment is performed between 1- and 3-hours post fertilization (dpf) for embryos and between 3-5dpf for larvae. The quality of the spawn (>70% of fertilization) was checked for fitting with the OECD recommendations (guidelines 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test) [24]. The fertilized eggs were selected using a stereomicroscope and dispatched in a 24 well-plate as follows: in each well, five fertilized eggs were placed in 2 mL of the respective concentrations of either *A. borbonica* aqueous extract (40, 30, 22.5, 16.9, 12.7, 9.5, 7.2 and 2.3 g/L) or *A. borbonica* acetone-evaporated extract (16.9, 12.7, 9.5, 7.2, 5.4, 4, 3, 2.3, 1.7 and 1.3 g/L) diluted in E3 medium. The concentration range was chosen on the basis of traditional use which consists of infusion of 1-4 g of dried leaves in 1 liter of boiled water for 10 minutes. Because *A. borbonica* has been

registered at the French pharmacopeia this concentration was supposed to be non-toxic in adult. Thus, the lowest doses tested were 2.3 g/L and 1.3 g/L for aqueous and acetone-evaporated extract, respectively.

A total of 20 eggs or 10 larvae were tested for each concentration. These experiments were repeated three times independently. The 24 well-plate was incubated at 26°C +/- 1°C. Negative controls (E3 medium only) and positive controls (E3 medium + 25% DMSO) were also placed in the 24 well-plate.

The treatment was renewed each day using a freshly prepared *A. borbonica* extracts. Zebrafish development was carefully checked by using a stereo microscope (Nikon SMZ18) at 24, 48, 72 and 96 hpf looking at four apical observations as indicators of lethality according to the OECD guidelines 236: (i) coagulation of fertilized eggs, (ii) lack of somite formation, (iii) lack of detachment of the tail-bud from the yolk sac, and (iv) lack of heartbeat. At the end of the exposure period, acute and developmental toxicity (teratogenicity) were determined according to the OECD ruled based on a positive outcome in any of the four apical observations recorded. The percentage of mortality was determined by using the following equation:

$$(2) \text{ Mortality (\%)} = (\text{Number of dead embryos} / \text{Total number of embryos}) \times 100$$

Lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) corresponding to the concentration that induced 50% of mortality were obtained by plotting the percentage of cumulative mortality at 96 hpf against logarithm of the different concentrations. A nonlinear regression (log (inhibitor) vs. response-variable slope) was applied to obtain a sigmoid curve. In addition, morphological abnormalities such as spinal curvature, delay in pigmentation, delay in eyes color and delay hatching were recorded.

#### 4.10. Statistical analyses

Data are expressed as the mean ± standard deviation (SD) from at least three independent experiments performed in triplicate. Statistical analyses and determination of IC<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> were performed with Graph-Pad Prism 6.3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Comparison between more than 2 groups was determined by using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Figure S1: title, Table S1: title, Video S1: title. Supplementary Materials: The following are available online. Figure S1: Total phenolic acid, flavonoid contents and antioxidant capacity from *A. borbonica* extracts. Figure S2: Fragmentation pattern of each identified compound obtained in negative mode. Figure S3: Quantification of polyphenols-rich acetonic and aqueous extracts from *A. borbonica* by UHPLC-ESI-MS. Table S1: Identification of 20 compounds in Antirhea borbonica herbal infusion by LC-HESI-UV-MS/MS in negative mode. Table S2: Percentage of coagulated embryos at 1dpf and of developmental malformations (Pericardial Edema (PE); Spinal Curvature (SC)) for embryos at 4dpf and larvae at 5dpf.

**Funding:** This research was funded by European Regional Development Funds (FEDER RE0022527 ZEBRATOX, EU-Région Réunion-French State national counterpart), the University of La Réunion and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Bryan Veeren is a recipient of a fellowship from the Région Réunion.

**Author Contributions:** Conceptualization: BV, ND and JLB; Data curation: BV, BG, MB and SK; Formal analysis : BV, ND and JLB; Funding acquisition: JLB, OM; Investigation: BV, BG, MB and SK; Methodology: BV, MB; Ressources: ND; Writing – original draft: BV and JLB; Writing – review & editing: BV, MPG, OM, ND and JLB.

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



## References

1. McDougall, I.; Chamalaun, F.H. Isotopic Dating and Geomagnetic Polarity Studies on Volcanic Rocks from Mauritius, Indian Ocean. *Geol Soc America Bull* **1969**, *80*, 1419, doi: 10.1130/0016-7606(1969)80[1419:IDAGPS]2.0.CO;2.
2. Agnarsson, I.; Kuntner, M. The Generation of a Biodiversity Hotspot: Biogeography and Phylogeography of the Western Indian Ocean Islands. In *Current Topics in Phylogenetics and Phylogeography of Terrestrial and Aquatic Systems*; Anamthawat-Jnsson, K., Ed.; InTech, **2012** ISBN 978-953-51-0217-5.
3. Lavergne, R. *Tisaneurs et plantes médicinales indigènes à la Réunion*; Orphie: Livry Gargan, **2016**; ISBN 979-10-298-0073-3.
4. Adersen, A.; Adersen, H. Plants from Réunion Island with alleged antihypertensive and diuretic effects—an experimental and ethnobotanical evaluation. *Journal of Ethnopharmacology* **1997**, *58*, 189–206, doi: 10.1016/S0378-8741(97)00100-1.
5. Marimoutou, M.; Le Sage, F.; Smadja, J.; Lefebvre d’Hellencourt, C.; 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismutase and NF- $\kappa$ B genes. *J Inflamm (Lond)* **2015**, *12*, 10, doi: 10.1186/s12950-015-0055-6.
6. Fortin, H.; Vigor, C.; Lohézic-Le Dévéhat, F.; Robin, V.; Le Bossé, B.; Boustie, J.; Amoros, M. In vitro antiviral activity of thirty-six plants from La Réunion Island. *Fitoterapia* **2002**, *73*, 346–350, doi: 10.1016/S0367-326X(02)00080-1.
7. 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.
8. Haddad, J.G.; Koishi, A.C.; Gaudry, A.; Nunes Duarte Dos Santos, C.; Viranaicken, W.; Desprès, P.; El Kalamouni, C. *Doratoxylon apetalum*, an Indigenous Medicinal Plant from Mascarene Islands, Is a Potent Inhibitor of Zika and Dengue Virus Infection in Human Cells. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi: 10.3390/ijms20102382.
9. Giraud-Techer, S. Plantes médicinales de La Réunion inscrites à la Pharmacopée française. *Ethnopharmacologia* **2016**, 7–33.
10. Poullain, C.; Girard-Valenciennes, E.; Smadja, J. Plants from reunion island: evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities. *J Ethnopharmacol* **2004**, *95*, 19–26, doi: 10.1016/j.jep.2004.05.023.
11. 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 (Basel)* **2020**, *9*, doi: 10.3390/antiox9070573.
12. Delveaux, J.; Turpin, C.; Veeren, B.; Diotel, N.; Bravo, S.B.; Begue, F.; Álvarez, E.; Meilhac, O.; Bourdon, E.; Rondeau, P. *Antirhea borbonica* Aqueous Extract Protects Albumin and Erythrocytes from Glycoxidative Damages. *Antioxidants (Basel)* **2020**, *9*, doi: 10.3390/antiox9050415.
13. Arcambal, A.; Taïlé, J.; Couret, D.; Planesse, C.; Veeren, B.; Diotel, N.; Gauvin-Bialecki, A.; Meilhac, O.; Gonthier, M.-P. Protective Effects of Antioxidant Polyphenols against Hyperglycemia-Mediated Alterations in Cerebral Endothelial Cells and a Mouse Stroke Model. *Mol Nutr Food Res* **2020**, *64*, e1900779, doi: 10.1002/mnfr.201900779.
14. Ghaddar, B.; Veeren, B.; Rondeau, P.; Bringart, M.; Lefebvre d’Hellencourt, C.; 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, doi: 10.1038/s41598-020-71402-2.
15. Horzmann, K.A.; Freeman, J.L. Making Waves: New Developments in Toxicology With the Zebrafish. *Toxicological Sciences* **2018**, *163*, 5–12, doi:10.1093/toxsci/kfy044.
16. Tal, T.; Yaghoobi, B.; Lein, P.J. Translational toxicology in zebrafish. *Current Opinion in Toxicology* **2020**, 23–24, 56–66, doi: 10.1016/j.cotox.2020.05.004.
17. Clifford, M.N.; Knight, S.; Kuhnert, N. Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MSn. *J. Agric. Food Chem* **2005**, *53*, 3821–3832, doi: 10.1021/jf050046h.

18. Clifford, M.N.; Johnston, K.L.; Knight, S.; Kuhnert, N. Hierarchical Scheme for LC-MS n <sup><sup>/></sup> Identification of Chlorogenic Acids. *J. Agric. Food Chem* **2003**, *51*, 2900–2911, doi:10.1021/jf026187q.
19. Fang, N.; Yu, S.; Prior, R.L. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *J. Agric. Food Chem* **2002**, *50*, 3579–3585, doi: 10.1021/jf0201327.
20. Jaiswal, R.; Patras, M.A.; Eravuchira, P.J.; Kuhnert, N. Profile and characterization of the chlorogenic acids in green Robusta coffee beans by LC-MS(n): identification of seven new classes of compounds. *J. Agric. Food Chem* **2010**, *58*, 8722–8737, doi: 10.1021/jf1014457.
21. Clifford, M.N.; Marks, S.; Knight, S.; Kuhnert, N. Characterization by LC-MS(n) of four new classes of p-coumaric acid-containing diacyl chlorogenic acids in green coffee beans. *J. Agric. Food Chem* **2006**, *54*, 4095–4101, doi: 10.1021/jf060536p.
22. Wu, S.-B.; Meyer, R.S.; Whitaker, B.D.; Litt, A.; Kennelly, E.J. A new liquid chromatography–mass spectrometry-based strategy to integrate chemistry, morphology, and evolution of eggplant (*Solanum*) species. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1314*, 154–172, doi: 10.1016/j.chroma.2013.09.017.
23. Clifford, M.N.; Knight, S.; Surucu, B.; Kuhnert, N. Characterization by LC-MSn of Four New Classes of Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans: Dimethoxycinnamoylquinic Acids, Diferuloylquinic Acids, Caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic Acids, and Feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic Acids. *J. Agric. Food Chem* **2006**, *54*, 1957–1969, doi:10.1021/jf0601665.
24. OECD guidelines for the testing of chemicals. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. **2013**.
25. Drummond, I.A.; Majumdar, A.; Hentschel, H.; Elger, M.; Solnica-Krezel, L.; Schier, A.F.; Neuhauss, S.C.; Stemple, D.L.; Zwartkruis, F.; Rangini, Z.; et al. Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development* **1998**, *125*, 4655–4667.
26. Goldstone, J.V.; McArthur, A.G.; Kubota, A.; Zanette, J.; Parente, T.; Jönsson, M.E.; Nelson, D.R.; Stegeman, J.J. Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. *BMC Genomics* **2010**, *11*, 643, doi: 10.1186/1471-2164-11-643.
27. Field, H.A.; Ober, E.A.; Roeser, T.; Stainier, D.Y.R. Formation of the digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis. *Dev. Biol* **2003**, *253*, 279–290, doi: 10.1016/s0012-1606(02)00017-9.
28. Flores-Pérez, A.; Marchat, L.A.; Sánchez, L.L.; Romero-Zamora, D.; Arechaga-Ocampo, E.; Ramírez-Torres, N.; Chávez, J.D.; Carlos-Reyes, Á.; Astudillo-de la Vega, H.; Ruiz-García, E.; et al. Differential proteomic analysis reveals that EGCG inhibits HDGF and activates apoptosis to increase the sensitivity of non-small cells lung cancer to chemotherapy. *Prot. Clin. Appl* **2016**, *10*, 172–182, doi: 10.1002/prca.201500008.
29. Zamora-Ros, R.; Touillaud, M.; Rothwell, J.A.; Romieu, I.; Scalbert, A. Measuring exposure to the polyphenol metabolome in observational epidemiologic studies: current tools and applications and their limits. *Am. J. Clin. Nutr* **2014**, *100*, 11–26, doi: 10.3945/ajcn.113.077743.
30. Khan, N.; Mukhtar, H. Modulation of signaling pathways in prostate cancer by green tea polyphenols. *Biochem. Pharmacol* **2013**, *85*, 667–672, doi: 10.1016/j.bcp.2012.09.027.
31. Afshin, A.; Micha, R.; Khatibzadeh, S.; Mozaffarian, D. Consumption of nuts and legumes and risk of incident ischemic heart disease, stroke, and diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr* **2014**, *100*, 278–288, doi: 10.3945/ajcn.113.076901.
32. Hooper, L.; Kroon, P.A.; Rimm, E.B.; Cohn, J.S.; Harvey, I.; Le Cornu, K.A.; Ryder, J.J.; Hall, W.L.; Cassidy, A. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr* **2008**, *88*, 38–50, doi: 10.1093/ajcn/88.1.38.
33. Rasines-Perea, Z.; Teissedre, P.-L. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Molecules* **2017**, *22*, doi: 10.3390/molecules22010068.
34. Colizzi, C. The protective effects of polyphenols on Alzheimer's disease: A systematic review. *Alzheimers Dement (N Y)* **2019**, *5*, 184–196, doi: 10.1016/j.trci.2018.09.002.
35. 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, doi: 10.1080/1040869059096.
36. 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, doi: 10.1016/j.phrs.2017.02.020.

37. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2004**, *79*, 727–747, doi: 10.1093/ajcn/79.5.727.
38. Pérez-Jiménez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *J. Agric. Food Chem* **2010**, *58*, 4959–4969, doi: 10.1021/jf100128b.
39. *Methods in polyphenol analysis*; Santos-Buelga, C., Williamson, G., Royal Society of Chemistry (Great Britain), Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2003**; ISBN 978-0-85404-580-8.
40. Stalikas, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci* **2007**, *30*, 3268–3295, doi: 10.1002/jssc.200700261.
41. Złotek, U.; Mikulska, S.; Nagajek, M.; Świeca, M. The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. *Saudi J Biol Sci* **2016**, *23*, 628–633, doi: 10.1016/j.sjbs.2015.08.002.
42. Liu, W.; Yin, D.; Li, N.; Hou, X.; Wang, D.; Li, D.; Liu, J. Influence of Environmental Factors on the Active Substance Production and Antioxidant Activity in *Potentilla fruticosa* L. and Its Quality Assessment. *Sci Rep* **2016**, *6*, 28591, doi: 10.1038/srep28591.
43. Regos, I.; Treutter, D. Optimization of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of complex polyphenol mixtures and application for sainfoin extracts (*Onobrychis viciifolia*). *J Chromatogr A* **2010**, *1217*, 6169–6177, doi: 10.1016/j.chroma.2010.07.075.
44. Aryal, S.; Baniya, M.K.; Danekhu, K.; Kunwar, P.; Gurung, R.; Koirala, N. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants (Basel)* **2019**, *8*, doi:10.3390/plants8040096.
45. Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J.-M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem* **2009**, *57*, 1768–1774, doi:10.1021/jf803011r.
46. Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **2006**, *99*, 191–203, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042.
47. 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, doi: 10.3109/10715762.2013.879985.
48. Sirota, R.; Gibson, D.; Kohen, R. The timing of caffeic acid treatment with cisplatin determines sensitization or resistance of ovarian carcinoma cell lines. *Redox Biol* **2017**, *11*, 170–175, doi: 10.1016/j.redox.2016.12.006.
49. Mennen, L.I.; Walker, R.; Bennetau-Pelissero, C.; Scalbert, A. Risks and safety of polyphenol consumption. *Am. J. Clin. Nutr* **2005**, *81*, 326S–329S, doi: 10.1093/ajcn/81.1.326S.
50. Kimmel, C.B.; Ballard, W.W.; Kimmel, S.R.; Ullmann, B.; Schilling, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn* **1995**, *203*, 253–310, doi: 10.1002/aja.1002030302.
51. Cortinovis, C.; Caloni, F. Alkaloid-Containing Plants Poisonous to Cattle and Horses in Europe. *Toxins (Basel)* **2015**, *7*, 5301–5307, doi: 10.3390/toxins7124884.
52. Cheeke, P.R. Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *J. Anim. Sci* **1988**, *66*, 2343–2350, doi: 10.2527/jas1988.6692343x.
53. Diaz, G.J. Toxicosis by Plant Alkaloids in Humans and Animals in Colombia. *Toxins (Basel)* **2015**, *7*, 5408–5416, doi: 10.3390/toxins7124892.
54. Sano, K.; Inohaya, K.; Kawaguchi, M.; Yoshizaki, N.; Iuchi, I.; Yasumasu, S. Purification and characterization of zebrafish hatching enzyme - an evolutionary aspect of the mechanism of egg envelope digestion. *FEBS J* **2008**, *275*, 5934–5946, doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06722.x.
55. Muraina, I.A.; Maret, W.; Bury, N.R.; Hogstrand, C. Hatching gland development and hatching in zebrafish embryos: A role for zinc and its transporters Zip10 and Znt1a. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **2020**, *528*, 698–705, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.05.131.
56. Hill, A.J.; Teraoka, H.; Heideman, W.; Peterson, R.E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci* **2005**, *86*, 6–19, doi: 10.1093/toxsci/kfi110.



57. McCampbell, K.K.; Wingert, R.A. New tides: using zebrafish to study renal regeneration. *Transl Res* **2014**, *163*, 109–122, doi: 10.1016/j.trsl.2013.10.003.
58. Hanke, N.; Staggs, L.; Schroder, P.; Litteral, J.; Fleig, S.; Kaufeld, J.; Pauli, C.; Haller, H.; Schiffer, M. “Zebrafishing” for novel genes relevant to the glomerular filtration barrier. *Biomed Res Int* **2013**, *2013*, 658270, doi: 10.1155/2013/658270.
59. Morello, J.; Derks, R.J.E.; Lopes, S.S.; Steenvoorden, E.; Monteiro, E.C.; Mayboroda, O.A.; Pereira, S.A. Zebrafish Larvae Are a Suitable Model to Investigate the Metabolic Phenotype of Drug-Induced Renal Tubular Injury. *Front. Pharmacol* **2018**, *9*, 1193, doi: 10.3389/fphar.2018.01193.
60. van Wijk, R.C.; Krekels, E.H.J.; Hankemeier, T.; Spaink, H.P.; van der Graaf, P.H. Systems pharmacology of hepatic metabolism in zebrafish larvae. *Drug Discovery Today: Disease Models* **2016**, *22*, 27–34, doi: 10.1016/j.ddmod.2017.04.003.
61. Singleton, V.L. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **1965**, 144–158.
62. Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* **1999**, *64*, 555–559, doi: 10.1016/S0308-8146(98)00102-2.

## Données supplémentaires

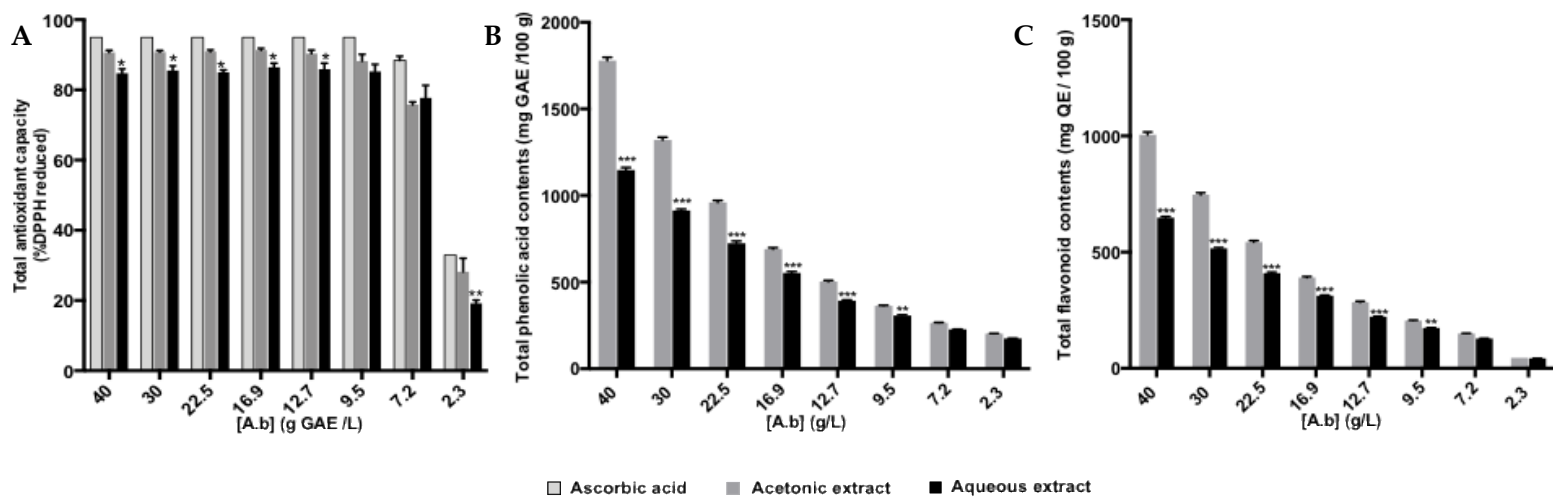
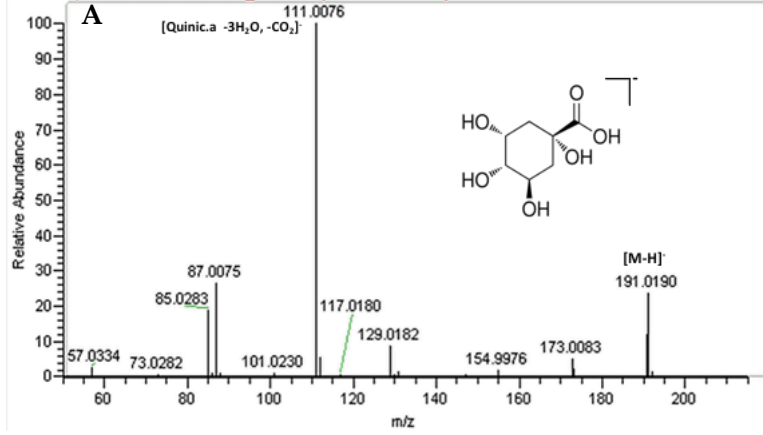


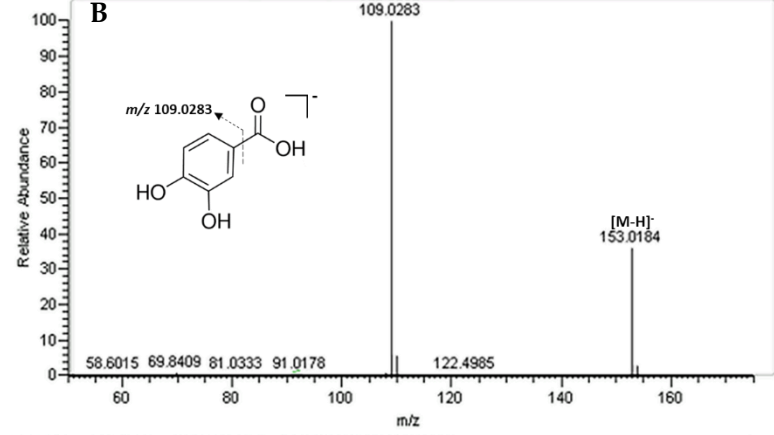
Figure S1. Total phenolic acid, flavonoid content and antioxidant capacity from *A. borbonica* extracts.

(A) The total antioxidant capacity of polyphenols-rich extracts from *A. borbonica* (*A.b*) were measured by DPPH assay at different concentrations ranging from 40 to 2.3 g GAE/L. Ascorbic acid was used as positive control. The results were expressed as % DPPH reduced. (B) The total phenolic contents of an acetonic and aqueous extracts from *A. borbonica* were determined by using the Folin-Ciocalteu colorimetric assays at different concentrations ranging from 40 to 2.3 g/L (dried plant powder). The results were expressed as mg gallic acid equivalent (GAE)/100 g dried plant powder. (C) The total flavonoid contents were determined by using the aluminum chloride colorimetric assay. The results were expressed as mg quercetin equivalent (QE)/100g dried plant powder. Data are mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (vs. acetonic extract).

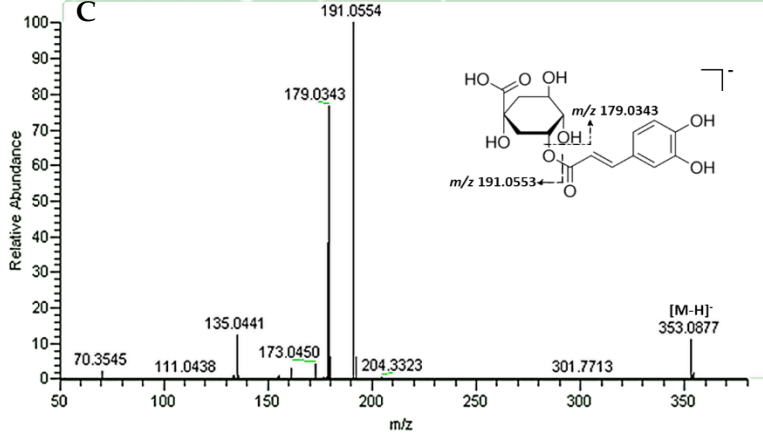
F: FTMS - p ESI d Full ms2 191.0553@hcd25.00 [50.0000-215.0000]



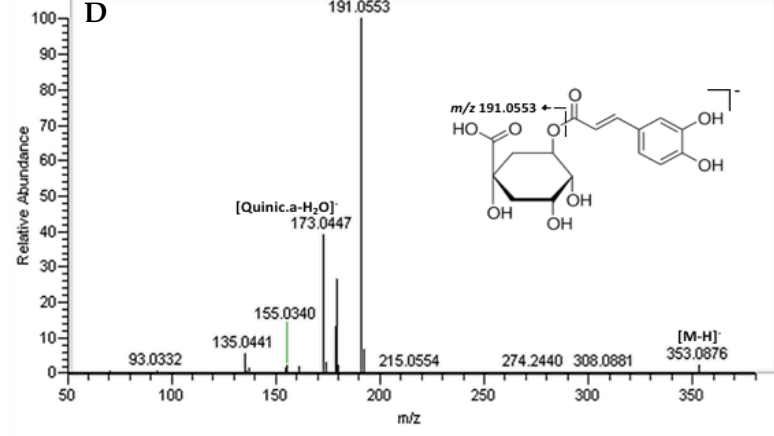
F: FTMS - p ESI d Full ms2 153.0183@hcd25.00 [50.0000-175.0000]



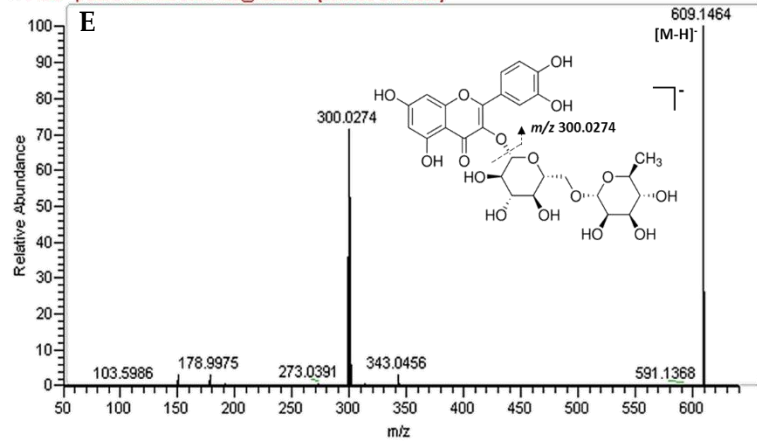
F: FTMS - p ESI d Full ms2 353.0879@hcd25.00 [50.0000-380.0000]



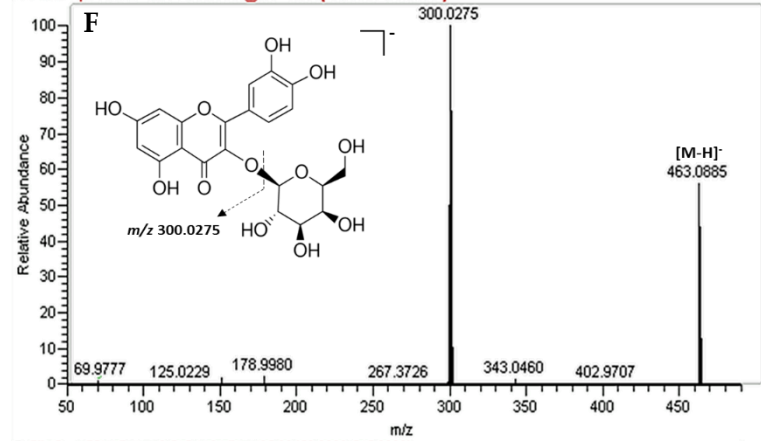
F: FTMS - p ESI d Full ms2 353.0879@hcd25.00 [50.0000-380.0000]



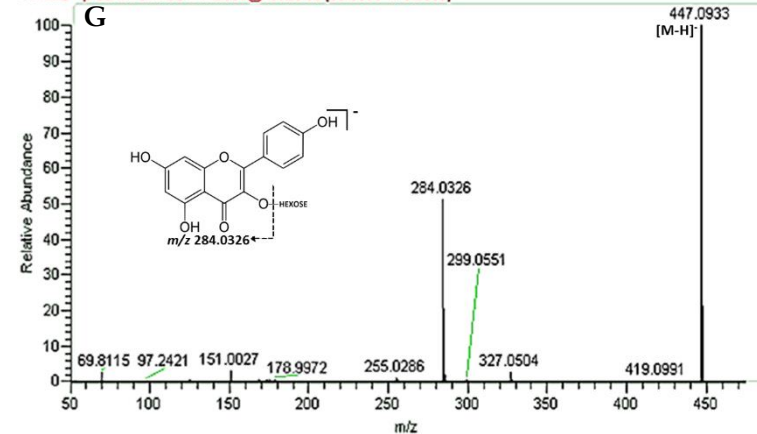
F: FTMS - p ESI d Full ms2 609.1468@hcd25.00 [50.0000-640.0000]



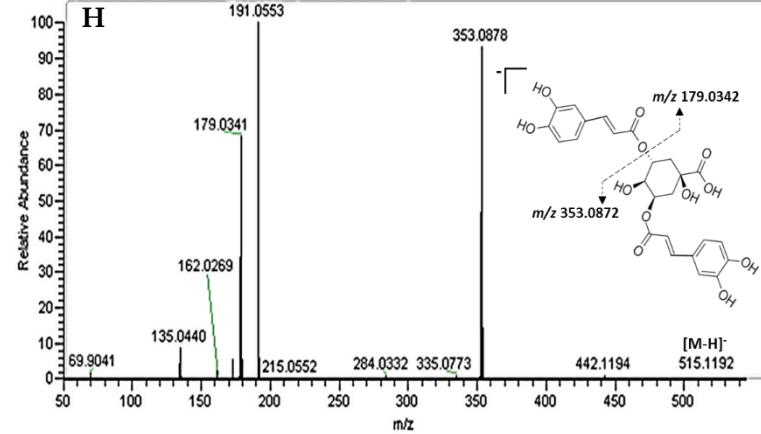
F: FTMS - p ESI d Full ms2 463.0885@hcd25.00 [50.0000-490.0000]



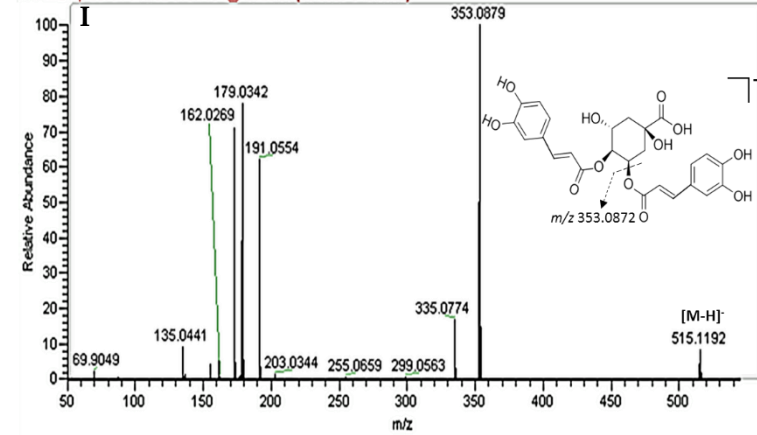
F: FTMS - p ESI d Full ms2 447.0936@hcd25.00 [50.0000-475.0000]



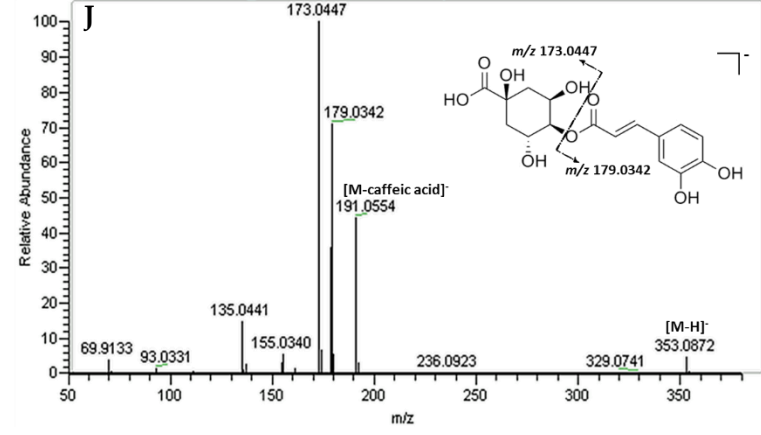
F: FTMS - p ESI d Full ms2 515.1194@hcd25.00 [50.0000-545.0000]



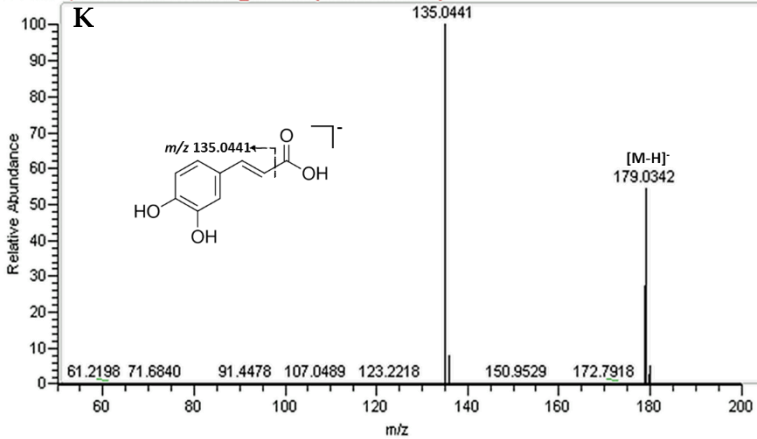
F: FTMS - p ESI d Full ms2 515.1194@hcd25.00 [50.0000-545.0000]



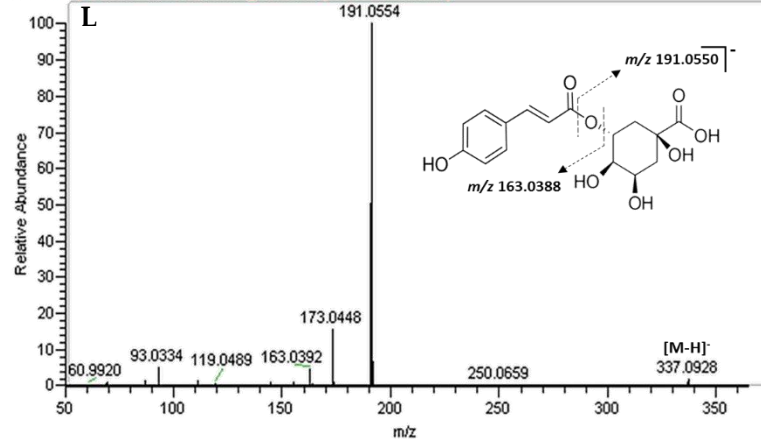
F: FTMS - p ESI d Full ms2 353.0880@hcd25.00 [50.0000-380.0000]

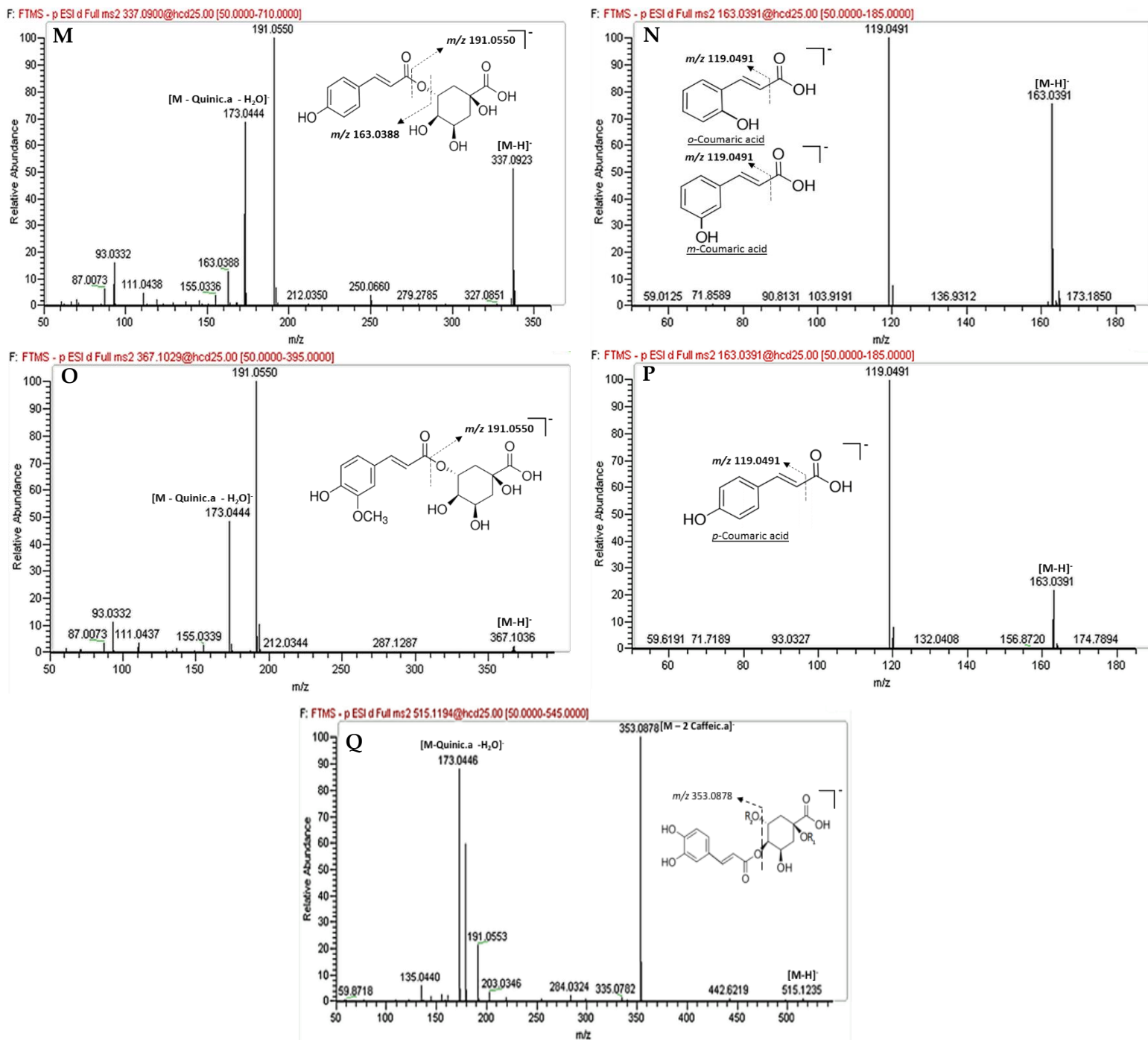


F: FTMS - p ESI d Full ms2 179.0342@hcd25.00 [50.0000-200.0000]



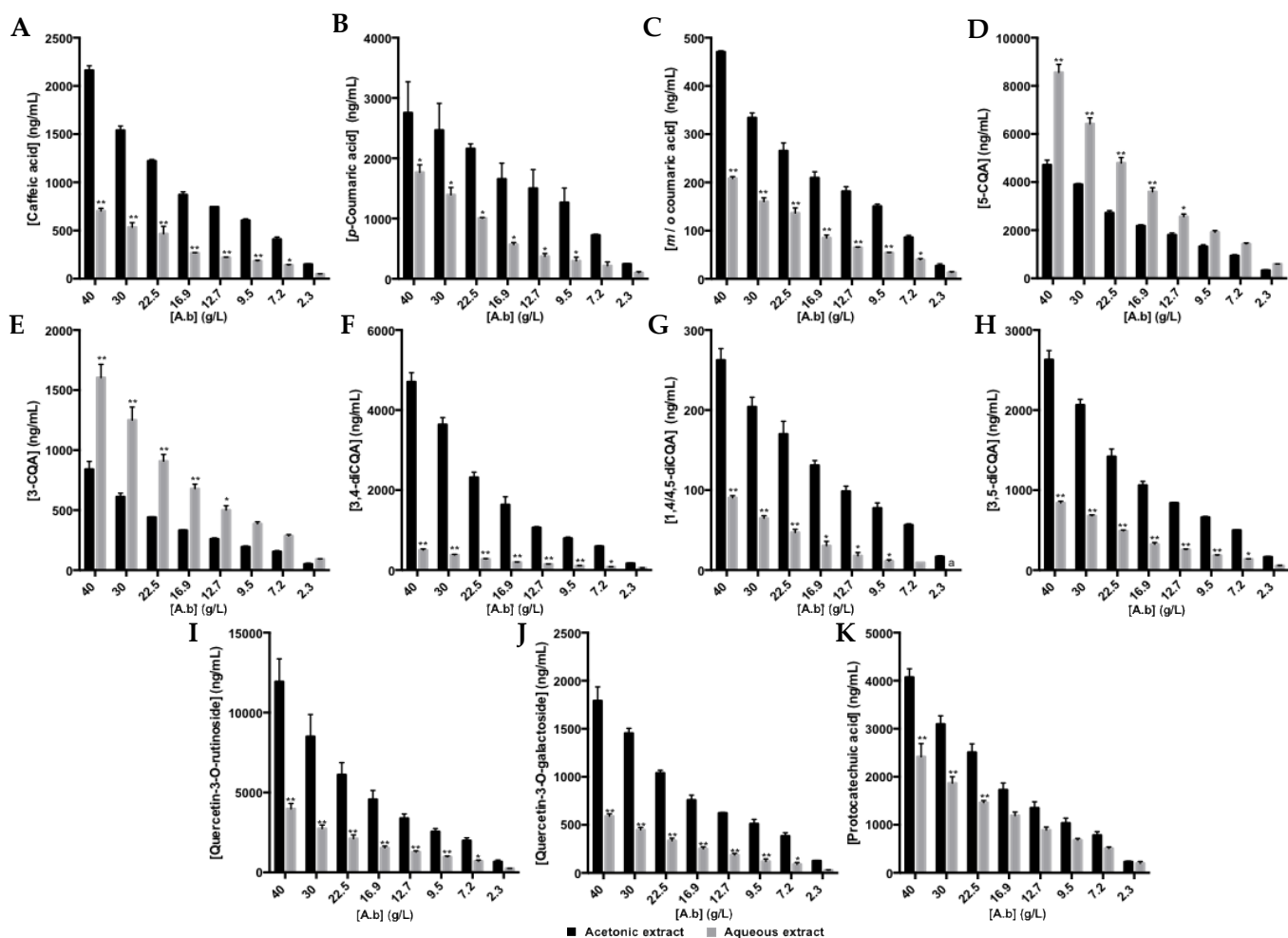
F: FTMS - p ESI d Full ms2 337.0930@hcd25.00 [50.0000-365.0000]





**Figure S2. The fragmentation pattern of each identified compounds obtained in negative mode.**

(A) Quinic a. (B) Protocatechuic a. (C) 3-Caffeoylquinic a. (D) 5-Caffeoylquinic a. (E) Quercetin-3-O-rutinoside (F) Quercetin-3-O-glucoside (G) Kaempferol-O-hexoside (H) 3,5-Dicafeoylquinic a. (I) 3,4-Dicafeoylquinic a. (J) 4-Caffeoylquinic a. (K) Caffeic a. (L) *p*-Coumaroylquinic a. (M) *p*-Coumaroylquinic a. (N) *o/m*-coumaric a. (O) Feruloylquinic a. (-OR<sub>2</sub>) (P) *p*-coumaric a. (Q) 1,4-Dicafeoylquinic a. (-OR<sub>1</sub>) / 4,5-Dicafeoylquinic.a (-OR<sub>2</sub>) .



**Figure S3. Quantification of polyphenols-rich acetic and aqueous extracts from *A. borbonica* by UHPLC-ESI-MS.**

The analysis were performed by using a Q-Exactive plus mass spectrometer at different concentrations ranging from 40 to 2.3 g/L (dried plant powder). (A) Caffeic a. (B) *p*-Coumaric a. (C) *o/m*-Coumaric a. (D) 5-Caffeoylquinic a. (E) 3-Caffeoylquinic a., (F) 3,4-Dicaffeoylquinic a., (G) 1,4/4,5-Dicaffeoylquinic a. (H) 3,5-Dicaffeoylquinic a. (I) Quercetin-3-O-rutinoside (J) Quercetin-3-O-glucoside (K) Protocatechuic a. The concentrations of compounds were expressed as ng/mL. Data are mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (*vs.* acetic extract). Item <sup>a</sup>: Under limit of quantification (<LOQ).

Table S1. Identification of 20 compounds in *Antirhea borbonica* herbal infusion by LC-HESI-UV-MS/MS in negative mode

Compound	Molecular formula	Mass error (ppm)	[M-H] <sup>-</sup>
D-(-)-Quinic acid	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0.4	191.0554
Gallic acid	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	0.2	169.0142
Protocatechuic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	0.13	153.0184
3-Caffeoylquinic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	1.03	353.0877
5-Caffeoylquinic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	1.03	353.0877
Caffeic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	0.2	179.0341
<i>p</i> -Coumaroyl quinic acid isomer	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	1.3	337.0931
<i>p</i> -Coumaroyl quinic acid isomer	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	1.3	337.0931
<i>o/m</i> -Coumaric acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0.2	163.0391
Feruloylquinic acid	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	0.5	367.1035
<i>p</i> -Coumaric acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0.1	163.0391
Quercetin-3-O-rutinoside (Rutin)	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	1.6	609.1466
Quercetin-3-O-galactoside (hyperoside)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	1.33	463.0884
Quercetin-3-O-glucoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	1.33	463.0884
Kaempferol-O-hexoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	1.35	447.0935
Kaempferol-O-hexoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	1.35	447.0935
3,5-Dicaffeoylquinic acid	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	1.04	515.1196
3,4-Dicaffeoylquinic acid	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	1.04	515.1195
4-Caffeoylquinic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	1.03	353.0877
1,4/4,5-Dicaffeoylquinic acid	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	1.04	515.1194

## Discussion & perspectives (Publication 1)

Cette étude a permis de montrer que les extraits aqueux et hydro-acétonique *d'Antirhea borbonica* possédaient tous les deux de fortes teneurs en acides phénoliques/ flavonoïdes. Ces dernières étaient plus élevées pour l'extrait hydro-acétonique que pour l'extrait aqueux et cela quelle que soit la méthode de quantification utilisée (polyphénols totaux *vs* spectrométrie de masse).

Les analyses de spectrométrie de masse ont permis l'identification de 19 polyphénols. Parmi les acides phénoliques majoritaires identifiés sont retrouvés des dérivés d'acide caféique comme les isomères d'acide caffeoylquinique (acide chlorogénique) et les isomères d'acide dicaffeoylquinique. Il est intéressant de noter que pour les flavonoïdes, la rutine (quercetine-3-O-rutinoside) est majoritaire. Nous avons pu identifier 7 nouveaux polyphénols qui n'ont jamais été reporté pour cette plante à savoir des isomères et des dérivés de l'acide coumarique (*i.e* *p*-coumaric acid, *p*-coumaroyl quinic acid), l'acide protocatéchuique et l'acide feruloylquinique. De plus, la présence de polyphénols dans les deux types d'extraits leur a conféré une capacité antioxydante comprise entre 85 et 91% par la méthode du DPPH.

Il est important de noter que dans cette étude nous avons utilisé des extraits enrichis en polyphénols et que d'autres composés phytochimiques comme des alcaloïdes, des terpènes et des caroténoïdes peuvent être présents. De plus, la méthode HPLC-MS/MS a été optimisée pour la séparation et la détection de composés de types acide phénolique/flavonoïdes. Nous pourrions à l'avenir développer des méthodes HPLC-MS/MS plus spécifiques pour les composés phytochimiques cités précédemment afin d'avoir une caractérisation plus précise des plantes médicinales de La Réunion.



Il s'agit de la première étude toxicologique visant à déterminer la  $DL_{50}$  d'extraits d'une plante médicinale, à la fois sur le développement embryonnaire (œufs de poisson zèbre) mais aussi sur un organisme vivant (larve de poisson zèbre). Grâce à ce modèle nous avons pu déterminer des  $DL_{50}$  plus élevées chez la larve que l'embryon. Il est rassurant de noter que ces concentrations toxiques sont très en dessus des concentrations utilisées en médecine traditionnelle. De plus, nos résultats montrent que même à des doses non létales il peut y avoir des effets sur le développement embryonnaire.

Cette étude toxicologique sur les différents stades de développement du poisson zèbre est une preuve de concept qui permettra d'évaluer la toxicité des autres plantes médicinales ou même d'évaluer la toxicité d'autres types de composés. Néanmoins, cette preuve de concept peut être amélioré en allant plus loin dans la caractérisation de cette toxicité. En effet, une analyse métabolomique par spectrométrie de masse peut permettre d'identifier le ou les composés responsables de cette toxicité. Par la suite, le ou les composés cibles potentiellement responsables peuvent être testés sur ce modèle de poisson zèbre. Il serait également intéressant de déterminer par spectrométrie de masse la présence et la quantité des divers polyphénols et métabolites dans les organes (cerveau, foie, cœur, rein).

Pour aller plus loin dans les effets de ces composés sur le rein notamment rechercher d'éventuels effets néphrotoxiques (sur le développement et post développement) nous pourrons utiliser le modèle de poisson zèbre transgénique (*wt1b:EGFP*) qui permet de visualiser les néphrons en vert. De même en utilisant le modèle d'insuffisance rénale aigüe induite par la gentamicine (Hentschel DM et al, 2005) il sera possible d'étudier le potentiel thérapeutique régénératif à la fois au niveau histologique et fonctionnel (mesure du débit de filtration glomérulaire) de doses non toxiques de polyphénols.



**Article 2 : L'acide caféique, un des acides phénoliques majoritaires de la plante médicinale *Antirhea borbonica*, réduit la fibrose tubulointerstitielle rénale.**

**Bryan Veeren**, Matthieu Bringart , Chloe Turpin, Philippe Rondeau , Cynthia Planesse , Imade Ait-Arsa , Fanny Gimié , Claude Marodon , Olivier Meilhac , Marie-Paule Gonthier , Nicolas Diotel , Jean-Loup Bascands

***Publié dans Biomedicines 2021, 9, 358***

Dans ce deuxième article, nous avons étudié le possible effet anti-fibrosant d'un extrait d'*Antirhea borbonica* enrichi en polyphénols par extraction acétonique en utilisant le modèle d'obstruction unilatérale urétérale (OUU) chez la souris. Ce modèle est très utilisé en recherche préclinique car il reproduit de manière accélérée (cinq jours) le développement de la fibrose tubulointerstitielle. Ce modèle consiste à ligaturer l'uretère gauche empêchant l'évacuation de l'urine. Cette accumulation d'urine dans le rein conduit à une dilatation des tubules et à une hydronéphrose qui génère en quelques jours une fibrose tubulointerstitielle sévère. Ce modèle permet donc d'établir des preuves de concept quant à l'efficacité de composés sur la progression de la fibrose tubulointerstitielle rénale. Nos expériences montrent un effet curatif de l'extrait enrichi en polyphénols. Cet effet curatif anti-fibrosant a été reproduit par l'acide caféique qui est le polyphénol majoritaire d'*Antirhea borbonica*. Pour la première fois nous avons pu montrer la distribution spatiale de cet acide caféique (administré par gavage oral) au niveau du rein en utilisant l'imagerie par spectrométrie de masse (système DESI).

# Caffeic Acid, One of the Major Phenolic Acids of the Medicinal Plant *Antirhea borbonica*, Reduces Renal Tubulointerstitial Fibrosis

Bryan Veeren <sup>1</sup>, Matthieu Bringart <sup>1</sup>, Chloe Turpin <sup>1</sup>, Philippe Rondeau <sup>1</sup>, Cynthia Planesse <sup>1</sup>, Imade Ait-Arsa <sup>2</sup>, Fanny Gimie <sup>2</sup>, Claude Marodon <sup>3</sup>, Olivier Meilhac <sup>1</sup>, Marie-Paule Gonthier <sup>1</sup>, Nicolas Diotel <sup>1</sup> and Jean-Loup Bascands <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188, Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DéTROI), Plateforme CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, Réunion, France; bryan.veeren@univ-reunion.fr (B.V.); matthieu.bringart@inserm.fr (M.B.); chloe.turpin@univ-reunion.fr (C.T.); philippe.rondeau@univ-reunion.fr (P.R.); cynthia.planesse@univ-reunion.fr (C.P.); marie-paule.gonthier@univ-reunion.fr (M.-P.G.); olivier.meilhac@inserm.fr (O.M.); nicolas.diotel@univ-reunion.fr (N.D.)

<sup>2</sup> Groupe d'Intérêt Public, Cyclotron Réunion Océan Indien, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, Réunion, France; i.aitarsa@cyroi.fr (I.A.-A.); f.gimie@cyroi.fr (F.G.)

<sup>3</sup> Aplamedon Réunion, CYROI-Parc Technor—2, rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, Réunion, France; claude.marodon@aplamedon.org

\* Correspondence: [jean-loup.bascands@inserm.fr](mailto:jean-loup.bascands@inserm.fr); Tel.: +262-262-938806

**Abstract:** The renal fibrotic process is characterized by a chronic inflammatory state and oxidative stress. *Antirhea borbonica* (*A. borbonica*) is a French medicinal plant found in Reunion Island and known for its antioxidant and anti-inflammatory activities mostly related to its high polyphenols content. We investigated whether oral administration of polyphenol-rich extract from *A. borbonica* could exert in vivo a curative anti-renal fibrosis effect. To this aim, three days after unilateral ureteral obstruction (UUO), mice were daily orally treated either with a non-toxic dose of polyphenol-rich extract from *A. borbonica* or with caffeic acid (CA) for 5 days. The polyphenol-rich extract from *A. borbonica*, as well as CA, the predominant phenolic acid of this medicinal plant, exerted a nephroprotective effect through the reduction in the three phases of the fibrotic process: (i) macrophage infiltration, (ii) myofibroblast appearance and (iii) extracellular matrix accumulation. These effects were associated with the mRNA down-regulation of *Tgf-β*, *Tnf-α*, *Mcp1* and *NfκB*, as well as the upregulation of *Nrf2*. Importantly, we observed an increased antioxidant enzyme activity for GPX and Cu/ZnSOD. Last but not least, desorption electrospray ionization-high resolution/mass spectrometry (DESI-HR/MS) imaging allowed us to visualize, for the first time, CA in the kidney tissue. The present study demonstrates that polyphenol-rich extract from *A. borbonica* significantly improves, in a curative way, renal tubulointerstitial fibrosis progression in the UUO mouse model.

**Keywords:** *Antirhea borbonica*; kidney fibrosis; polyphenols; caffeic acid; antioxidant enzymes; DESI-imaging

## 1. Introduction

A common deleterious consequence of most chronic kidney diseases (CKD) is the interstitial accumulation of extracellular matrix leading to tubulointerstitial fibrosis, which is closely correlated with the loss of renal function [1–4]. The process of renal fibrosis can be seen as an ongoing wound-healing process maintained by a chronic inflammatory reaction [5,6]. Halting renal fibrosis progression appears as a relevant therapeutic strategy to at least delay CKD progression. Although significant progress in the understanding of the molecular mechanisms occurring during fibrosis has been made

[6], specific antifibrotic drugs and/or treatments are still clearly lacking. To the best of our knowledge the only drugs used in clinic to slow down the progression of CKD are angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin type I receptor blockers [7–9]. Diabetic kidney disease remains the main cause of CKD, leading to end-stage kidney disease in both type 1 and type 2 diabetes [10]. Recently, sodium–glucose linked transporter-2 (SGLT2) inhibitors appeared to be the most promising nephroprotective drugs in diabetic kidney disease [11,12]; however, an antifibrotic effect has only been evidenced in animal studies [13]. There is thus a need and ample space to develop new therapeutic approaches targeting tubulointerstitial fibrosis in the kidney for combatting these pathological processes [14].

Chronic infiltration of immune cells in renal tissue, as well as chronic hypoxia and oxidative stress, are clearly involved in the initiation and progression of the chronic fibrosis process. At present, targeting chronic inflammation and oxidation seems to be a reasonable option to slow down renal fibrosis progression. Indeed, a number of experimental studies have demonstrated the efficiency of targeting inflammation and oxidative stress [14–17]. However, translation to the clinic is either missing or has been, most of the time, disappointing due to non-desirable side effects [14–17]. In addition, due to the chronicity of renal diseases one might wonder if a long-term specific anti-inflammatory treatment would promote susceptibility to infection. Taken together, it seems that targeting a single factor or pathway is not sufficient to efficiently prevent renal tubulointerstitial fibrosis. Therefore, it is understandable that a growing number of studies have investigated the health benefit of traditional medicine, also called natural/herbal medicine, including medicinal plants, which can be considered as a “multidrug” therapy. However, regarding the use of herbal medicine in the prevention and treatment of CKD, and more precisely tubulointerstitial fibrosis, very few studies have been carried out mainly due to the dramatic consequences associated with the ingestion of Chinese herbal medicine containing aristolochic acid [18,19]. It is thus very important to perform rigorous preclinical investigations to assess the presence of nephrotoxic molecules, as well as the beneficial and/or deleterious/toxic effects of these plants/molecules, particularly in the context of kidney disease.

In Reunion Island, since 2012, 27 medicinal plants have been registered at the French pharmacopeia [20] (<https://ansm.sante.fr/>, accessed on 30 March 2021). Most of them are known for their antioxidant and anti-inflammatory activities related mostly to their polyphenols content. However, although a number of studies (mostly in vitro studies) have reported various potential therapeutic effects such as antihypertensive [21], antioxidant, anti-inflammatory [22], antiviral [23], antiplasmodial and anti-Chikungunya effects [24], as well as an inhibitory effect on Dengue and Zika virus infection [25], the in vivo validation phase for further medical uses of these effects on preclinical models is missing.

*Antirhea borbonica* (*A. borbonica*) leaves are peculiarly interesting, as they are widely used in traditional medicine for treating, among others, diabetes, urinary tract infection, diarrhea, hemorrhage, rheumatism and also kidney stones [26,27]. Our laboratory has shown that *A. borbonica* exhibited strong antioxidant and anti-inflammatory effects, in vitro, on preadipocytes, cerebral endothelial cells and red blood cells [22,28,29]. Those antioxidant and anti-inflammatory biological effects were mainly associated with the capacity of polyphenols to down-regulate on one hand key molecular targets such as IL6, MCP-1 and NF- $\kappa$ B, and on the other hand increase superoxide dismutase (SOD) as well as the redox-sensitive translational factor Nrf2. In addition, the in vitro studies showed that predominant polyphenols such as quercetin, chlorogenic and caffeic acids were able to reduce free radicals through DPPH and AAPH radical-scavenging tests [22,28,29].

More recent data obtained in vivo also highlight a preventive protective effect of *A. borbonica* aqueous extract in a zebrafish diet-induced overweight model in displaying cerebral oxidative stress and blood–brain barrier leakage [30], as well as in a mouse stroke model [31]. Registration at the French pharmacopeia supposes that the medicinal plants are devoid of toxic effects in humans. Most of the time, this statement is based on ethnobotany investigations, mainly oral information/folk knowledge, claiming that the consumption of the plant is free from toxicities and side effects. However, regarding *A. borbonica*, to the best of our knowledge, no in vivo preclinical study investigating a putative nephroprotective effect has been reported. We have recently reported a detailed (qualitative and

quantitative) phenolic profile as well as the antioxidant activity of aqueous and organic extracts of *A. borbonica* and determined the LC<sub>50</sub> of both extracts on a zebrafish embryos model [32] according to the OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) guidelines, allowing us to safely investigate in vivo the effect of *A. borbonica* in a kidney disease context.

Because of the potential therapeutic interest of *A. borbonica* against renal tubulointerstitial fibrosis, but also because we have previously reported [32] that the main polyphenols of *A. borbonica* was caffeic acid (CA) and since it is now well admitted that the absorption of CA derivatives results in free CA as secondary metabolites [33], the aims of our study were (i) to look for the presence of nephrotoxic molecules, (ii) to evaluate the renal antifibrotic effect of *A. borbonica* as well as CA in the in vivo unilateral ureteral obstruction (UUO) mouse model and (iii) to investigate the presence of putative specific antifibrotic molecules from *A. borbonica* at the renal tissue level.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals and Reagents

Folin–Ciocalteu reagent, sodium carbonate, sodium nitrite, aluminum chloride, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and caffeic acid (CA) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Solvents such as acetone, acetonitrile and methanol were purchased from Carlo Erba (Peypin, France).

### 2.2. Plant Material

*Antirhea borbonica* J.F Gmelin (*A. borbonica*) powder prepared from the dried leaves was obtained from the APLAMEDOM institute (Association pour les Plantes Aromatiques et Médicinales de la Réunion) and registered under the following code: DÉTROI.002/2018, stating the date of collection and the GPS coordinates (21°05'44.9''S, 55°39'06.6''E), altitude: 770 m. The pharmacist and director of APLAMEDOM performed the botanical identification of *A. borbonica*. *A. borbonica* powder was stored at -20 °C until polyphenol extraction.

### 2.3. Nephrotoxic Compounds Identification and Quantification of Polyphenols by UPLC-UV-ESI-MS/MS

Polyphenolic extract from *A. borbonica* was prepared by dissolving 1 g of crushed leaves in 25 mL of an aqueous acetonitrile solution (70%, v/v). After incubation at 4 °C for 90 min, the mixture was centrifuged at 3500× g rpm at 4 °C for 20 min and polyphenol-rich supernatant was collected and stored at -80 °C until analysis. Identification of polyphenols was carried out by ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) coupled with diode array detection and a HESI-Orbitrap mass spectrometer (Q Exactive Plus, Thermo Fisher). A 10 µL sample volume was injected using an UHPLC system equipped with a Thermo Fisher Ultimate 3000 series WPS-3000 RS autosampler and then separated on a PFP column (2.6 µm, 100 mm × 2.1 mm, Phenomenex, Torrance, CA, United States). 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 0.450 mL/min, with 5% B at 0.00 to 0.1 min, 35% B at 0.1 to 7.1 min, 95% B at 7.2 to 7.9 min and 5% B at 8.0 to 10 min. The column temperature was held at 30 °C and the detection wavelengths were set to 280 and 310 nm.

For mass spectrometer conditions, a Heated Electrospray Ionization source II (HESI II) was used. Nitrogen was used as drying gas. The mass spectrometric conditions were optimized as follows: spray voltage = 2.8 kV, capillary temperature = 350 °C, sheath gas flow rate = 60 units, aux gas flow rate = 20 units and S lens RF level = 50. Mass spectra were registered in full scan mode from *m/z* 100 to 1500 in negative ion mode at a resolving power of 70,000 FWHM at *m/z* 400. The automatic gain control (AGC) was set at 1e6. The MS/MS spectra were obtained by applying a relatively higher energy collisional dissociation (HCD) energy of 25%.

Identification of the compounds of interest was based on their retention time, exact mass, elemental composition, MS fragmentation pattern and comparisons with available standards and the advanced mass spectral database, *m/z* Cloud (<https://www.mzcloud.org>). The search for nephrotoxic compounds was carried out based on their exact mass in the MS spectrum (Extract Ions Chromatograms (XICs)).

Data were acquired by XCalibur 4.2 software (Thermo Fisher Scientific Inc.) and processed with compound discoverer 2.1, and Skyline 20.1 software (MacCoss Lab.) was used to confront raw files with our “in house” database.

#### 2.4. Desorption Electrospray Ionization-High Resolution/Mass Spectrometry (DESI-HR/MS) Imaging

The 2D automated Omni Spray Kidney tissues were flash-frozen in nitrogen and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  before DESI-HR/MS imaging. For DESI-MS imaging and histology,  $12\text{ }\mu\text{m}$  thickness kidney sections were collected and mounted on SuperFrost™ Plus glass slides.

ion source from Prosolia Inc. (Indianapolis, USA) coupled to a Q-Exactive™ Plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) was used to perform the mass spectrometry imaging experiment. A solution of methanol with 0.1% formic acid (HPLC-MS grade, Carlo Erba) was used as the extraction and ionization spray solvent, delivered by a syringe pump at a flow rate of  $5\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ . All imaging experiments were carried out with the following experimental conditions including source parameters: 2.8 kV capillary voltage,  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$  capillary temperature, 60% S-lens RF level and 86 psi nitrogen nebulizing gas pressure, and including geometrical parameters:  $\sim 1\text{ mm}$  spray tip-to-surface distance and a spray incident angle of  $60^{\circ}$ . Mass spectra were registered in full scan mode with the mass spectrometer operating in negative mode. Survey full scan mass spectra were acquired in the 50 to 500  $m/z$  range at resolving power 70,000 (at  $m/z$  400) with an automatic gain control (AGC) target of  $3^6$  and maximum injection time of 200 ms. DESI-HR/MS imaging of tissues was performed in start point-constant velocity scan mode, with a scan rate of  $185.2\text{ }\mu\text{m}/\text{s}$  and a spatial resolution of  $100\text{ }\mu\text{m}$ .

Mass spectra were acquired using XCalibur 4.2 software (Thermo Fisher Scientific Inc.). The XCalibur mass spectral files (.raw) were converted to mZML then to imzML [34]. MSIQuant software [35] was used to generate the selected ion images.

Periodic acid-Schiff (PAS) staining was performed on the same tissue sections after DESI-MSI to visualize tissue structure.

#### 2.5. Animal Model: Unilateral Ureteral Obstruction (UUO)—Biodistribution and Pharmacokinetic Studies

All reported experiments were performed at the GIP-CYROI technological platform’s animal facility (A974001), conducted in accordance with NIH guidelines for the care and use of laboratory animals, and were approved by the French authorities (APAFIS#7347-2016100314466830v5, approved on 04 September 2017). C57BL/6J mice (male, 6 weeks old) were purchased from Janvier, (Le Genest Saint Isle, France) and housed in a pathogen-free, temperature-controlled environment with a 12–12 h light/dark photocycle. Animals had free access to food and tap water, to avoid dehydration-related hypovolemia. All mice were fed with a normal diet.

The unilateral ureteral ligation was performed as previously described [36]. Briefly, under oxygen–isoflurane anesthesia and through a longitudinal, left abdominal incision, the ureter was exposed and ligated with a 6/0 nylon thread at the uretero–pelvic junction. In sham operations, the ureter was exposed but not ligated and repositioned. To reduce pain Buprenorphine (0.01 mg/kg) (Buprecare centravet, Maison-Alfort, France) was injected i.p before surgery and 12 h later. Except for the preventive experiment where *A. borbonica* polyphenol-rich extract was administered by gavage 1 day before UUO and then every day for 5 days, the treatment with *A. borbonica* polyphenol extract (25 mg/kg) or CA (25 mg/kg) was initiated 3 days after UUO and continued for 5 days. *A. borbonica* polyphenol extract (25 mg/kg) or CA (25 mg/kg) were resuspended in distilled water just before gavage. The control group received only the vehicle (distilled water). At the end of the different protocols, mice were sacrificed and the kidneys were removed, and a transverse section was fixed in Carnoy’s solution for 24 h and subsequently embedded in paraffin for immuno-histological analysis. Several pieces of renal cortex were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for mRNA, enzyme activities and MS/MS analysis.



For biodistribution study, one day before sacrifice animals were placed in metabolic cages to collect urine overnight. CA and its metabolites were measured by UPLC-MS/MS in liver and kidney tissues and urine.

For pharmacokinetics study, the animals were submitted to UUO and 3 days later they were fasted overnight and then treated with a single dose of CA (25 mg/kg) or vehicle ( $n = 3/\text{group}$ ). Blood samples (90  $\mu\text{L}$ ) were collected at time 0 (before treatment), 30 min, 60 min, 180 min and 360 min post-treatment. CA concentrations were measured by UPLC-HESI-Q-orbitrap (Q Exactive Plus).

#### 2.6. Determination of Phenolic and Flavonoid Contents—Measurement of the Total Antioxidant Capacity of Polyphenol-Rich Plant Extract Administered Orally

The total phenolic acid content in *A. borbonica* extract was determined by using the Folin–Ciocalteu assay [37] and expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per 100 g dry plant powder. The total flavonoid content was determined by using the aluminum chloride ( $\text{AlCl}_3$ ) colorimetric assay [38] and expressed as mg quercetin equivalent (QE) per 100 g dry plant powder.

The total antioxidant capacity of *A. borbonica* extract was assessed through the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay using vitamin C positive control. The absorbance (Abs) was read at 517 nm (FLUOstar Optima, Bmg Labtech). The percentage of free radical-quenching activity of DPPH was calculated from the following formula:

$$\text{Antioxidant capacity (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{vehicle}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{vehicle}}] \times 100$$

#### 2.7. Immunohistochemistry and Histological Analysis

Kidneys were fixed in Carnoy's solution, dehydrated and embedded in paraffin. From kidney sections, routine histology and immunohistological staining and analysis were performed as previously described [39]. Three to four  $\mu\text{m}$  thickness sections were cut and used for routine staining (hematoxylin–eosin and Sirius red staining) and immunohistochemistry. The extent of Sirius red staining on the kidney section was scored from 0 to 4+ as follows: 0: no staining; 0.5: <10%; 1: 10–25%; 2: 25–50%; 3: 50–75%; and 4: >75%. For immunohistochemistry, mouse renal tissue was first de-waxed in toluene and rehydrated through a series of graded ethanol washes before incubation with 3% hydrogen peroxide for 10 min at room temperature to block endogenous peroxidase activity. Specific primary antibodies were incubated (1 h at room temperature) on mouse kidney sections for the detection of macrophages with anti-mouse F4/80 (RM2900; Caltag laboratories Inc., Burlingame, California, USA; dilution 1/250); rabbit anti-alpha smooth muscle actin antibodies (ab5694-abcam; dilution 1/250). The sections were subsequently stained with the Dako Envision system (K4000 (primary antibodies from mouse) and K4002 (primary antibodies from rabbit)) according to manufacturer's instruction. Sections were finally counterstained with hematoxylin. Negative controls for the immunohistochemical procedures included substitution of the primary antibody with nonimmune sera at a similar immunoglobulin concentration. Sections were scanned using a NanoZoomer S60 (Hamamatsu) and image analysis was realized in a blind fashion using Image J software (<https://imagej.nih.gov/ij/>, accessed on 30 March 2021).

#### 2.8. RT-qPCR

Total RNA was isolated from mouse kidneys with TRIzol™ reagent (Invitrogen). One microgram of total RNA was reverse transcribed with random hexamer primers and Superscript II reverse transcriptase (Applied Biosystems). The quantitative real-time polymerase chain reaction was performed in a 96 well plate using SYBR green™ master mix (Eurogentec). Analysis of GAPDH was performed to normalize gene expression and the relative mRNA fold changes between groups were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method. Primer sequences are listed in Table 1.

**Table 1.** Primers used for reverse transcribed-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Transforming growth factor-beta (*Tgf- $\beta$* ); tumor necrosis factor alpha (*Tnf- $\alpha$* ); nuclear factor kappa B (*Nf- $\kappa$ B*); murine macrophage (*F4/80*); nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*Nrf2*); monocyte chemotactic



protein (*Mcp1*); fibronectin (*Fn*); collagen type I and III (*Col I*, *Col III*) ; alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -*Sma*); catalase (*Cat*); glutathione peroxidase (*Gpx*); manganese-dependent superoxide dismutase (*MnSOD*); copper/zinc superoxide dismutase (*Cu/ZnSOD*).

Mouse gene	Sequence	
<i>Tgf-<math>\beta</math></i>	Forward	CCTGAGTGGCTGTCTTTTGA
	Reverse	CGTGGAGTTTGTATCTTTGCTG
<i>Tnf-<math>\alpha</math></i>	Forward	TCCCAGGTTCTTCAAGGGA
	Reverse	ACAAGGTACAACCCATCGGC
<i>Nf-<math>\kappa</math>B</i>	Forward	GTGATGGGCCTTCACACACA
	Reverse	CATTTGAACACTGCTTTGACT
<i>F4/80</i>	Forward	ACCACAATACCTACATGCACC
	Reverse	AAGCAGGCGAGGAAAAGATAG
<i>Nrf2</i>	Forward	TCCCATTTGTAGATGACCATGAG
	Reverse	CCATGTCCTGCTCTATGCTG
<i>Mcp1</i>	Forward	GCAGTTAACGCCCACTCA
	Reverse	CCAGCCTACTCATTGGGATCA
<i>Fn</i>	Forward	CTTTGGCAGTGGTCATTTTCAG
	Reverse	ATTCTCCCTTTCCATTCCCG
<i>Col I</i>	Forward	CATAAAGGGTCATCGTGGCT
	Reverse	TTGAGTCCGTCTTTGCCAG
<i>Col III</i>	Forward	GAAGTCTCTGAAGCTGATGGG
	Reverse	TTGCCTTGCGTGTTTGATATTC
$\alpha$ - <i>Sma</i>	Forward	GTGAAGAGGAAGACAGCACAG
	Reverse	GCCCATTCCAACCATTACTCC
<i>Gapdh</i>	Forward	CTTTGTCAAGCTCATTTCTGG
	Reverse	TCTTGCTCAGTGCCTTGC
<i>Cat</i>	Forward	CCTCCTCGTTCAGGATGTGGTT
	Reverse	CGAGGGTCACGAAGTGTGTCAG
<i>Gpx</i>	Forward	TGCTCATTGAGAATGTGCGGTCTC
	Reverse	AGGCATTCCGCAGGAAGGTAAGA
<i>MnSod</i>	Forward	ATGTTGTGTCGGGCGGCG
	Reverse	AGGTAGTAAGCGTGTCTCCACACG
<i>Cu/ZnSod</i>	Forward	GCAGGGAACCATCCACTT
	Reverse	TACAACCTCTGGACCCGT

## 2.9. Protein Isolation from Kidney Tissue, Antioxidant Activities (Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, GPX, CAT) and Protein Carbonylation

For enzymatic activities determination, protein isolation from kidney tissue was performed as follow: between 10 to 30 mg of kidney tissues previously collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  were homogenized with a TissueLyser II (Qiagen) in 150  $\mu\text{l}$  of Tris buffer (Tris (25 mM), EDTA (1 mM), pH 7.4). After centrifugation (5000 $\times$  g/min, for 10 min), the supernatant was used for protein quantification and enzymatic assays. The total protein level of lysate was quantified by the bicinchoninic acid assay (BCA).

SOD activity was assayed by monitoring the rate of acetylated cytochrome c reduction by superoxide radicals generated by the xanthine/xanthine oxidase system. Measurements were performed in a reagent buffer (xanthine oxidase, xanthine (0.5 mM), cytochrome c (0.2 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50 mM), EDTA (2 mM), pH 7.8) at  $25^{\circ}\text{C}$ . The specific MnSOD activities were determined in the same conditions after incubation of samples with NaCN (1 mM) which inhibits Cu/ZnSOD activities. Assays were monitored by spectrophotometry at 560 nm. SOD activities were calculated using a calibration standard curve of SOD (up to 6 unit/mg). Total SOD, MnSOD and resulting Cu/ZnSOD activities were expressed as international catalytic units per mg of proteins.

The total activity of glutathione peroxidase (GPX) was determined with cumene hydroperoxide as substrate. The rate of glutathione oxidized by cumene hydroperoxide (6.5 mM) was evaluated by the decrease in NADPH (0.12 mM in Tris buffer) at 340 nm in the presence of NaCN (10 mM), reduced glutathione (0.25 mM) and glutathione reductase (1 U/mL) in Tris buffer (50 mM, pH 8). GPX activity was expressed as international units per gram of proteins.

The catalase (CAT) activity assay was carried out on 40  $\mu\text{g}$  of protein lysate in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5). Blanks were measured at 240 nm just before adding 80  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM final) to start the reaction. Catalase activity was determined by measuring the absorbance at 240 nm and was calculated using a calibration standard curve of an increasing amount of catalase between 12.5 and 125 unit/mL. Catalase activity was expressed as international catalytic units per mg of proteins.

The protein carbonylation was determined as described previously [40] by the carbonyl ELISA assay based on the recognition of protein-bound DNPH in carbonylated proteins with an anti-DNP antibody.

## 2.10. Statistics

Individual data are presented as dot plots next to the average for the group. Comparison between two groups of values was achieved by using a two-tailed unpaired Welch's t-test. For statistical comparisons involving more than two experimental groups, analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test was used. Statistical analyses and the determination of the area under the curve (AUC<sub>(0-360)</sub>) were performed with Graph-Pad Prism 6.3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Data are mean  $\pm$  SD. A  $p$ -value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

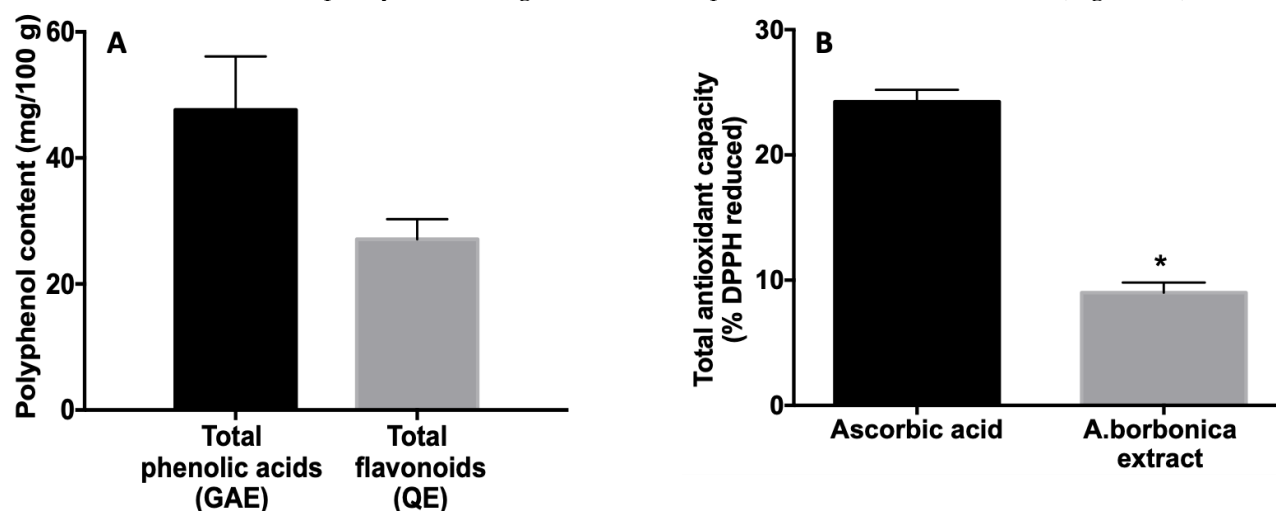
## 3. Results

### 3.1. Detection and Identification of Nephrotoxic Components

In the present study, based on their exact mass in MS spectrum, we focused on the detection and identification of known nephrotoxic molecules (Table S1) in the polyphenol-rich plant extract from *A. borbonica*. None of these molecules were found in the *A. borbonica* extract. This reassuring result prompts us to investigate, *in vivo*, the putative nephroprotective effect of a non-toxic concentration of polyphenol-rich extract from *A. borbonica*.

### 3.2. Phenolic/Flavonoid Contents and Total Antioxidant Activity of Orally Administered Polyphenol-Rich Extract from *A. borbonica*.

Based on our previous study [32], the dose of 25 mg/kg was chosen for mice gavage and corresponded to the lowest dose (1.4 g/L) tested on the zebrafish (embryos/larvae) model, showing no toxicological effect. As shown in Figure 1A, the quantity of polyphenol administered by gavage is not negligible since we found total contents of phenolic acids and flavonoids of  $47.6 \pm 8.5$  mg GAE/100 g dried powder and of  $27.1 \pm 3.2$  mg QE/100 g dried powder, respectively. In addition, *A. borbonica* extract exhibited an antioxidant capacity accounting for 37% of the positive control ascorbic acid (Figure 1 B).



**Figure 1.** Total phenolic acid and flavonoid contents (A) and antioxidant capacity (B), from *A. borbonica* extract administered by gavage. (A) Total phenolic contents were determined by using the Folin-Ciocalteu colorimetric assay and total flavonoid contents were determined by using the aluminum chloride colorimetric assay. The results are expressed as mg gallic acid equivalent (GAE)/100 g and as mg quercetin equivalent (QE)/100 g plant dried powder. (B) Total antioxidant capacity was measured by DPPH assay. Positive control ascorbic acid was used at the same phenolic acid concentration (47 mg GAE) as that provided by the *A. borbonica* extract. The results are expressed as % of reduced DPPH. Data are means  $\pm$  SD of three independent experiments. \*  $p < 0.05$  vs. ascorbic acid.

### 3.3. Preventive Experiment: Effects of Polyphenol-Rich Extract from *A. borbonica* on Body and Kidney Weight and Diuresis in a UUO Model.

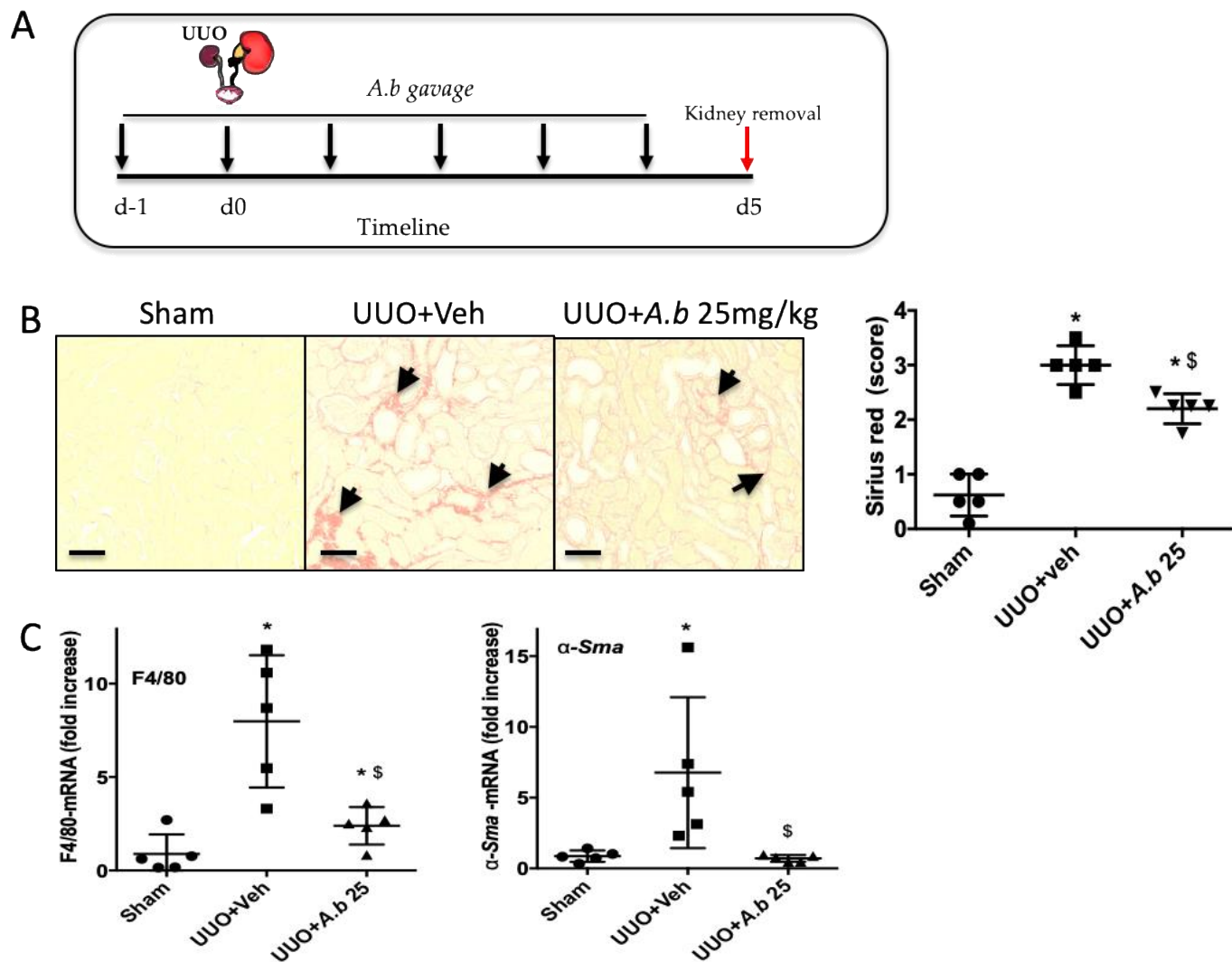
In order to ascertain that the 5 days of treatment with *A. borbonica* (25 mg/kg) did not result in unexpected adverse effects, we investigated the body weight before and after the treatments, and the diuresis and the left kidney weight at the end of the experiments. As shown in Table 2, neither the UUO treatment nor the UUO + *A. borbonica* treatment led to a significant change in animal body weight, kidney weight and diuresis.

**Table 2.** Effect of *A. borbonica* (*A. b*) extract on body weight, left kidney weight and diuresis. Values are means  $\pm$  SD;  $n = 7$  animals/group.

Group	n	Body Weight (g)	Left Kidney Weight (g)	Diuresis /24h (mL)
Sham	7	$22.02 \pm 2.64$	$0.134 \pm 0.01$	$1.06 \pm 0.44$
UUO + veh	7	$21.58 \pm 1.54$	$0.136 \pm 0.01$	$1.26 \pm 0.6$
UUO + <i>Ab</i> 25mg/kg	7	$20.49 \pm 1.20$	$0.122 \pm 0.008$	$1.06 \pm 0.6$

### 3.4. Preventive Effect of Polyphenol-Rich Extract from *A. borbonica* in UUO-Induced Tubulointerstitial Fibrosis

To determine the possible nephroprotective effect of polyphenol-rich extract from *A. borbonica*, we administrated it by gavage one day before the UUO and allowed the mice to survive for 5 days with a daily *A. borbonica* gavage. The sham group received the vehicle (distilled water). At the end of the experimental procedure (day 5), we assessed interstitial collagen deposition by the analysis of Sirius red-stained renal sections (Figure 2A). In this “proof of concept” study, identification of a nephroprotective effect leads us to pursue the investigation, otherwise we do not go any further.



**Figure 2.** Preventive effect of *A. borbonica* (*A. b*) 25 mg/kg on renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction (UUO) in mice. (A) Experiment design: black arrows indicate daily gavage with 25 mg/kg *A. b*. (B) Renal tubulointerstitial fibrosis highlighted with the Sirius red staining, arrows indicate interstitial fibrosis. (C) qPCR analyses of mRNA—macrophage infiltration (F4/80) and myofibroblasts ( $\alpha$ -Sma);  $n = 5$  per group. \*  $p < 0.05$  compared to Sham; \$  $p < 0.05$  compared to UUO + Veh. Scale bar = 100  $\mu$ m.

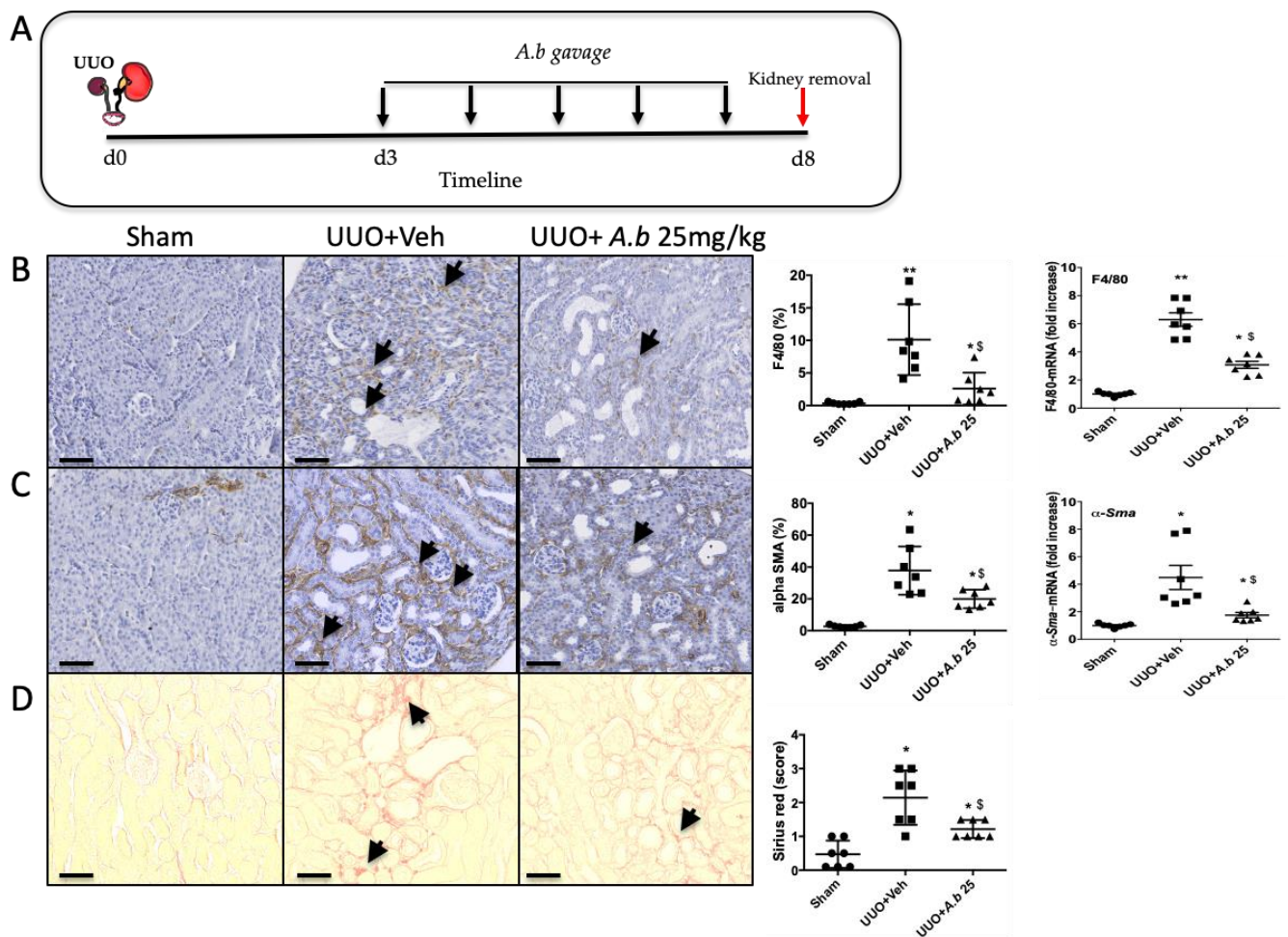
Pretreatment with polyphenol-rich extract from *A. borbonica* (25 mg/kg) for 5 days significantly decreased tubulointerstitial collagen accumulation as shown by the Sirius red staining (Figure 2B). Because interstitial collagen accumulation is strongly associated with an increase in macrophage infiltration (F4/80) in the kidney and the appearance of myofibroblasts ( $\alpha$ -SMA), we examined the mRNA expression of these two markers. Whereas UUO increased the gene expression of F4/80 and  $\alpha$ -

SMA, both markers were significantly decreased in the group treated with polyphenol-rich extract from *A. borbonica* (Figure 2C).

This very first experiment performed on a reduced number of animals and the rapid evaluation of the three phases of the fibrotic process (inflammation, myofibroblasts appearance and interstitial collagens accumulation) allowed us to make the decision to continue the evaluation of the polyphenol-rich extract from *A. borbonica*.

### 3.5. Curative Effect of Polyphenol-Rich Extract from *A. borbonica* in UUO-Induced Tubulointerstitial Fibrosis.

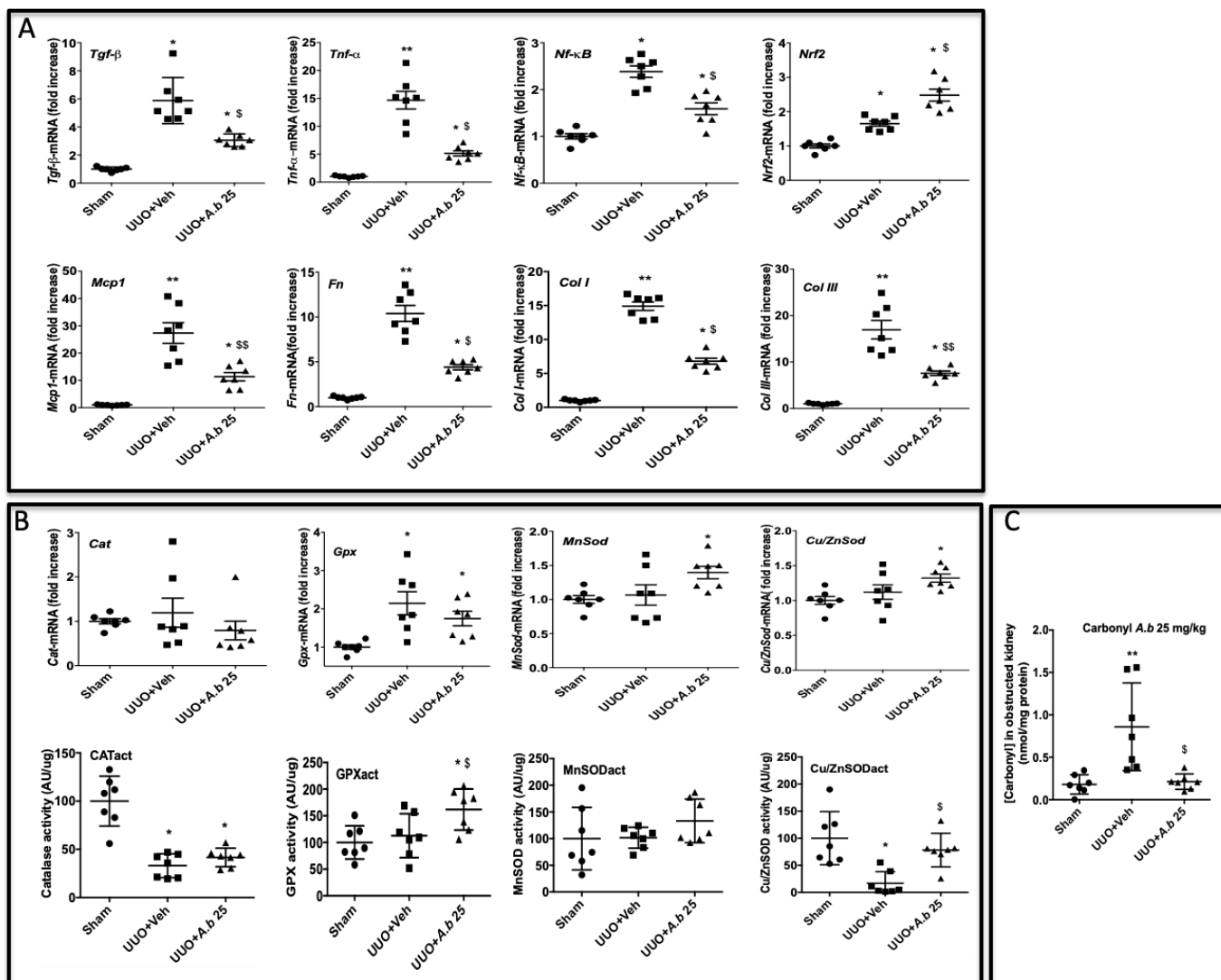
To truly evaluate the nephroprotective effect of polyphenol-rich extract from *A. borbonica*, we administrated the solution, by gavage, 3 days after surgery for 5 days (Figure 3A). *A. borbonica* extract significantly reduced macrophage infiltration and myofibroblast appearance, assessed by F4/80 (Figure 3B) and  $\alpha$ -SMA (Figure 3C) immunostaining, respectively, and confirmed by qPCR analysis. Moreover, *A. borbonica* extract decreased extracellular matrix accumulation assessed by Sirius red staining (Figure 3D).



**Figure 3.** Curative effect of *A. borbonica* (*A. b*) 25 mg/kg on renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction (UUO) in mice. (A) Experiment design: the black arrows indicate daily gavage with *A. b*. (B) Macrophage infiltration revealed by F4/80 immunostaining, arrows indicate macrophages. (C) Accumulation of myofibroblasts revealed by alpha SMA staining, arrows indicate myofibroblasts. (D) Renal tubulointerstitial fibrosis shown by Sirius red staining, arrows indicate interstitial fibrosis. Sham-operated group (Sham), unilateral ureteral obstruction group receiving vehicle (UUO + Veh) and unilateral ureteral obstruction group receiving polyphenol-rich extract from *A. b* (UUO + *A. b* 25 mg/kg). For each staining, quantitative results are shown on the right part of the figure (scatter dot plot), as well as renal mRNA expression of *F4/80* and *alpha-Sma*;  $n = 7$  per group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , compared to Sham; \$  $p < 0.05$  compared to UUO + Veh. Scale bar = 100  $\mu$ m.



To better understand the molecular mechanisms by which *A. borbonica* could reduce renal fibrosis, we analyzed the expression of genes encoding key proteins known to be involved in UUO. Shown in Figure 4A is the UUO-induced overexpression of the mRNA of profibrotic cytokines (*TGF-β*, *TNF-α*) and *NF-κB*, a nuclear factor known to control cytokines production. We also observed the overexpression of *Nrf2*, a redox-sensitive nuclear transcription factor involved in the regulation of antioxidant enzyme genes expression. The mRNA *Mcp-1* encoding for the chemokine MCP-1 (also known as CCL2) which is involved in monocyte/macrophage recruitment was overexpressed by UUO. As expected, UUO induced the expression of fibronectin, type I and III interstitial collagens' mRNA. Oral administration of *A. borbonica* extract blunted significantly the UUO-induced expression of most of these genes. Interestingly, *A. borbonica* extract induced a significant increase in the mRNA expression of *Nrf2*, suggesting the stimulation of the antioxidant defense system.



**Figure 4.** *A. borbonica* (*A. b*) extract restores normal inflammatory and oxidative stress states induced by unilateral ureteral obstruction (UUO). (A) Expression of genes involved in inflammatory and fibrotic responses in obstructed kidney, (B) antioxidant enzyme expression and activity (act) and (C) protein carbonyl concentration in obstructed kidney.  $n = 7$  per group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , compared to Sham;  $^{\$}$   $p < 0.05$ ,  $^{\$\$}$   $p < 0.01$  compared to UUO + Veh.

These results prompt us to investigate the gene expression and enzyme activities of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and Mn- and Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD). As shown in Figure 4B, gene expression did not change for *Cat*. *Gpx* was increased by UUO whereas Mn- and Cu/Zn-SOD

expression was not modified when compared to the sham group. *A. borbonica* extract treatment significantly increased *Mn*- and *Cu/Zn-SOD* mRNA expression compared to the sham group, but this increase was not significant when compared to the UUO untreated group. Interestingly, we found that, when compared to the UUO group, *A. borbonica* extract treatment was associated with a significant increase in both GPX and *Cu/Zn-SOD* enzyme activities. More precisely, UUO did not change the GPX enzyme activity but significantly decreased *Cu/Zn-SOD* activity, and *A. borbonica* extract administration significantly increased GPX and brought back to control values *Cu/Zn-SOD* activities.

Protein carbonylation is considered as a major hallmark of oxidative damage. The disturbance of redox homeostasis in the UUO model could explain the significant increase in protein carbonyl level in obstructed kidneys, as shown in Figure 4C. Interestingly, this increase was totally suppressed by *A. borbonica* extract treatment (Figure 4C).

### 3.6. Biodistribution of Caffeic Acid and Its Metabolite 24 Hours After Administration of *A. borbonica* Polyphenol-Rich Extract (25 mg/kg) in Mice Kidney, Liver and Urine

In the next step, we aimed at evaluating the biodistribution of the main polyphenols of *A. borbonica* and caffeic acid derivatives by using mass spectrometry, in order to identify metabolites that may explain the previously observed biological effects. As shown in Table 3, the caffeic acid (CA) was detected as a secondary metabolite in the UUO animals treated with *A. borbonica* polyphenol extract, and was significantly higher in obstructed kidneys when compared to sham and vehicle groups ( $0.144 \pm 0.013$  vs.  $0.006 \pm 0.006$   $\mu\text{M}$ , respectively, \*\*\*  $p < 0.001$ ). Similarly, significantly elevated concentrations of the methylated form of CA, namely ferulic acid (FA), were detected in the *A. borbonica*-treated UUO mice group ( $1.119 \pm 0.132$  vs.  $0.076 \pm 0.060/0.064 \pm 0.011$   $\mu\text{M}$ , respectively, \*\*\*  $p < 0.001$ ). No metabolite difference was noticed between each group for liver samples. Nonetheless, the highest concentrations of CA and FA were found in urine ( $96.599 \pm 19.704$  vs.  $38.002 \pm 5.021$   $\mu\text{M}$ , respectively), indicating excretion, at least in part, by the kidneys. As expected, *A. borbonica* polyphenols were detected in the liver. Caffeic acid and its secondary metabolite FA reach the systemic circulation to be delivered to organs. These findings prompt us to investigate the effect of the CA molecule in this kidney fibrosis model.

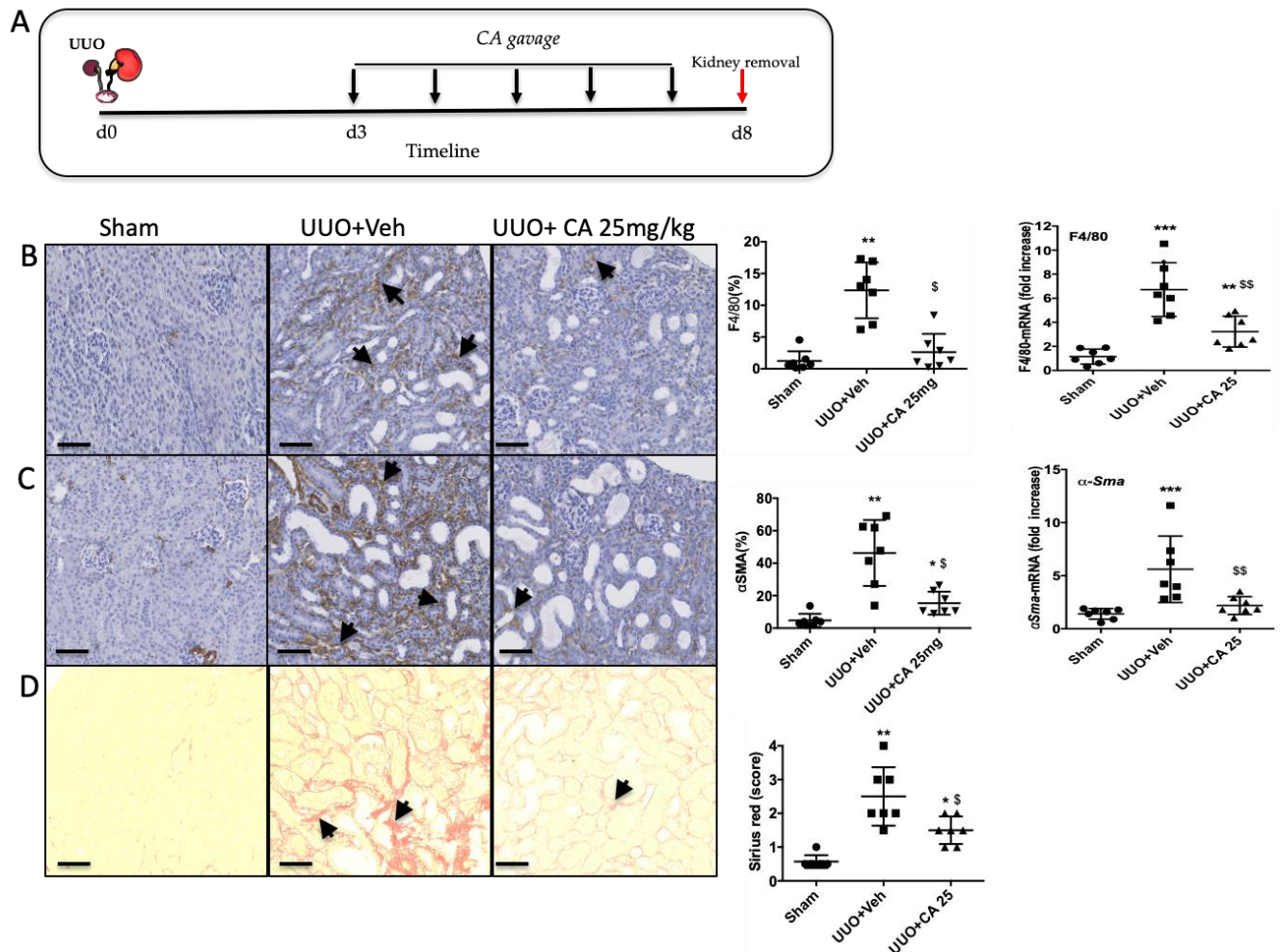
**Table 3.** Distribution of caffeic acid (CA) and its methylated metabolite, ferulic acid (FA), in obstructed kidney, liver and urine after ingestion of 25 mg/kg of *A. borbonica* (*A. b*). The concentrations were measured by UPLC-HESI-Q-Orbitrap (Q-Exactive™ Plus) and expressed in ( $\mu\text{M}$ ). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , compared to UUO + Vehicle. Values are means  $\pm$  SD;  $n = 7$  animals/group.

Concentration (mM)	Sham	UUO + Vehicle	UUO + A.b 25mg/kg
<b>Kidney obstructed</b>			
Caffeic acid	$0.006 \pm 0.005$	$0.006 \pm 0.006$	$0.144 \pm 0.013$ ***
Ferulic acid	$0.076 \pm 0.060$	$0.064 \pm 0.011$	$1.119 \pm 0.132$ ***
<b>Liver</b>			
Caffeic acid	$0.026 \pm 0.006$	$0.031 \pm 0.003$	$0.037 \pm 0.001$
Ferulic acid	$0.391 \pm 0.074$	$0.388 \pm 0.104$	$0.426 \pm 0.099$
<b>Urine</b>			
Caffeic acid	$24.912 \pm 6.401$	$21.161 \pm 6.856$	$96.599 \pm 19.704$ ***
Ferulic acid	$10.376 \pm 3.505$	$12.551 \pm 3.307$	$38.002 \pm 5.021$ **

### 3.7. Caffeic Acid (CA) Administration Mimics *A. borbonica* Extract's Nephroprotective Effects

The presence of CA in mice obstructed kidney (Table 3) and the fact that CA and derivatives were the most abundant polyphenolic compounds of *A. borbonica* [32] suggests that CA could mimic *A. borbonica* extract's nephroprotective effects.

We thus investigated if we could reproduce the observed nephroprotective effects of *A. borbonica* by daily oral administration of CA from day 3 after UUU for 5 days (Figure 5A).



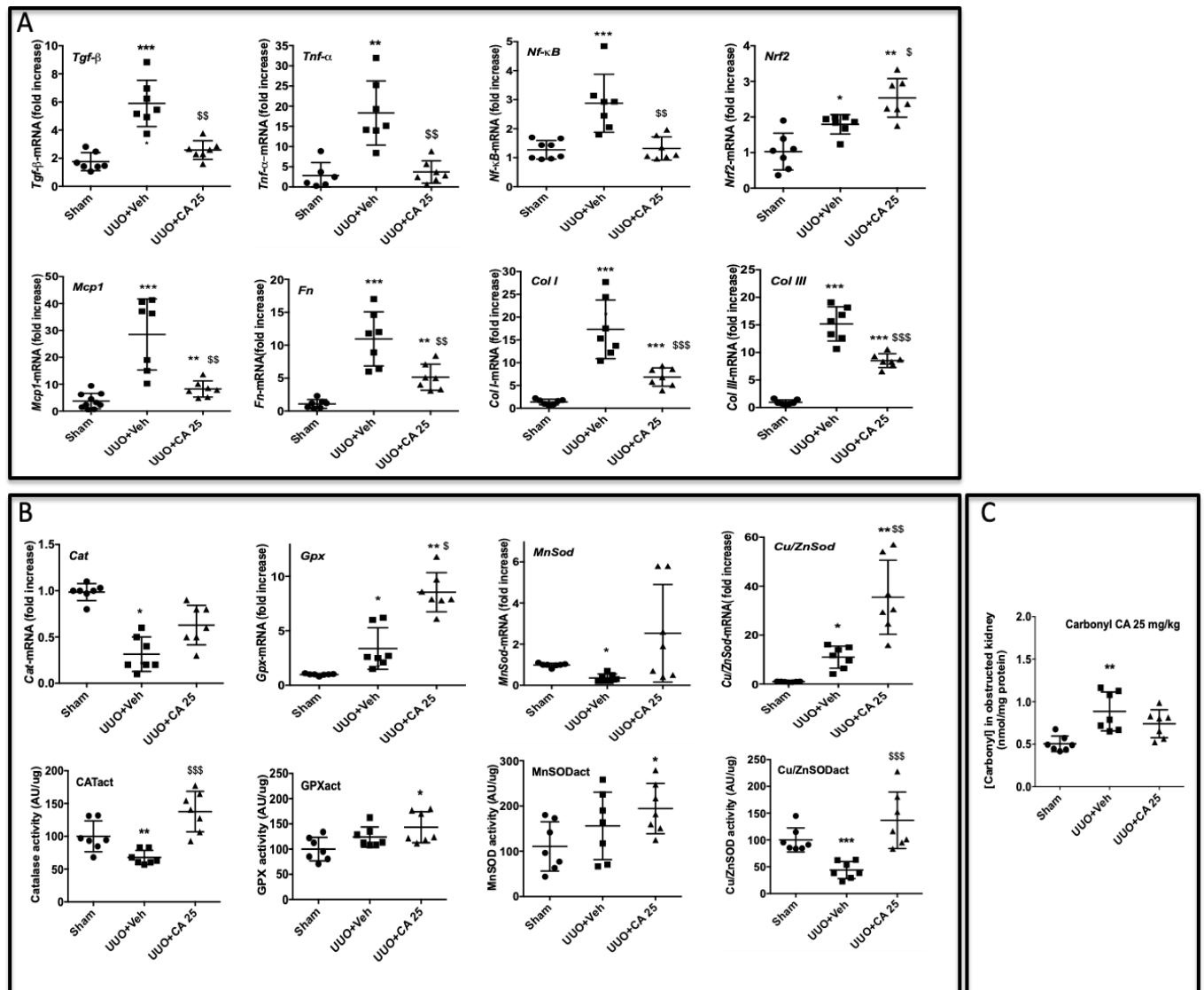
**Figure 5.** Curative effect of caffeic acid (CA) 25 mg/kg on renal tubulointerstitial fibrosis induced by UUU in mice. (A) Experiment design, black arrows indicate daily gavage with CA. (B) Macrophage infiltration F4/80, arrows indicate macrophages. (C) Accumulation of myofibroblasts alpha SMA, arrows indicate myofibroblasts. (D) Tubulointerstitial fibrosis (Sirius red), arrows indicate interstitial fibrosis. Sham operated group (Sham), unilateral ureteral obstruction group receiving vehicle (UUO + Veh) and unilateral ureteral obstruction group receiving caffeic acid (UUO + CA 25 mg/kg). For each staining quantitative results are shown on the right part of the figure (scatter dot plot), as well as renal mRNA expression of F4/80 and  $\alpha$ -Sma;  $n = 7$  per group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , compared to Sham; §  $p < 0.05$ , §§  $p < 0.01$  compared to UUO + Veh. Scale bar = 100  $\mu$ m.

Immunohistological analysis showed a significant protective effect of CA on macrophage infiltration (Figure 5B), accumulation of myofibroblasts (Figure 5C) and renal tubulointerstitial fibrosis (Figure 5D). The overexpression of the mRNA levels of genes involved in the inflammatory and fibrotic responses in obstructed kidneys was downregulated by CA, except for the transcription factor *Nrf2* (Figure 6A), as previously described above for *A. borbonica*. We also observed that CA significantly increased CAT and Cu/ZnSOD enzyme activities (Figure 6B). However, the stimulation of the activity



of these antioxidant enzymes by CA resulted in a slight decrease in carbonyl level which did not reach statistical significance (Figure 6C).

Taken together these data strongly suggest that the phenolic compound CA found in *A. borbonica* could actively participate in the observed nephroprotective effects in the UUO model.



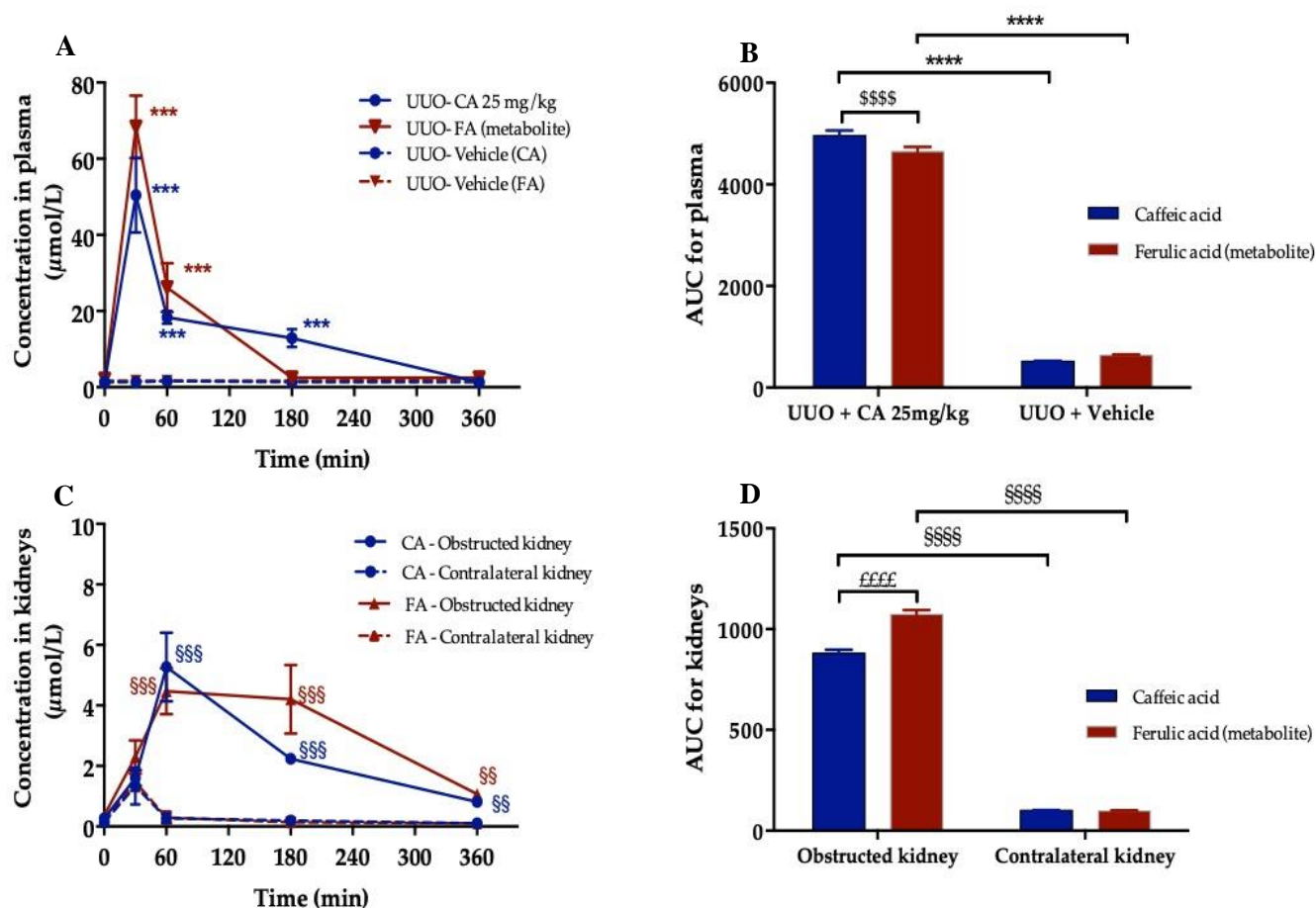
**Figure 6.** Caffeic acid (CA) 25 mg/kg restores normal inflammatory and oxidative stress parameters induced by UUO in mice. (A) Expression of genes involved in inflammatory and fibrotic responses in obstructed kidney, (B) antioxidant enzymes gene expression and activities and (C) the protein carbonyl concentration in obstructed kidney.  $n = 7$  per group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , compared to Sham; \$  $p < 0.05$ , \$\$  $p < 0.01$ , \$\$\$  $p < 0.001$  compared to UUO + Veh.

### 3.8. Plasma and Kidney Pharmacokinetic of Caffeic Acid

To evidence that CA participates in the nephroprotective effects of *A. borbonica* extract, we decided to undertake plasma and kidney pharmacokinetics of CA in order to optimize the visualization protocol of the CA presence in the obstructed kidneys by using DESI-HR/MS imaging. To this end, three days after UUO, mice were administrated by oral route a unique dose of CA (25 mg/kg) and then were sacrificed at 30, 60, 180 and 360 min. Caffeic acid (CA) and ferulic acid (FA) concentrations in both the plasma and kidney were assessed by using UPLC-HESI-Q-orbitrap (Q-Exactive™ Plus).

As shown in Figure 7A and Table 4, CA exhibited a significant peak plasma concentration of  $50.5 \pm 9.8 \mu\text{M}$  ( $C_{\text{max}}$ ) within 30 min ( $t_{\text{max}}$ ) suggesting its rapid absorption. However, due to hepatic first-pass

metabolism, a limited bioavailability was noticed (0.4 %). Indeed, a significant ferulic acid (FA) peak plasma concentration ( $68.3 \pm 8.3 \mu\text{M}$ ) appeared at the same  $t_{\text{max}}$  as CA. Comparison of the area under the curve (AUC) for plasma showed a significantly higher AUC<sub>(0-360)</sub> for CA than FA for UUO-CA treated mice ( $4964 \pm 97.3$  vs.  $4648 \pm 91.1$ , respectively), suggesting that CA stays longer in plasma than FA (Figure 7B). Notably, no plasma CA and FA peak was registered for the vehicle group. In the kidneys (Figure 7C, 7D), one hour after CA administration, CA and FA concentrations were significantly higher (x5) in the obstructed kidneys compared to the contralateral kidneys ( $5.3 \pm 1.1$  and  $4.5 \pm 0.8 \mu\text{M}$  vs.  $0.3 \pm 0.1$  and  $0.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ , respectively). Interestingly, a significantly high AUC<sub>(0-360)</sub> was calculated for CA and FA in the obstructed kidneys compared to the contralateral kidneys ( $881 \pm 17.2$  and  $1073 \pm 21$  vs.  $100 \pm 2$  and  $98.5 \pm 11$ , respectively) indicating their accumulation in the obstructed kidney (Figure 7D). Taking these data into account we set up a DESI-HR/MS experiment to visualize the spatial distribution of CA in the obstructed kidney 1 h after CA gavage.



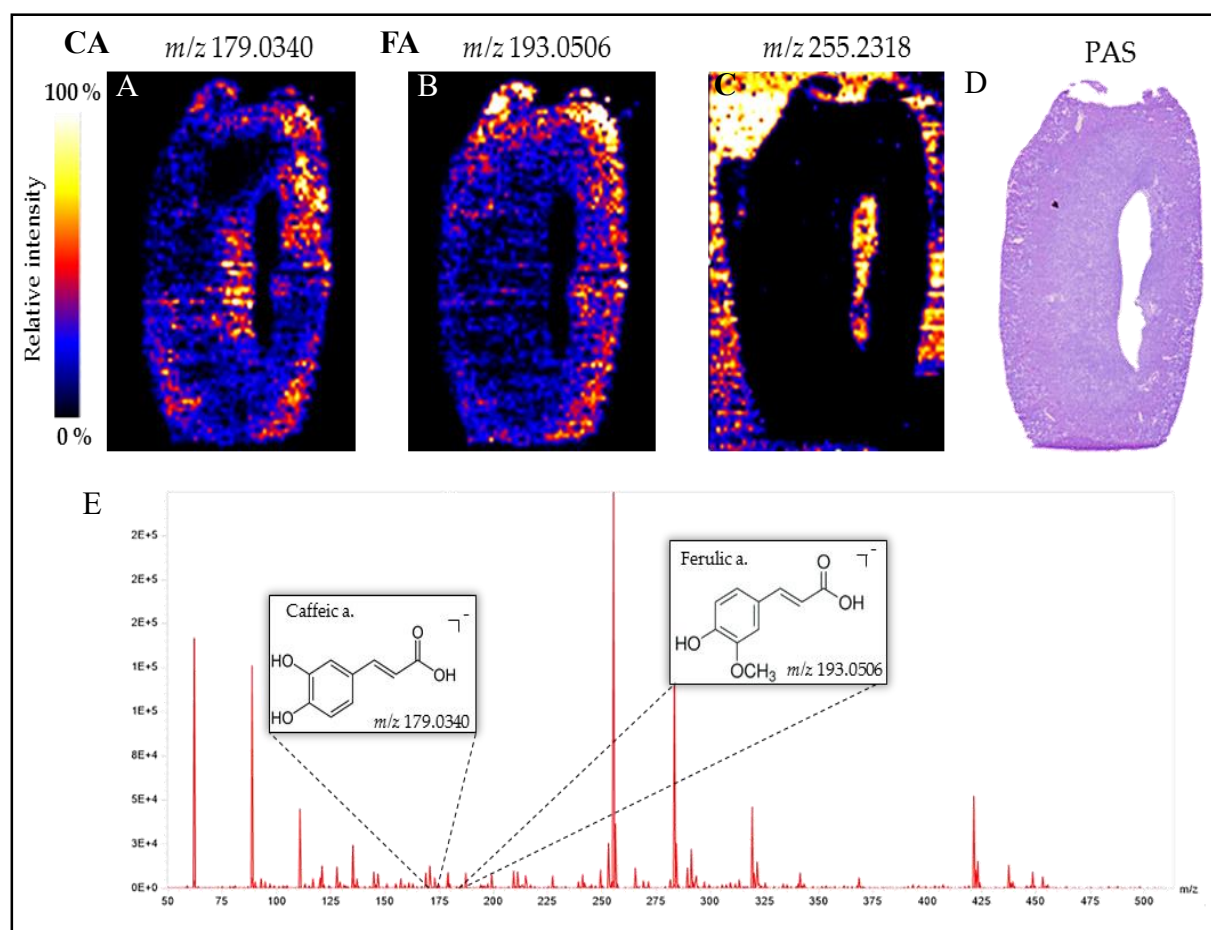
**Figure 7.** Pharmacokinetic study of caffeic acid (CA) and ferulic acid (FA) after oral administration of CA (25 mg/kg) in 3 days-UUO mice. (A) Plasma concentration–time profiles of CA and its circulation metabolite, ferulic acid (FA), in UUO mice. (B) Corresponding area under the curves (AUC) of CA and FA in plasma. (C) Concentration–time profiles of CA and FA in obstructed and contralateral kidneys. (D) Corresponding area under the curves (AUC) of CA and FA in obstructed and contralateral kidneys. Concentrations were determined using UPLC-HESI-Q-orbitrap (Q-Exactive™ Plus). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  compared to UUO + Vehicle, \$\$\$\$  $p < 0.0001$ , compared to caffeic acid; \$\$  $p < 0.01$ , \$\$\$  $p < 0.001$ , \$\$\$\$\$  $p < 0.0001$ , compared to contralateral kidney; \$\$\$  $p < 0.001$ , \$\$\$\$\$  $p < 0.0001$ , compared to caffeic acid. Values are means  $\pm$  SD;  $n = 3$  animals/time.

**Table 4.** Pharmacokinetic parameters at the dose 25 mg/kg of caffeic acid (CA) orally administered in UUO mice. AUC represents the calculated area under the curve between 0 and 360 min.  $C_{max}$  is the maximum concentration achieved.  $t_{max}$  is the required time to achieve  $C_{max}$ . Bioavailability (F) is the fraction of the administered dose that is available to the systemic circulation. Values are means;  $n = 3$  animals/time.

Parameter	Oral Administration (Gavage)	
	Caffeic Acid	
AUC <sub>(0-360)</sub>	4964	
$C_{max}$ ( $\mu$ M)	50.5	
$t_{max}$ (min)	30	
F (%)	0.4	

### 3.9. Visualization of Orally Administered Caffeic Acid (CA) in the Obstructed Kidney

The spatial distribution of CA ( $m/z$  179.0340) and FA ( $m/z$  193.0506) in mice obstructed kidney is shown in Figure 8A, B respectively. When compared to PAS staining (Figure 8D) we observed the presence of CA in the renal cortex where the dilated tubules are found, and thus where tubulointerstitial fibrosis will appear and progress. Caffeic acid is also present in renal papilla, suggesting CA urinary elimination. Taken together our data highlight that CA exerts an antifibrotic effect in the UUO mouse model.



**Figure 8.** Visualization of caffeic acid (CA) and its circulating metabolite, ferulic acid (FA), 1 h post oral administration of CA 25 mg/kg in the obstructed kidney tissue of mice. Desorption electrospray ionization-high resolution/mass spectrometry (DESI-HR/MS) Imaging of (A) caffeic acid ( $m/z$  179.0340), (B) ferulic acid ( $m/z$  193.0506) and (C)  $m/z$  255.2318 used to show the negative fingerprint of tissue and

the corresponding Periodic Acid Schiff (PAS) staining (D). (E) DESI-HR/MS mass spectrum ranging from  $m/z$  50 to 500. The Synapt Blue-Red-Yellow color scale was used.

#### 4. Discussion

Medicinal plants are usually perceived as safe medication. However, plants can also contain many toxic substances that may be a risk to the kidneys [41,42]. Here, we first looked for the presence of known nephrotoxic molecules and showed that no toxic molecule, at least associated with Chinese herbal nephrotoxicity [43], was present in *A. borbonica*. These results made us confident to investigate *in vivo* the putative nephroprotective effect of *A. borbonica*.

Although rarely found in humans, the complete obstruction of the ureter in the UUO model mimics, in an accelerated manner, the different stages leading to renal tubulointerstitial fibrosis [44]. It includes inflammation associated with macrophage infiltration and the up-regulation of pro-fibrotic molecules, as well as the appearance and the accumulation of myofibroblasts, which are the main cell type responsible for the secretion of extracellular matrix proteins [44]. Because of the highly reproducible fibrotic response this UUO model is now well recognized to test the antifibrotic potency of candidate molecules [45].

In the present study, we provide evidence that the oral administration of polyphenol-rich extract from *A. borbonica* significantly attenuates, *in vivo*, renal interstitial fibrosis. We showed that this nephroprotective effect goes through reduction in the three phases of the fibrosis process (macrophage infiltration, myofibroblast appearance and extracellular matrix accumulation). An increasing number of studies using the UUO model have reported similar effects, mainly observed in a preventive way, from polyphenol-rich extracts of various origins such as *Elsholtzia ciliate* [46] and *Nigella sativa* [47], but also from polyphenol molecules such as curcumin from *Curcuma longa* [48], icariin, an active flavonoid from the *Epinedium* genus [49], resveratrol [50], quercetin, a flavonoid present in vegetables and fruits [51], and epigallocatechin-3-gallate, a green tea polyphenol [52]. In line with these studies, our results show, for the first time, that either in a preventive or curative treatment *A. borbonica* significantly attenuates macrophage infiltration. This anti-inflammatory effect leads to a strong decrease in myofibroblast appearance in the tubulointerstitial space and consequently to a reduced tubulointerstitial fibrosis, as evidenced by the down-regulation of *Fn* mRNA, as well as *Col I* and *III* at the mRNA and protein levels. As expected, this was associated with the mRNA down-regulation of pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines (*Tgf- $\beta$* , *Tnf- $\alpha$* ), a chemokine (*Mcp1*), and a transcription factor (*Nf- $\kappa$ B*).

As polyphenols are known to exert antioxidant effects [53], we studied the expression of *Nrf2*, which is a major transcription factor involved in the regulation of antioxidant enzymes [54,55]. We found that UUO induced an increase in *Nrf2* gene expression. This up-regulation was expected since UUO is known to induce oxidative stress [56], which in turn stimulates *Nrf2* gene and protein expression [57]. In addition, we observed that polyphenol-rich extract from *A. borbonica* further stimulated *Nrf2* gene expression. It suggests that polyphenols from *A. borbonica* have the capacity to stimulate *Nrf2*. This result was consistent with the, now well admitted, effect of polyphenols such as *Nrf2* activator [58]. To further get insights into the nephroprotective mechanism of polyphenol-rich extract from *A. borbonica*, we measured antioxidant enzymes known to be up-regulated by *Nrf2*. Whereas polyphenol-rich extract from *A. borbonica* was without significant effect on the mRNA expression of *Cat*, *Gpx* and *Sod* when compared to the UUO-untreated animals, we observed a significant increase in the enzyme activities of GPX and Cu/ZnSOD. Although most of the studies using the UUO model to investigate the renal effects of polyphenols have focused on the protein expression of antioxidant enzymes [49,59], our data are consistent with the few works that investigated the antioxidant enzyme activity, showing that the renal enzyme activities of CAT and total-SOD are significantly reduced in the obstructed kidney [47,60]. The decrease in these main antioxidant activities in the UUO model are generally associated with an increase in reactive oxygen species which can lead to protein damage and the formation of oxidized compounds such as carbonylated proteins [61]. Whereas polyphenol-rich extract from *A. borbonica* had no effect on CAT and Mn-SOD enzyme

activities, our data show a significant increase in GPX and Cu/ZnSOD enzyme activities. These results specify more clearly the mechanism of action of *A. borbonica*. In addition, the beneficial effect of *A. borbonica* on both enzymes' activities seems to be strong enough to protect proteins from the oxidative damage induced by UO.

We have previously reported [32] that CA and derivatives were the most abundant polyphenolic compounds of *A. borbonica*. In order to explore the mechanism of action of polyphenol-rich extract from *A. borbonica*, we investigated if we could reproduce the observed curative nephroprotective effects of *A. borbonica* extract by oral administration of CA. It is now well known that CA exhibits antioxidant and anti-inflammatory properties [62], and that administration of caffeamide derivatives have shown antifibrotic effects in renal ischemia reperfusion [63], as well as in the UO model [64]. However, to the best of our knowledge, the oral administration of the CA molecule has never been studied in the UO model. Since CA is the main phenolic acid found in *A. borbonica* [32], to properly investigate if CA participates in the antioxidant and anti-fibrotic effects observed with the polyphenol-rich extract from *A. borbonica*, we had to study the effect of oral administration of CA in the representative UO renal tubulointerstitial fibrosis model. Our results clearly show that oral administration for 5 days of CA (25 mg/kg), 3 days after UO, significantly decreased macrophage infiltration, myofibroblast appearance and extracellular matrix accumulation. This was associated with the down-regulation of pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines, as well as a significant increase in *Nrf2* mRNA expression and CAT and Cu/ZnSOD enzyme activities. This increase in *Nrf2* is consistent with in vitro data showing that CA [65] and CA derivatives [66] exert their protective effect via the *Nrf2* pathway. The results obtained with CA administration on antioxidant enzyme activities are slightly different from the effect observed with *A. borbonica* polyphenol-rich extract. Indeed, when compared to the UO + Veh group, we observed a significant increase in CAT activity, and the increase in GPX activity was not significantly different. In addition, we did not observe a significant effect on carbonylated proteins. In fact, the observed effect on antioxidant enzyme activity with the polyphenol-rich extract from *A. borbonica* may result from the combination of the different polyphenols' effects. Thus, these discrepancies could be related to the administered CA dose, which is much higher than the CA concentration in the polyphenol-rich extract from *A. borbonica*.

To provide more evidence that polyphenols can exert their biological effects at the kidney level, we used the DESI imaging technique to visualize and provide evidence that CA, given by oral route, is rapidly present in the kidney, strongly suggesting bioavailability of CA in the kidney. Our data are consistent with the biodistribution study of Omar et al. [67] which used [ $^{14}\text{C}$ ]trans-caffeic acid. However, we observed a low bioavailability ( $F = 0.4\%$ ) probably due to an important metabolic activity in the intestine and liver prior to reaching the main blood stream. The presence of the CA metabolite ferulic acid, produced by the action of catechol-O-methyl transferase, confirms this hypothesis as previously reported [68,69]. DESI-HR/MS imaging allowed us to visualize, for the first time, CA and FA in the renal cortex. Regardless of the quantity of CA that reached the kidney tissue, our data strongly suggests that CA is involved in the nephroprotective effect of the polyphenol-rich extract from *A. borbonica*.

## 5. Conclusions

The present study demonstrates, for the first time, that both polyphenol-rich extract from *A. borbonica* and CA, which is the predominant polyphenol, significantly improves, in a curative way, renal tubulointerstitial fibrosis in the UO mouse model, especially via their antioxidant and anti-inflammatory properties. Further studies will be necessary to validate this antifibrotic effect on chronic models of renal disease, such as diabetic nephropathy. Notably, we cannot rule out that part of the observed nephroprotective effects of *A. borbonica* could be mediated by other polyphenols present in the plant extract, such as quercetin and kaempferol. Indeed, further investigations will be necessary to determine the individual and synergistic effects between the main polyphenols found in *A. borbonica*, to better understand this nephroprotective effect before considering clinical trials.



**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Table S1: The known nephrotoxic molecules not detected by UPLC-HESI-Q-Orbitrap (Q-Exactive™ Plus) in *A. borbonica* extract.

**Author Contributions:** B.V. and J.-L.B. conceived and designed the experiments; B.V., M.B., C.T., P.R., C.P., I.A.-A. and F.G. performed the experiments; B.V., P.R. and J.-L.B. analyzed the data; M.-P.G., C.M., O.M., N.D. and J.-L.B. contributed reagents/materials/analysis tools; writing—original draft, B.V. and J.-L.B.; writing—review and editing, B.V., M.-P.G., O.M., N.D. and J.-L.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by European Regional Development Funds (FEDER RE0022527 ZEBRATOX, EU-Région Réunion-French State national counterpart), the University of La Réunion, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Reunion dotation funds Philancia. Bryan Veeren is a recipient of a fellowship from the Région Réunion.

**Institutional Review Board Statement:** All reported experiments were performed at the GIP-CYROI technological platform's animal facility (A974001), conducted in accordance with NIH guidelines for the care and use of laboratory animals, and were approved by the French authorities (APAFIS#7347-2016100314466830v5, approved on 04 september 2017).

**Informed Consent Statement:** N/A.

**Data Availability Statement:** N/A.

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

## References

1. Epstein, F.H.; Klahr, S.; Schreiner, G.; Ichikawa, I. The progression of renal disease. *N. Engl. J. Med.* **1988**, *318*, 1657–1666, doi:10.1056/nejm198806233182505.
2. Nath, K.A. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am. J. Kidney Dis.* **1992**, *20*, 1–17, doi:10.1016/s0272-6386(12)80312-x.
3. Cohen, E. Fibrosis causes progressive kidney failure. *Med. Hypotheses* **1995**, *45*, 459–462, doi:10.1016/0306-9877(95)90221-x.
4. Nangaku, M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Intern. Med.* **2004**, *43*, 9–17, doi:10.2169/internalmedicine.43.9.
5. Hewitson, T.D. Renal tubulointerstitial fibrosis: Common but never simple. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2009**, *296*, F1239–F1244, doi:10.1152/ajprenal.90521.2008.
6. Liu, Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **2011**, *7*, 684–696, doi:10.1038/nrneph.2011.149.
7. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: Results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *Lancet* **2000**, *355*, 253–259. Erratum in: *Lancet* **2000**, *356*, 860.
8. Pitt, B.; Poole-Wilson, P.; Segal, R.; Martinez, F.; Dickstein, K.; Camm, A.J.; Konstam, M.; Riegger, G.; Klingler, G.H.; Neaton, J.; et al. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: Randomised trial—the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet* **2000**, *355*, 1582–1587, doi:10.1016/s0140-6736(00)02213-3.
9. Lewis, E.J.; Hunsicker, L.G.; Clarke, W.R.; Berl, T.; Pohl, M.A.; Lewis, J.B.; Ritz, E.; Atkins, R.C.; Rohde, R.; Raz, I. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *345*, 851–860, doi:10.1056/nejmoa011303.
10. Eckardt, K.-U.; Coresh, J.; Devuyst, O.; Johnson, R.J.; Köttgen, A.; Levey, A.S.; Levin, A. Evolving importance of kidney disease: From subspecialty to global health burden. *Lancet* **2013**, *382*, 158–169, doi:10.1016/s0140-6736(13)60439-0.
11. Sridhar, V.S.; Rahman, H.U.; Cherney, D.Z. What have we learned about renal protection from the cardiovascular outcome trials and observational analyses with SGLT2 inhibitors? *Diabetes, Obes. Metab.* **2020**, *22*, 55–68, doi:10.1111/dom.13965.
12. Scherthaner, G.; Groop, P.; Kalra, P.A.; Ronco, C.; Taal, M.W. Sodium-glucose linked transporter-2 inhibitor renal outcome modification in type 2 diabetes: Evidence from studies in patients with high or low renal risk. *Diabetes, Obes. Metab.* **2020**, *22*, 1024–1034, doi:10.1111/dom.13994.
13. Hodrea, J.; Balogh, D.B.; Hosszu, A.; Lenart, L.; Besztercei, B.; Koszegi, S.; Sparding, N.; Genovese, F.; Wagner, L.J.; Szabo, A.J.; et al. Reduced O-GlcNAcylation and tubular hypoxia contribute to the antifibrotic effect of

- SGLT2 inhibitor dapagliflozin in the diabetic kidney. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2020**, *318*, F1017–F1029, doi:10.1152/ajprenal.00021.2020.
14. Allinovi, M.; De Chiara, L.; Angelotti, M.L.; Becherucci, F.; Romagnani, P. Anti-fibrotic treatments: A review of clinical evidence. *Matrix Biol.* **2018**, *68–69*, 333–354, doi:10.1016/j.matbio.2018.02.017.
  15. Moreno, J.A.; Gomez-Guerrero, C.; Mas, S.; Sanz, A.B.; Lorenzo, O.; Ruiz-Ortega, M.; Opazo, L.; Mezzano, S.; Egido, J. Targeting inflammation in diabetic nephropathy: A tale of hope. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2018**, *27*, 917–930, doi:10.1080/13543784.2018.1538352.
  16. Lv, W.; Booz, G.W.; Fan, F.; Wang, Y.; Roman, R.J. Oxidative Stress and Renal Fibrosis: Recent Insights for the Development of Novel Therapeutic Strategies. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 105, doi:10.3389/fphys.2018.00105.
  17. Ow, C.P.C.; Ngo, J.P.; Ullah, M.; Hilliard, L.M.; Evans, R.G. Renal hypoxia in kidney disease: Cause or consequence? *Acta Physiol.* **2018**, *222*, e12999, doi:10.1111/apha.12999.
  18. Vanherweghem, J.-L.; Tielemans, C.; Abramowicz, D.; Depierreux, M.; Vanhaelen-Fastre, R.; Vanhaelen, M.; Dratwa, M.; Richard, C.; Vandervelde, D.; Verbeelen, D.; et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: Association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* **1993**, *341*, 387–391, doi:10.1016/0140-6736(93)92984-2.
  19. Jadot, I.I.; Declèves, A.-E.; Nortier, J.; Caron, N. An Integrated View of Aristolochic Acid Nephropathy: Update of the Literature. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 297, doi:10.3390/ijms18020297.
  20. Giraud-Techer, S.; Amedee, J.; Girard-Valenciennes, E.; Thomas, H.; Brillant, S.; Grondin, I.; Marodon, C.; Smadja, J. Plantes medicinales de la Réunion inscrites à la pharmacopée française. *Ethnopharmacologia* **2016**, *5*, 7–33.
  21. Adsersen, A.; Adsersen, H. Plants from Réunion Island with alleged antihypertensive and diuretic effects— an experimental and ethnobotanical evaluation. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *58*, 189–206, doi:10.1016/s0378-8741(97)00100-1.
  22. Marimoutou, M.; Le Sage, F.; Smadja, J.; D’Hellencourt, C.L.; Gonthier, M.-P.; Silva, C.R.-D. Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* and *Gouania mauritiana* protect 3T3-L1 preadipocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismutase and NF- $\kappa$ B genes. *J. Inflamm.* **2015**, *12*, 1–15, doi:10.1186/s12950-015-0055-6.
  23. Fortin, H.; Vigor, C.; Dévéhat, F.L.-L.; Robin, V.; Le Bossé, B.; Boustie, J.; Amoros, M. In vitro antiviral activity of thirty-six plants from La Réunion Island. *Fitoter* **2002**, *73*, 346–350, doi:10.1016/s0367-326x(02)00080-1.
  24. 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.
  25. Haddad, J.G.; Koishi, A.C.; Gaudry, A.; Dos Santos, C.N.D.; Viranaicken, W.; Desprès, P.; El Kalamouni, C. *Doratoxylon apetalum*, an Indigenous Medicinal Plant from Mascarene Islands, Is a Potent Inhibitor of Zika and Dengue Virus Infection in Human Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2382, doi:10.3390/ijms20102382.
  26. Lavergne, R. *Tisaneurs et Plantes Médicinales Indigènes à la Réunion*; Orphie: Livry Gargan, France, 2016; ISBN 979-10-298 0073-3.
  27. Poullain, C.; Girard-Valenciennes, E.; Smadja, J. Plants from reunion island: Evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *95*, 19–26, doi:10.1016/j.jep.2004.05.023.
  28. 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, doi:10.3390/antiox9070573.
  29. Delveaux, J.; Turpin, C.; Veeren, B.; Diotel, N.; Bravo, S.B.; Begue, F.; Álvarez, E.; Meilhac, O.; Bourdon, E.; Rondeau, P. *Antirhea borbonica* Aqueous Extract Protects Albumin and Erythrocytes from Glycoxidative Damages. *Antioxidants* **2020**, *9*, 415, doi:10.3390/antiox9050415.
  30. 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*, 1–17, doi:10.1038/s41598-020-71402-2.
  31. Arcambal, A.; Taïlé, J.; Couret, D.; Planesse, C.; Veeren, B.; Diotel, N.; Gauvin-Bialecki, A.; Meilhac, O.; Gonthier, M. Protective Effects of Antioxidant Polyphenols against Hyperglycemia-Mediated Alterations in Cerebral Endothelial Cells and a Mouse Stroke Model. *Mol. Nutr. Food Res.* **2020**, *64*, e1900779, doi:10.1002/mnfr.201900779.
  32. Veeren, B.; Ghaddar, B.; Bringart, M.; Khazaal, S.; Gonthier, M.-P.; Meilhac, O.; Diotel, N.; Bascands, J.-L. 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* **2020**, *25*, 4482, doi:10.3390/molecules25194482.
  33. Clifford, M.N.; Kerimi, A.; Williamson, G. Bioavailability and metabolism of chlorogenic acids (acyl-quinic acids) in hu-mans. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 1299–1352, doi:10.1111/1541-4337.12518).

34. Schramm, T.A.; Hester, I.; Klinkert, J.-P.; Both, R.M.A.; Heeren, A.; Brunelle, O.; Laprévotte, N.; Desbenoit, M.-F.; Robbe, M.; Stoeckli, B. Spengler, and A. Römpf. imzML—A common data format for the flexible exchange and processing of mass spectrometry imaging data. *J. Proteom.* **2012**, *75*, 5106–5110.
35. Källback, P.; Nilsson, A.; Shariatgorji, M.; André, P.E. msQuant—Quantitation Software for Mass Spectrometry Imaging Enabling Fast Access, Visualization, and Analysis of Large Data Sets. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 4346–4353, doi:10.1021/acs.analchem.5b04603.
36. Schanstra, J.P.; Neau, E.; Drogoz, P.; Gomez, M.A.A.; Novoa, J.M.L.; Calise, D.; Pécher, C.; Bader, M.; Girolami, J.-P.; Bascands, J.-L. In vivo bradykinin B2 receptor activation reduces renal fibrosis. *J. Clin. Investig.* **2002**, *110*, 371–379, doi:10.1172/jci15493.
37. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
38. Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **1999**, *64*, 555–559, doi:10.1016/s0308-8146(98)00102-2.
39. Klein, J.; Gonzalez, J.; Duchene, J.; Esposito, L.; Pradere, J.P.; Neau, E.; Delage, C.; Calise, D.; Ahluwalia, A.; Carayon, P.; et al. Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. *FASEB J.* **2008**, *23*, 134–142, doi:10.1096/fj.08-115600.
40. Rondeau, P.; Navarra, G.; Cacciabauda, F.; Leone, M.; Bourdon, E.; Militello, V. Thermal aggregation of glycated bovine serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Proteins Proteom.* **2010**, *1804*, 789–798, doi:10.1016/j.bbapap.2009.12.003.
41. De Smet, P.A.G.M. Herbal remedies. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 2046–2056, doi:10.1056/nejmra020398.
42. Colson, C.R.; De Broe, M.E. Kidney injury from alternative medicines. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **2005**, *12*, 261–275, doi:10.1016/j.ackd.2005.03.006.
43. Yang, B.; Xie, Y.; Guo, M.; Rosner, M.H.; Yang, H.; Ronco, C. Nephrotoxicity and Chinese herbal medicine. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2018**, *13*, 1605–1611, doi:10.2215/cjn.11571017.
44. Bascands, J.-L.; Schanstra, J.P. Obstructive nephropathy: Insights from genetically engineered animals. *Kidney Int.* **2005**, *68*, 925–937, doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00486.x.
45. Eddy, A.A.; López-Guisa, J.M.; Okamura, D.M.; Yamaguchi, I. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatr. Nephrol.* **2011**, *27*, 1233–1247, doi:10.1007/s00467-011-1938-2.
46. Kim, T.-W.; Kim, Y.-J.; Seo, C.-S.; Kim, H.-T.; Park, S.-R.; Lee, M.-Y.; Jung, J.-Y. *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hylander attenuates renal inflammation and interstitial fibrosis via regulation of TGF- $\beta$  and Smad3 expression on unilateral ureteral obstruction rat model. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 331–339, doi:10.1016/j.phymed.2016.01.013.
47. Hosseini, S.; Bideskan, A.E.; Shafei, M.N.; Sadeghnia, H.R.; Soukhtanloo, M.; Shahraki, S.; Noshahr, Z.S.; Rad, A.K. *Nigella sativa* extract is a potent therapeutic agent for renal inflammation, apoptosis, and oxidative stress in a rat model of unilateral ureteral obstruction. *Phytother. Res.* **2018**, *32*, 2290–2298, doi:10.1002/ptr.6169.
48. Zhou, X.; Zhang, J.; Xu, C.; Wang, W. Curcumin ameliorates renal fibrosis by inhibiting local fibroblast proliferation and extracellular matrix deposition. *J. Pharmacol. Sci.* **2014**, *126*, 344–350, doi:10.1254/jphs.14173fp.
49. Chen, H.; Chen, C.-M.; Guan, S.-S.; Chiang, C.-K.; Wu, C.-T.; Liu, S.-H. The antifibrotic and anti-inflammatory effects of icariin on the kidney in a unilateral ureteral obstruction mouse model. *Phytomedicine* **2019**, *59*, 152917, doi:10.1016/j.phymed.2019.152917.
50. Liu, S.; Zhao, M.; Zhou, Y.; Wang, C.; Yuan, Y.; Li, L.; Bresette, W.; Chen, Y.; Cheng, J.; Lu, Y.; et al. Resveratrol exerts dose-dependent anti-fibrotic or pro-fibrotic effects in kidneys: A potential risk to individuals with impaired kidney function. *Phytomedicine* **2019**, *57*, 223–235, doi:10.1016/j.phymed.2018.12.024.
51. Liu, X.; Sun, N.; Mo, N.; Lu, S.; Song, E.; Ren, C.; Li, Z. Quercetin inhibits kidney fibrosis and the epithelial to mesenchymal transition of the renal tubular system involving suppression of the Sonic Hedgehog signaling pathway. *Food Funct.* **2019**, *10*, 3782–3797, doi:10.1039/c9fo00373h.
52. Wang, Y.; Wang, B.; Du, F.; Su, X.; Sun, G.; Zhou, G.; Bian, X.; Liu, N. Epigallocatechin-3-gallate attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal interstitial fibrosis in mice. *J. Histochem. Cytochem.* **2014**, *63*, 270–279, doi:10.1369/0022155414568019.
53. Scalbert, A.; Johnson, I.T.; Saltmarsh, M. Polyphenols: Antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 215S–217S, doi:10.1093/ajcn/81.1.215s.
54. Wakabayashi, N.; Slocum, S.L.; Skoko, J.J.; Shin, S.; Kensler, T.W. When NRF2 talks, who's listening? *Antioxid. Redox Signal.* **2010**, *13*, 1649–1663, doi:10.1089/ars.2010.3216.
55. Bocci, V.; Valacchi, G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. *Front. Chem.* **2015**, *3*, 4, doi:10.3389/fchem.2015.00004.
56. Zecher, M.; Guichard, C.; Velásquez, M.J.; Figueroa, G.; Rodrigo, R. Implications of oxidative stress in the pathophysiology of obstructive uropathy. *Urol. Res.* **2008**, *37*, 19–26, doi:10.1007/s00240-008-0163-3.



57. Aminzadeh, M.A.; Nicholas, S.B.; Norris, K.C.; Vaziri, N.D. Role of impaired Nrf2 activation in the pathogenesis of oxidative stress and inflammation in chronic tubulo-interstitial nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2013**, *28*, 2038–2045, doi:10.1093/ndt/gft022.
58. Zhou, Y.; Jiang, Z.; Lu, H.; Xu, Z.; Tong, R.; Shi, J.; Jia, G. Recent Advances of Natural Polyphenols Activators for Keap1-Nrf2 Signaling Pathway. *Chem. Biodivers.* **2019**, *16*, e1900400, doi:10.1002/cbdv.201900400.
59. Wang, W.; Wang, X.; Zhang, X.-S.; Liang, C.-Z. Cryptotanshinone Attenuates Oxidative Stress and Inflammation through the Regulation of Nrf-2 and NF- $\kappa$ B in Mice with Unilateral Ureteral Obstruction. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2018**, *123*, 714–720, doi:10.1111/bcpt.13091.
60. Wang, Y.; Wang, B.; Du, F.; Su, X.; Sun, G.; Zhou, G.; Bian, X.; Liu, N. Epigallocatechin-3-Gallate Attenuates Oxidative Stress and Inflammation in Obstructive Nephropathy via NF- $\kappa$ B and Nrf2/HO-1 Signalling Pathway Regulation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2015**, *117*, 164–172, doi:10.1111/bcpt.12383.
61. Dendooven, A.; Ishola, D.A., Jr.; Nguyen, T.Q.; Van Der Giezen, D.M.; Kok, R.J.; Goldschmeding, R.; Joles, J.A. Oxidative stress in obstructive nephropathy. *Int. J. Exp. Pathol.* **2010**, *92*, 202–210, doi:10.1111/j.1365-2613.2010.00730.x.
62. Damasceno, S.S.; Dantas, B.B.; Ribeiro-Filho, J.; Araújo, D.A.M.; Da Costa, J.G.M. Chemical Properties of Caffeic and Ferulic Acids in Biological System: Implications in Cancer Therapy. A Review. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 3015–3023, doi:10.2174/1381612822666161208145508.
63. Chuang, S.-T.; Kuo, Y.-H.; Su, M.-J. Antifibrotic effects of KS370G, a caffeamide derivative, in renal ischemia-reperfusion injured mice and renal tubular epithelial cells. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, srep05814, doi:10.1038/srep05814.
64. Chuang, S.-T.; Kuo, Y.-H.; Su, M.-J. KS370G, a caffeamide derivative, attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis by the reduction of inflammation and oxidative stress in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *750*, 1–7, doi:10.1016/j.ejphar.2015.01.020.
65. Pan, Y.; Deng, Z.-Y.; Chen, X.; Zhang, B.; Fan, Y.; Li, H. Synergistic antioxidant effects of phenolic acids and carotenes on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced H9c2 cells: Role of cell membrane transporters. *Food Chem.* **2021**, *341*, 128000, doi:10.1016/j.foodchem.2020.128000.
66. Peng, X.; Wu, G.; Zhao, A.; Huang, K.; Chai, L.; Natarajan, B.; Yang, S.; Chen, H.; Lin, C. Synthesis of novel caffeic acid derivatives and their protective effect against hydrogen peroxide induced oxidative stress via Nrf2 pathway. *Life Sci.* **2020**, *247*, 117439, doi:10.1016/j.lfs.2020.117439.
67. Omar, M.H.; Mullen, W.; Stalmach, A.; Auger, C.; Rouanet, J.-M.; Teissedre, P.-L.; Caldwell, S.T.; Hartley, R.C.; Crozier, A. Absorption, disposition, metabolism, and excretion of [3-(14)C]caffeic acid in rats. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5205–5214, doi:10.1021/jf3001185.
68. Crozier, A.; Del Rio, D.; Clifford, M.N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol. Asp. Med.* **2010**, *31*, 446–467, doi:10.1016/j.mam.2010.09.007.
69. Stalmach, A.; Williamson, G.; Clifford, M.N. Dietary hydroxycinnamates and their bioavailability. In *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2012; Volume 30, pp. 123–156. Available online: <https://research.monash.edu/en/publications/dietary-hydroxycinnamates-and-their-bioavailability> (accessed on 30 March 2021).

## Données supplémentaires

**Table S1.** The known nephrotoxic molecules not detected by UPLC-HESI-Q-Orbitrap (Q-Exactive™ Plus) in *A. borbonica* extract.

Aristolochic acid	Anthraquinone	Alkaloids	Miscellaneous
Aristolochic acid I	Alizarin	Calycanthine	Podophyllotoxin
Aristolochic acid II	Damnacanthal	Tetrandrine	Alisol A 24 acetate
	Morindone	Dauricine	Bakuchiol (terpene)
	Rubiadin	Brucine	Geniposide (iridoid)
	Rubiadin 1-methyl ether	Strychnine	Esculentoside A (saponine) triterpene
	Galiosin	Veratrine	
	Munjistin	Aconitine	
	Pseudopurpurin	Pyrrrolizidine	
	Alizarin-2-O-Glucoside		
	Alizarin-O-β-glucuronide		
	Alizarin-1-O-sulfation		
	Xanthopurpurin		
	Purpurin-1-O-β-glucuronide		
	2-Methyl-1,3,6-hydroxy-9,10-		
	Anthraquinone-O-β-D-glucoside		
	Nordamnacanthal		
	6-Hydroxyrubiadin		
	Lucidin		
	Lucidin ethyl ether		
	Lucidin w-methyl ether		

## Discussion & perspectives (Publication 2)

Dans un premier temps, cette étude a permis de démontrer qu'un extrait enrichi en polyphénols d'*Antirhea Borbonica* atténuait de façon préventive et curative la FTI rénale dans le modèle d'OUU. Ces effets néphroprotecteurs passent par la réduction des 3 phases du processus de fibrose : i) l'infiltration macrophagique, ii) l'apparition des myofibroblastes et iii) l'accumulation de la matrice extra cellulaire. En effet, l'extrait enrichi en polyphénols a atténué l'infiltration macrophagique (marqueur F4/80). Ces effets anti-inflammatoires ont conduit à une atténuation de l'apparition des myofibroblastes dans l'espace tubulointerstitiel et en conséquence à une réduction de la FTI, comme en témoigne la diminution de l'expression d' $\alpha$ -SMA, de la fibronectine ainsi que des collagènes I et III (ARNm et protéines). Ces effets ont été associés à la régulation négative de l'ARNm des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , l'IL-6), d'une chimiokine (MCP-1), d'un facteur de transcription (NF $\kappa$ b) et d'une cytokine pro-fibrosante (TGF- $\beta$ ). Cet extrait a également atténué le stress oxydant comme en témoigne la diminution de l'oxydation des protéines (carbonyles). Cet effet a été associé à la régulation positive du facteur de transcription Nrf2 qui est connu pour réguler à la hausse l'expression de gènes codants pour des enzymes antioxydantes. Nous n'avons pas observé d'augmentation significative au niveau des gènes codant pour les *SOD*, *GPx* et *Cat*. Cependant, une augmentation de l'activité enzymatique de la GPX et de la Cu/ZnSOD a été mise en évidence. Il est important de noter que les polyphénols sont eux-mêmes des antioxydants.

Des analyses de métabolomique ciblée par HPLC-MS/MS ont permis de détecter la présence d'acide caféique et de l'acide férulique (métabolites circulants de l'acide caféique) issu du métabolisme des polyphénols d'*Antirhea borbonica* au niveau du tissu rénal, dans les urines et le foie. Il était important pour nous de faire ces analyses afin d'identifier le ou les composés responsables de ces effets néphroprotecteurs.

Dans un deuxième temps, nous avons pu montrer que l'acide caféique atténuait la FTI rénale de la même manière que l'extrait enrichi en polyphénols. Cependant, à la différence de l'extrait, l'acide caféique a augmenté l'expression génique ainsi que l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes (CAT, GPX, MnSOD et la Cu/ZnSOD).

Dans un troisième temps, afin de s'assurer de la biodisponibilité des composés qui sont administrés par voie orale, une étude de pharmacocinétique d'absorption de l'acide caféique (polyphénol majoritaire d'*Antirhea borbonica*) réalisée sur des souris ayant subis une OUU, a permis de mettre en évidence que l'acide caféique et l'acide férulique étaient retrouvés dans la circulation systémique. Cette étude a permis de mettre également en évidence l'accumulation de ces composés au niveau du rein obstrué. Pour aller encore plus loin, nous avons grâce à l'imagerie par spectrométrie de masse (système DESI) pu imager pour la première fois la distribution spatiale de l'acide caféique au niveau du cortex rénal. Ces résultats suggèrent que les effets néphroprotecteurs de l'extrait enrichi en polyphénols d'*Antirhea borbonica* sont médiés en partie par l'acide caféique. Toutefois, on ne peut éliminer l'implication des autres polyphénols (quercétine, kaempferol) présents dans l'extrait acétonique. L'étude individuelle de ces composés, mais également en association les uns avec les autres, permettra de déterminer l'implication de chacun d'eux dans cet effet antifibrosant.

Cette étude pourrait servir de preuve de concept afin d'évaluer rapidement le potentiel néphroprotecteur des autres plantes médicinales de la Réunion.

Néanmoins, elle présente quelques limites.

- Le modèle d'OUU utilisé, permet d'obtenir de manière rapide une fibrose rénale au niveau du rein obstrué sans qu'il y ait de perte de la fonction rénale (fonction rénale compensé par l'autre rein qui n'est pas obstrué). Or chez les personnes atteintes de MRC, il y a une perte de la

fonction rénale qui est corrélée à la FTI qui est progressive. Ce modèle ne permet donc pas de mimer la chronicité. Une alternative à ce modèle, le modèle de souris *db/db* uninephrectomisées. Ce modèle de néphropathie diabétique permet d'avoir une perte progressive (sur des mois) de la fonction rénale corrélée à la FTI. C'est ce qui se rapproche le plus de ce qui se passe chez le patient atteint de néphropathie diabétique. Ainsi, sur ce modèle nous pourrions investiguer les effets néphroprotecteurs de l'extrait enrichi en polyphénols d'*Antirhea borbonica* et de l'acide caféique. Des mesures du débit de filtration glomérulaire (DFG), d'albuminurie, d'hématurie et de créatininurie permettront d'apprécier les effets sur la fonction rénale. Grâce à des analyses par électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse du peptidome urinaire, l'efficacité du traitement pourra être évaluée par l'utilisation d'un set de biomarqueurs urinaires humanisés comme cela a été rapporté par Klein J et al., 2016. Cette approche non-invasive associée au fait que ces plantes médicinales sont déjà utilisées en médecine traditionnelle faciliterait une éventuelle étude translationnelle chez l'homme.

- En complément à cette étude, la mise en place d'un modèle de fibrose rénale *in vitro* (cellules rénales du tubule proximales) permettrait d'investiguer un peu plus les mécanismes moléculaires ainsi que les voies de signalisations impliquées dans les effets anti-inflammatoires, antioxydants et anti-fibrosant des plantes médicinales.

- Dans notre étude, une semi-quantification des polyphénols dans les différentes matrices biologiques (urine, tissus) a été mise en place. Néanmoins, l'utilisation de polyphénols lourds ou deutérés permettrait de réaliser une quantification absolue, plus précise de ces polyphénols. Mais cette approche est bien plus coûteuse.



# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**





Afshin, A., Micha, R., Khatibzadeh, S., and Mozaffarian, D. (2014). Consumption of nuts and legumes and risk of incident ischemic heart disease, stroke, and diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* *100*, 278–288.

Al-Badr, W., and Martin, K.J. (2008). Vitamin D and kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* *3*, 1555–1560.

Allen, A.C., Bailey, E.M., Brenchley, P.E., Buck, K.S., Barratt, J., and Feehally, J. (2001). Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients. *Kidney Int* *60*, 969–973.

Almodhen, F., Loutochin, O., Capolicchio, J.P., Jednak, R., and El-Sherbiny, M. (2009). The role of bladder urine transforming growth factor-beta1 concentrations in diagnosis and management of unilateral prenatal hydronephrosis. *J Urol* *182*, 292–298; discussion 298.

Anders, H.-J., Vielhauer, V., Frink, M., Linde, Y., Cohen, C.D., Blattner, S.M., Kretzler, M., Strutz, F., Mack, M., Gröne, H.-J., et al. (2002). A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J Clin Invest* *109*, 251–259.

Anders, H.-J., Vielhauer, V., and Schlöndorff, D. (2003). Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int* *63*, 401–415.

Annes, J.P., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. (2003). Making sense of latent TGF $\beta$  activation. *Journal of Cell Science* *116*, 217–224.

Arcambal, A., Tailé, J., Couret, D., Planesse, C., Veeren, B., Diotel, N., Gauvin-Bialecki, A., Meilhac, O., and Gonthier, M.-P. (2020). Protective Effects of Antioxidant Polyphenols against Hyperglycemia-Mediated Alterations in Cerebral Endothelial Cells and a Mouse Stroke Model. *Mol Nutr Food Res* *64*, e1900779.

Arthur, J.R. (2000). The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* *57*, 1825–1835.

Astor, B.C., Matsushita, K., Gansevoort, R.T., van der Velde, M., Woodward, M., Levey, A.S., Jong, P.E. de, Coresh, J., Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, Astor, B.C., et al. (2011). Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with mortality and end-stage renal disease. A collaborative meta-analysis of kidney disease population cohorts. *Kidney Int* *79*, 1331–1340.

Ballermann, B.J., and Obeidat, M. (2014). Tipping the balance from angiogenesis to fibrosis in CKD. *Kidney Int Suppl* (2011) *4*, 45–52.

Barnes, J.L., and Gorin, Y. (2011). Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int* *79*, 944–956.

Barratt, J., and Feehally, J. (2005). IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* *16*, 2088–2097.

Batenburg, W.W., Jansen, P.M., van den Bogaardt, A.J., and J Danser, A.H. (2012). Angiotensin II-aldosterone interaction in human coronary microarteries involves GPR30, EGFR, and endothelial NO synthase. *Cardiovasc Res* *94*, 136–143.

Baud, L., and Ardaillou, R. (1986). Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol* *251*, F765-776.

- Bedford, M., Farmer, C., Levin, A., Ali, T., and Stevens, P. (2012). Acute kidney injury and CKD: chicken or egg? *Am J Kidney Dis* 59, 485–491.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5, 9–19.
- Bondi, C.D., Manickam, N., Lee, D.Y., Block, K., Gorin, Y., Abboud, H.E., and Barnes, J.L. (2010). NAD(P)H oxidase mediates TGF-beta1-induced activation of kidney myofibroblasts. *J Am Soc Nephrol* 21, 93–102.
- Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 786–801.
- Bostom, A.G., Kronenberg, F., and Ritz, E. (2002). Predictive performance of renal function equations for patients with chronic kidney disease and normal serum creatinine levels. *J Am Soc Nephrol* 13, 2140–2144.
- Böttlinger, E.P., and Bitzer, M. (2002). TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13, 2600–2610.
- Boyce, N.W., Tipping, P.G., and Holdsworth, S.R. (1989). Glomerular macrophages produce reactive oxygen species in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 35, 778–782.
- Braga, T.T., Correa-Costa, M., Silva, R.C., Cruz, M.C., Hiyane, M.I., da Silva, J.S., Perez, K.R., Cuccovia, I.M., and Camara, N.O.S. (2018). CCR2 contributes to the recruitment of monocytes and leads to kidney inflammation and fibrosis development. *Inflammopharmacology* 26, 403–411.
- Brown, M.J. (2007). Renin: friend or foe? *Heart* 93, 1026–1033.
- Brown, K.A., Pietenpol, J.A., and Moses, H.L. (2007). A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *J Cell Biochem* 101, 9–33.
- Cachofeiro, V., Goicochea, M., de Vinuesa, S.G., Oubiña, P., Lahera, V., and Luño, J. (2008). Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl* S4-9.
- Campanholle, G., Ligresti, G., Gharib, S.A., and Duffield, J.S. (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 304, C591-603.
- Cao, Q., Wang, Y., Wang, X.M., Lu, J., Lee, V.W.S., Ye, Q., Nguyen, H., Zheng, G., Zhao, Y., Alexander, S.I., et al. (2015). Renal F4/80+ CD11c+ mononuclear phagocytes display phenotypic and functional characteristics of macrophages in health and in adriamycin nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 26, 349–363.
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F.J., and Queipo-Ortuño, M.I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J. Nutr. Biochem.* 24, 1415–1422.
- Chatzileontiadou, D.S.M., Sloane, H., Nguyen, A.T., Gras, S., and Grant, E.J. (2021). The Many Faces of CD4+ T Cells: Immunological and Structural Characteristics. *International*

Journal of Molecular Sciences 22, 73.

Cho, M.E., and Kopp, J.B. (2010). Pirfenidone: an anti-fibrotic and cytoprotective agent as therapy for progressive kidney disease. *Expert Opin Investig Drugs* 19, 275–283.

Cho, M.E., Smith, D.C., Branton, M.H., Penzak, S.R., and Kopp, J.B. (2007). Pirfenidone slows renal function decline in patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2, 906–913.

Colizzi, C. (2019). The protective effects of polyphenols on Alzheimer's disease: A systematic review. *Alzheimers Dement (N Y)* 5, 184–196.

Cornec-Le Gall, E., Audrézet, M.-P., Chen, J.-M., Hourmant, M., Morin, M.-P., Perrichot, R., Charasse, C., Whebe, B., Renaudineau, E., Jousset, P., et al. (2013). Type of PKD1 mutation influences renal outcome in ADPKD. *J Am Soc Nephrol* 24, 1006–1013.

Daenen, K., Andries, A., Mekahli, D., Van Schepdael, A., Jouret, F., and Bammens, B. (2019). Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 34, 975–991.

Deng, Y., Guo, Y., Liu, P., Zeng, R., Ning, Y., Pei, G., Li, Y., Chen, M., Guo, S., Li, X., et al. (2016). Blocking protein phosphatase 2A signaling prevents endothelial-to-mesenchymal transition and renal fibrosis: a peptide-based drug therapy. *Sci Rep* 6.

Desmoulière, A., Chaponnier, C., and Gabbiani, G. (2005). Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 13, 7–12.

Dhalla, N.S., Temsah, R.M., and Netticadan, T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18, 655–673.

Donadio, J.V., and Grande, J.P. (2002). IgA nephropathy. *N Engl J Med* 347, 738–748.

Dong, X., Swaminathan, S., Bachman, L.A., Croatt, A.J., Nath, K.A., and Griffin, M.D. (2007). Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 71, 619–628.

Drenckhahn, D., and Franke, R.P. (1988). Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab Invest* 59, 673–682.

Eardley, K.S., Zehnder, D., Quinkler, M., Lepenies, J., Bates, R.L., Savage, C.O., Howie, A.J., Adu, D., and Cockwell, P. (2006). The relationship between albuminuria, MCP-1/CCL2, and interstitial macrophages in chronic kidney disease. *Kidney Int* 69, 1189–1197.

Eardley, K.S., Kubal, C., Zehnder, D., Quinkler, M., Lepenies, J., Savage, C.O., Howie, A.J., Kaur, K., Cooper, M.S., Adu, D., et al. (2008). The role of capillary density, macrophage infiltration and interstitial scarring in the pathogenesis of human chronic kidney disease. *Kidney Int* 74, 495–504.

Eckardt, K.-U., Berns, J.S., Rocco, M.V., and Kasiske, B.L. (2009). Definition and classification of CKD: the debate should be about patient prognosis—a position statement from KDOQI and KDIGO. *Am J Kidney Dis* 53, 915–920.

- Eddy, A.A. (2005). Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 12, 353–365.
- Eddy, A.A., and Fogo, A.B. (2006). Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Chronic Kidney Disease: Evidence and Mechanisms of Action. *JASN* 17, 2999–3012.
- Edwards, D.R., Murphy, G., Reynolds, J.J., Whitham, S.E., Docherty, A.J., Angel, P., and Heath, J.K. (1987). Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 6, 1899–1904.
- Eisenberg, L.M., and Markwald, R.R. (1995). Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res* 77, 1–6.
- Elmarakby, A.A., and Sullivan, J.C. (2012). Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovasc Ther* 30, 49–59.
- Epelman, S., Lavine, K.J., and Randolph, G.J. (2014). Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* 41, 21–35.
- Fanelli, C., Noreddin, A., and Nunes, A. (2017). Inflammation in Nonimmune-Mediated Chronic Kidney Disease. *Chronic Kidney Disease - from Pathophysiology to Clinical Improvements*.
- Ferrario, F., Castiglione, A., Colasanti, G., Barbiano di Belgioioso, G., Bertoli, S., and D’Amico, G. (1985). The detection of monocytes in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 28, 513–519.
- Filardy, A.A., Pires, D.R., Nunes, M.P., Takiya, C.M., Freire-de-Lima, C.G., Ribeiro-Gomes, F.L., and DosReis, G.A. (2010). Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *J Immunol* 185, 2044–2050.
- Flores-Pérez, A., Marchat, L.A., Sánchez, L.L., Romero-Zamora, D., Arechaga-Ocampo, E., Ramírez-Torres, N., Chávez, J.D., Carlos-Reyes, Á., Astudillo-de la Vega, H., Ruiz-García, E., et al. (2016). Differential proteomic analysis reveals that EGCG inhibits HDGF and activates apoptosis to increase the sensitivity of non-small cells lung cancer to chemotherapy. *Prot. Clin. Appl.* 10, 172–182.
- Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311, 83–87.
- Forbes, J.M., Coughlan, M.T., and Cooper, M.E. (2008). Oxidative Stress as a Major Culprit in Kidney Disease in Diabetes. *Diabetes* 57, 1446–1454.
- Gabbiani, G., and Majno, G. (1972). Dupuytren’s contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol* 66, 131–146.
- Gentle, M.E., Shi, S., Daehn, I., Zhang, T., Qi, H., Yu, L., D’Agati, V.D., Schlondorff, D.O., and Bottinger, E.P. (2013). Epithelial cell TGF $\beta$  signaling induces acute tubular injury and interstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol* 24, 787–799.
- Ghaddar, B., Veeren, B., rondeau, P., Bringart, M., Lefebvre d’Hellencourt, C., Meilhac, O.,

- bascands, J.-L., and Diotel, N. (2020). Impaired brain homeostasis and neurogenesis in diet-induced overweight zebrafish: A preventive role from *A.borbonica* extract. *Scientific Reports*.
- Göçer, H., and Gülçin, I. (2011). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. *Int J Food Sci Nutr* 62, 821–825.
- Gong, T., Liu, L., Jiang, W., and Zhou, R. (2020). DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 20, 95–112.
- González, E.A., Sachdeva, A., Oliver, D.A., and Martin, K.J. (2004). Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease. A single center observational study. *Am J Nephrol* 24, 503–510.
- Gordon, S. (1998). The role of the macrophage in immune regulation. *Res Immunol* 149, 685–688.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23–35.
- Grande, M.T., Sánchez-Laorden, B., López-Blau, C., De Frutos, C.A., Boutet, A., Arévalo, M., Rowe, R.G., Weiss, S.J., López-Novoa, J.M., and Nieto, M.A. (2015). Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med* 21, 989–997.
- Grgic, I., Duffield, J.S., and Humphreys, B.D. (2012). The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 27, 183–193.
- Han, H., Zhu, J., Wang, Y., Zhu, Z., Chen, Y., Lu, L., Jin, W., Yan, X., and Zhang, R. (2017). Renal recruitment of B lymphocytes exacerbates tubulointerstitial fibrosis by promoting monocyte mobilization and infiltration after unilateral ureteral obstruction. *J Pathol* 241, 80–90.
- Hart, P.D., and Bakris, G.L. (2010). Hypertensive nephropathy: prevention and treatment recommendations. *Expert Opin Pharmacother* 11, 2675–2686.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792–804.
- Heinzelmann, M., Mercer-Jones, M.A., and Passmore, J.C. (1999). Neutrophils and renal failure. *Am J Kidney Dis* 34, 384–399.
- Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol* 14, 821–830.
- Himmelfarb, J. (2004). Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg? *Semin Dial* 17, 449–454.
- Hinkes, B.G., Mucha, B., Vlangos, C.N., Gbadegesin, R., Liu, J., Hasselbacher, K., Hangan, D., Ozaltin, F., Zenker, M., Hildebrandt, F., et al. (2007). Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and

LAMB2). *Pediatrics* 119, e907-919.

Hinz, B. (2006). Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *Eur J Cell Biol* 85, 175–181.

Hinz, B., Dugina, V., Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., and Chaponnier, C. (2003). Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell* 14, 2508–2519.

Holdsworth, S.R., Kitching, A.R., and Tipping, P.G. (1999). Th1 and Th2 T helper cell subsets affect patterns of injury and outcomes in glomerulonephritis. *Kidney Int* 55, 1198–1216.

Homburg, C.H., and Roos, D. (1996). Apoptosis of neutrophils. *Curr Opin Hematol* 3, 94–99.

Huang, Y., Wongamorntham, S., Kasting, J., McQuillan, D., Owens, R.T., Yu, L., Noble, N.A., and Border, W. (2006). Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int* 69, 105–113.

Huen, S.C., and Cantley, L.G. (2015). Macrophage-mediated injury and repair after ischemic kidney injury. *Pediatr Nephrol* 30, 199–209.

Humphreys, B.D., Lin, S.-L., Kobayashi, A., Hudson, T.E., Nowlin, B.T., Bonventre, J.V., Valerius, M.T., McMahon, A.P., and Duffield, J.S. (2010). Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 176, 85–97.

Imig, J.D., and Ryan, M.J. (2013). Immune and inflammatory role in renal disease. *Compr Physiol* 3, 957–976.

Inaba, A., Tuong, Z.K., Riding, A.M., Mathews, R.J., Martin, J.L., Saeb-Parsy, K., and Clatworthy, M.R. (2020). B Lymphocyte-Derived CCL7 Augments Neutrophil and Monocyte Recruitment, Exacerbating Acute Kidney Injury. *J Immunol* 205, 1376–1384.

Isaka, Y., Fujiwara, Y., Ueda, N., Kaneda, Y., Kamada, T., and Imai, E. (1993). Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* 92, 2597–2601.

Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., et al. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 313–322.

Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., and Neilson, E.G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110, 341–350.

Jaramillo, M.C., and Zhang, D.D. (2013). The emerging role of the Nrf2–Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev* 27, 2179–2191.

Johnson, T.S., El-Koraie, A.F., Skill, N.J., Baddour, N.M., El Nahas, A.M., Njiloma, M., Adam, A.G., and Griffin, M. (2003). Tissue transglutaminase and the progression of human renal scarring. *J Am Soc Nephrol* 14, 2052–2062.

Juillerat-Jeanneret, L. (2020). The Other Angiotensin II Receptor: AT2R as a Therapeutic Target. *J Med Chem* 63, 1978–1995.

Kim, S., Kim, S.J., Yoon, H.E., Chung, S., Choi, B.S., Park, C.W., and Shin, S.J. (2015). Fimasartan, a Novel Angiotensin-Receptor Blocker, Protects against Renal Inflammation and Fibrosis in Mice with Unilateral Ureteral Obstruction: the Possible Role of Nrf2. *Int J Med Sci* 12, 891–904.

Kirkman, H.N., Rolfo, M., Ferraris, A.M., and Gaetani, G.F. (1999). Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem* 274, 13908–13914.

Kitada, M., Kume, S., Imaizumi, N., and Koya, D. (2011). Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-independent pathway. *Diabetes* 60, 634–643.

Kitagawa, K., Wada, T., Furuichi, K., Hashimoto, H., Ishiwata, Y., Asano, M., Takeya, M., Kuziel, W.A., Matsushima, K., Mukaida, N., et al. (2004). Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am J Pathol* 165, 237–246.

Kitamoto, K., Machida, Y., Uchida, J., Izumi, Y., Shiota, M., Nakao, T., Iwao, H., Yukimura, T., Nakatani, T., and Miura, K. (2009). Effects of liposome clodronate on renal leukocyte populations and renal fibrosis in murine obstructive nephropathy. *J Pharmacol Sci* 111, 285–292.

Klahr, S., Ishidoya, S., and Morrissey, J. (1995). Role of angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis* 26, 141–146.

Ko, G.J., Boo, C.-S., Jo, S.-K., Cho, W.Y., and Kim, H.K. (2008). Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 23, 842–852.

Köhle, C., and Bock, K.W. (2006). Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 72, 795–805.

Kriz, W., Hackenthal, E., Nobiling, R., Sakai, T., Elger, M., and Hähnel, B. (1994). A role for podocytes to counteract capillary wall distension. *Kidney Int* 45, 369–376.

Kuppe, C., Ibrahim, M.M., Kranz, J., Zhang, X., Ziegler, S., Perales-Patón, J., Jansen, J., Reimer, K.C., Smith, J.R., Dobie, R., et al. (2021). Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis. *Nature* 589, 281–286.

Kurts, C., Ginhoux, F., and Panzer, U. (2020). Kidney dendritic cells: fundamental biology and functional roles in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 16, 391–407.

Lampi, M.C., and Reinhart-King, C.A. (2018). Targeting extracellular matrix stiffness to attenuate disease: From molecular mechanisms to clinical trials. *Sci Transl Med* 10.

Larosa, D.F., and Orange, J.S. (2008). 1. Lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 121, S364–369; quiz S412.

Lavergne, R. (2016). Tisaneurs et plantes médicinales indigènes à la Réunion (Livry Gargan: Orphie).

- Leahy, D.J. (1995). A structural view of CD4 and CD8. *FASEB J* 9, 17–25.
- LeBleu, V.S., Taduri, G., O’Connell, J., Teng, Y., Cooke, V.G., Woda, C., Sugimoto, H., and Kalluri, R. (2013). Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* 19, 1047–1053.
- Lemley, K.V., and Kriz, W. (1991). Anatomy of the renal interstitium. *Kidney Int* 39, 370–381.
- Levey, A.S., de Jong, P.E., Coresh, J., El Nahas, M., Astor, B.C., Matsushita, K., Gansevoort, R.T., Kasiske, B.L., and Eckardt, K.-U. (2011). The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int* 80, 17–28.
- Levey, A.S., Eckardt, K.-U., Dorman, N.M., Christiansen, S.L., Hoorn, E.J., Ingelfinger, J.R., Inker, L.A., Levin, A., Mehrotra, R., Palevsky, P.M., et al. (2020). Nomenclature for kidney function and disease: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. *Kidney Int* 97, 1117–1129.
- Levin, A., and Stevens, P.E. (2014). Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. *Kidney International* 85, 49–61.
- Liu, Y. (2004). Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 15, 1–12.
- Liu, F., Wang, L., Qi, H., Wang, J., Wang, Y., Jiang, W., Xu, L., Liu, N., and Zhuang, S. (2017). Nintedanib, a triple tyrosine kinase inhibitor, attenuates renal fibrosis in chronic kidney disease. *Clin Sci (Lond)* 131, 2125–2143.
- Liu, S.B., Ikenaga, N., Peng, Z.-W., Sverdlov, D.Y., Greenstein, A., Smith, V., Schuppan, D., and Popov, Y. (2016). Lysyl oxidase activity contributes to collagen stabilization during liver fibrosis progression and limits spontaneous fibrosis reversal in mice. *FASEB J* 30, 1599–1609.
- López-Casillas, F., Payne, H.M., Andres, J.L., and Massagué, J. (1994). Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 124, 557–568.
- Lovisa, S., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2016). Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis. *Trends Endocrinol Metab* 27, 681–695.
- Lushchak, V.I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 224, 164–175.
- Mack, M., and Yanagita, M. (2015). Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis. *Kidney Int* 87, 297–307.
- Magyar, K., Halmosi, R., Palfi, A., Feher, G., Czopf, L., Fulop, A., Battyany, I., Sumegi, B., Toth, K., and Szabados, E. (2012). Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 50, 179–187.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79, 727–747.



- Marimoutou, M., Le Sage, F., Smadja, J., Lefebvre d'Hellencourt, C., Gonthier, M.-P., and 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismutase and NF- $\kappa$ B genes. *J Inflamm (Lond)* 12, 10.
- Marín, L., Miguélez, E.M., Villar, C.J., and Lombó, F. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int* 2015, 905215.
- Massagué, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 169–178.
- Masszi, A., Di Ciano, C., Sirokmány, G., Arthur, W.T., Rotstein, O.D., Wang, J., McCulloch, C.A.G., Rosivall, L., Mucsi, I., and Kapus, A. (2003). Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F911-924.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991–1045.
- Mayadas, T.N., Cullere, X., and Lowell, C.A. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* 9, 181–218.
- McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocypretein. *J Biol Chem* 244, 6049–6055.
- McKenzie, L.M., Hendrickson, S.L., Briggs, W.A., Dart, R.A., Korbet, S.M., Mokrzycki, M.H., Kimmel, P.L., Ahuja, T.S., Berns, J.S., Simon, E.E., et al. (2007). NPHS2 variation in sporadic focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 18, 2987–2995.
- McMahon, A.P. (2016). Development of the Mammalian Kidney. *Curr Top Dev Biol* 117, 31–64.
- Mellman, I., and Steinman, R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255–258.
- Meng, X.-M., Wang, S., Huang, X.-R., Yang, C., Xiao, J., Zhang, Y., To, K.-F., Nikolic-Paterson, D.J., and Lan, H.-Y. (2016a). Inflammatory macrophages can transdifferentiate into myofibroblasts during renal fibrosis. *Cell Death Dis* 7, e2495.
- Meng, X.-M., Nikolic-Paterson, D.J., and Lan, H.Y. (2016b). TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 12, 325–338.
- Meran, S., and Steadman, R. (2011). Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol* 92, 158–167.
- Mezzano, S.A., Ruiz-Ortega, M., and Egido, J. (2001). Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38, 635–638.
- Moses, H.L., Roberts, A.B., and Derynck, R. (2016). The Discovery and Early Days of TGF- $\beta$ : A Historical Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.

- Munshi, M.K., Uddin, M.N., and Glaser, S.S. (2011). The role of the renin-angiotensin system in liver fibrosis. *Exp Biol Med (Maywood)* 236, 557–566.
- Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11, 723–737.
- Nath, K.A. (1992). Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis* 20, 1–17.
- Navarro-González, J.F., Mora-Fernández, C., Muros de Fuentes, M., and García-Pérez, J. (2011). Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 7, 327–340.
- Nguyen, G.T., Green, E.R., and Mecsas, J. (2017). Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 373.
- Nguyen Dinh Cat, A., Montezano, A.C., Burger, D., and Touyz, R.M. (2013). Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature. *Antioxid Redox Signal* 19, 1110–1120.
- Nortier, J., Pozdzik, A., Roumeguere, T., and Vanherweghem, J.-L. (2015). [Aristolochic acid nephropathy (“Chinese herb nephropathy”)]. *Nephrol Ther* 11, 574–588.
- Nyengaard, J.R., and Bendtsen, T.F. (1992). Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec* 232, 194–201.
- Patel, S., Rauf, A., Khan, H., and Abu-Izneid, T. (2017). Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother* 94, 317–325.
- Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., and Scalbert, A. (2010). Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4959–4969.
- Perron, N.R., and Brumaghim, J.L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* 53, 75–100.
- Poggio, E.D., Wang, X., Greene, T., Van Lente, F., and Hall, P.M. (2005). Performance of the modification of diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations in the estimation of GFR in health and in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 16, 459–466.
- Poullain, C., Girard-Valenciennes, E., and Smadja, J. (2004). Plants from reunion island: evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities. *J Ethnopharmacol* 95, 19–26.
- Rastaldi, M.P., Ferrario, F., Giardino, L., Dell’Antonio, G., Grillo, C., Grillo, P., Strutz, F., Müller, G.A., Colasanti, G., and D’Amico, G. (2002). Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int* 62, 137–146.
- Ricardo, S.D., van Goor, H., and Eddy, A.A. (2008). Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 118, 3522–3530.

- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933–956.
- Richeldi, L., du Bois, R.M., Raghu, G., Azuma, A., Brown, K.K., Costabel, U., Cottin, V., Flaherty, K.R., Hansell, D.M., Inoue, Y., et al. (2014). Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 370, 2071–2082.
- Robertson, I.B., Horiguchi, M., Zilberberg, L., Dabovic, B., Hadjiolova, K., and Rifkin, D.B. (2015). Latent TGF- $\beta$ -binding proteins. *Matrix Biol* 47, 44–53.
- Rossetti, S., Burton, S., Strmecki, L., Pond, G.R., San Millán, J.L., Zerres, K., Barratt, T.M., Ozen, S., Torres, V.E., Bergstralh, E.J., et al. (2002). The position of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene mutation correlates with the severity of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13, 1230–1237.
- Ruiz-Ortega, M., Rupérez, M., Esteban, V., Rodríguez-Vita, J., Sánchez-López, E., Carvajal, G., and Egido, J. (2006). Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* 21, 16–20.
- Saldanha, J.F., Leal, V.O., Rizzetto, F., Grimmer, G.H., Ribeiro-Alves, M., Daleprane, J.B., Carraro-Eduardo, J.C., and Mafra, D. (2016). Effects of Resveratrol Supplementation in Nrf2 and NF- $\kappa$ B Expressions in Nondialyzed Chronic Kidney Disease Patients: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Clinical Trial. *J Ren Nutr* 26, 401–406.
- Sato, M., Muragaki, Y., Saika, S., Roberts, A.B., and Ooshima, A. (2003). Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest* 112, 1486–1494.
- Scalbert, A., and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073S–85S.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45, 287–306.
- Schainuck, L.I., Striker, G.E., Cutler, R.E., and Benditt, E.P. (1970). Structural-functional correlations in renal disease. II. The correlations. *Hum Pathol* 1, 631–641.
- Schreiner, G.E., and Maher, J.F. (1965). TOXIC NEPHROPATHY. *Am J Med* 38, 409–449.
- Sean Eardley, K., and Cockwell, P. (2005). Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. *Kidney Int* 68, 437–455.
- Sharma, K., Ix, J.H., Mathew, A.V., Cho, M., Pflueger, A., Dunn, S.R., Francos, B., Sharma, S., Falkner, B., McGowan, T.A., et al. (2011). Pirfenidone for Diabetic Nephropathy. *JASN* 22, 1144–1151.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 4, 180–183.
- Simões e Silva, A.C., Valério, F.C., Vasconcelos, M.A., Miranda, D.M., and Oliveira, E.A. (2013). Interactions between Cytokines, Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract and Chronic Kidney Disease. *Clin Dev Immunol* 2013.

- Singh, R., Barden, A., Mori, T., and Beilin, L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44, 129–146.
- Smith-Mungo, L.I., and Kagan, H.M. (1998). Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol* 16, 387–398.
- Souma, T., Suzuki, N., and Yamamoto, M. (2015). Renal erythropoietin-producing cells in health and disease. *Front Physiol* 6, 167.
- Stewart, B.J., Ferdinand, J.R., Young, M.D., Mitchell, T.J., Loudon, K.W., Riding, A.M., Richoz, N., Frazer, G.L., Staniforth, J.U.L., Braga, F.A.V., et al. (2019). Spatiotemporal immune zonation of the human kidney. *Science* 365, 1461–1466.
- Strutz, F., and Zeisberg, M. (2006). Renal Fibroblasts and Myofibroblasts in Chronic Kidney Disease. *JASN* 17, 2992–2998.
- Subramanya, A.R., and Ellison, D.H. (2014). Distal convoluted tubule. *Clin J Am Soc Nephrol* 9, 2147–2163.
- Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L., and Glimcher, L.H. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 21, 713–758.
- Tan, R.J., Zhou, D., Zhou, L., and Liu, Y. (2014). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and kidney fibrosis. *Kidney Int Suppl* (2011) 4, 84–90.
- Tang, P.M.-K., Nikolic-Paterson, D.J., and Lan, H.-Y. (2019). Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 15, 144–158.
- Tissandié, E., Guéguen, Y., Lobaccaro, J.-M.A., Aigueperse, J., and Souidi, M. (2006). [Vitamin D: metabolism, regulation and associated diseases]. *Med Sci (Paris)* 22, 1095–1100.
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 349–363.
- Trachtman, H., Fervenza, F.C., Gipson, D.S., Heering, P., Jayne, D.R.W., Peters, H., Rota, S., Remuzzi, G., Rump, L.C., Sellin, L.K., et al. (2011). A phase 1, single-dose study of fresolimumab, an anti-TGF- $\beta$  antibody, in treatment-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 79, 1236–1243.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2, 1231–1246.
- V, W.-S., M, F., T, N.K., C, C.-B., At, N., S, C., Jm, D., P, J., T, D., and B, D.-L. (1998). Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161.
- Van Vleet, T.R., and Schnellmann, R.G. (2003). Toxic nephropathy: environmental chemicals. *Semin Nephrol* 23, 500–508.
- Vincenti, F., Fervenza, F.C., Campbell, K.N., Diaz, M., Gesualdo, L., Nelson, P., Praga, M., Radhakrishnan, J., Sellin, L., Singh, A., et al. (2017). A Phase 2, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study of Fresolimumab in Patients With Steroid-Resistant Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney Int Rep* 2, 800–810.

- Vlassara, H., and Palace, M.R. (2002). Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med* 251, 87–101.
- Vodošek Hojs, N., Bevc, S., Ekart, R., and Hojs, R. (2020). Oxidative Stress Markers in Chronic Kidney Disease with Emphasis on Diabetic Nephropathy. *Antioxidants (Basel)* 9.
- Wada, J., and Makino, H. (2013). Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)* 124, 139–152.
- Wang, S., Meng, X.-M., Ng, Y.-Y., Ma, F.Y., Zhou, S., Zhang, Y., Yang, C., Huang, X.-R., Xiao, J., Wang, Y.-Y., et al. (2015a). TGF- $\beta$ /Smad3 signalling regulates the transition of bone marrow-derived macrophages into myofibroblasts during tissue fibrosis. *Oncotarget* 7, 8809–8822.
- Wang, X., Li, D., Fan, L., Xiao, Q., Zuo, H., and Li, Z. (2017a). CAPE-pNO<sub>2</sub> ameliorated diabetic nephropathy through regulating the Akt/NF- $\kappa$ B/ iNOS pathway in STZ-induced diabetic mice. *Oncotarget* 8, 114506–114525.
- Wang, Y., Wang, B., Du, F., Su, X., Sun, G., Zhou, G., Bian, X., and Liu, N. (2015b). Epigallocatechin-3-gallate attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal interstitial fibrosis in mice. *J Histochem Cytochem* 63, 270–279.
- Wang, Y.-Y., Jiang, H., Pan, J., Huang, X.-R., Wang, Y.-C., Huang, H.-F., To, K.-F., Nikolic-Paterson, D.J., Lan, H.-Y., and Chen, J.-H. (2017b). Macrophage-to-Myofibroblast Transition Contributes to Interstitial Fibrosis in Chronic Renal Allograft Injury. *J Am Soc Nephrol* 28, 2053–2067.
- Weiskirchen, R., Weiskirchen, S., and Tacke, F. (2019). Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Mol Aspects Med* 65, 2–15.
- Wilkinson, H.N., and Hardman, M.J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol* 10, 200223.
- Wolf, G. (1998). Link between angiotensin II and TGF-beta in the kidney. *Miner Electrolyte Metab* 24, 174–180.
- Wuyts, W.A., Agostini, C., Antoniou, K.M., Bouros, D., Chambers, R.C., Cottin, V., Egan, J.J., Lambrecht, B.N., Lories, R., Parfrey, H., et al. (2013). The pathogenesis of pulmonary fibrosis: a moving target. *European Respiratory Journal* 41, 1207–1218.
- Yang, J., and Liu, Y. (2001). Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 159, 1465–1475.
- Yang, B., Xie, Y., Guo, M., Rosner, M.H., Yang, H., and Ronco, C. (2018). Nephrotoxicity and Chinese Herbal Medicine. *Clin J Am Soc Nephrol* 13, 1605–1611.
- Yang, L., Besschetnova, T.Y., Brooks, C.R., Shah, J.V., and Bonventre, J.V. (2010). Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med* 16, 535–543, 1p following 143.
- Yuan, Q., Tan, R.J., and Liu, Y. (2019). Myofibroblast in Kidney Fibrosis: Origin, Activation, and Regulation. *Adv Exp Med Biol* 1165, 253–283.

- Zamora-Ros, R., Knaze, V., Rothwell, J.A., Hémon, B., Moskal, A., Overvad, K., Tjønneland, A., Kyrø, C., Fagherazzi, G., Boutron-Ruault, M.-C., et al. (2016). Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Nutr* 55, 1359–1375.
- de Zeeuw, D., Bekker, P., Henkel, E., Hasslacher, C., Gouni-Berthold, I., Mehling, H., Potarca, A., Tesar, V., Heerspink, H.J.L., Schall, T.J., et al. (2015). The effect of CCR2 inhibitor CCX140-B on residual albuminuria in patients with type 2 diabetes and nephropathy: a randomised trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 3, 687–696.
- Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2015). Physiology of the Renal Interstitium. *Clin J Am Soc Nephrol* 10, 1831–1840.
- Zeisberg, M., and Neilson, E.G. (2010). Mechanisms of Tubulointerstitial Fibrosis. *JASN* 21, 1819–1834.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S.E., Sugimoto, H., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2008). Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 19, 2282–2287.
- Zeisberg, M., Strutz, F., and Müller, G.A. (2001). Renal fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10, 315–320.
- Zeisberg, M., Shah, A.A., and Kalluri, R. (2005). Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem* 280, 8094–8100.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J., and Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33, 337–349.
- Zhang, Y.E. (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 19, 128–139.
- Zhang, S., Qin, C., and Safe, S.H. (2003). Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect* 111, 1877–1882.
- Zhang, X.L., Selbi, W., de la Motte, C., Hascall, V., and Phillips, A.O. (2005). Bone morphogenic protein-7 inhibits monocyte-stimulated TGF-beta1 generation in renal proximal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 16, 79–89.
- Zhuo, J.L., and Li, X.C. (2013). Proximal nephron. *Compr Physiol* 3, 1079–1123.

# ANNEXES





1. **Antioxidants (Basel)**. 2020 May 12;9(5):415. doi: 10.3390/antiox9050415.

## **Antirhea borbonica Aqueous Extract Protects Albumin and Erythrocytes from Glycoxidative Damages.**

Delveaux J, Turpin C, **Veeran B**, Diotel N, Bravo SB, Begue F, Álvarez E, Meilhac O, Bourdon E, Rondeau P.

### **Abstract 1**

Diabetes constitutes a major health problem associated with severe complications. In hyperglycemic conditions, chronically increased oxidation and glycation of circulating components lead to advanced glycation end-products (AGEs) formation, a key contributor in diabetes complication progression. In line with literature documenting the beneficial properties of herbal teas, this study evaluates the antioxidant/glycant properties of *Antirhea borbonica* (Ab). Ab aqueous extract effects were tested on human albumin or erythrocytes submitted to methyl glyoxal-mediated glycoxidative damages. By using mass spectrometry, Ab aqueous extracts revealed to be rich in polyphenols. All tested biomarkers of oxidation and glycation, such as AGE, ketoamine, oxidized thiol groups, were decreased in albumin when glycated in the presence of Ab aqueous extract. Ab extract preserve erythrocyte from methylglyoxal (MGO)-induced damages in terms of restored membrane deformability, reduced oxidative stress and eryptosis phenomenon. Antioxidant capacities of Ab extract on erythrocytes were retrieved in vivo in zebrafish previously infused with MGO. These results bring new evidences on the deleterious impacts of glycation on albumin and erythrocyte in diabetes. Furthermore, it reveals antioxidant and antiglycant properties of Ab that could be used for the dietary modulation of oxidative stress and glycation in hyperglycemic situations. DOI: 10.3390/antiox9050415 PMID: 32408712

2. **Sci Rep.** 2020 Sep 2;10(1):14496. doi: 10.1038/s41598-020-71402-2.

## **Impaired brain homeostasis and neurogenesis in diet-induced overweight zebrafish: a preventive role from *A. borbonica* extract.**

Ghaddar B, **Veeran B**, Rondeau P, Bringart M, Lefebvre d'Hellencourt C, Meilhac O, Bascands JL, Diotel N.

### **Abstract 2**

Overweight and obesity are worldwide health concerns leading to many physiological disorders. Recent data highlighted their deleterious effects on brain homeostasis and plasticity, but the mechanisms underlying such disruptions are still not well understood. In this study, we developed and characterized a fast and reliable diet-induced overweight (DIO) model in zebrafish, for (1) studying the effects of overfeeding on brain homeostasis and for (2) testing different preventive and/or therapeutic strategies. By overfeeding zebrafish for 4 weeks, we report the disruption of many metabolic parameters reproducing human overweight features including increased body weight, body mass index, fasting blood glucose levels and liver steatosis. Furthermore, DIO fish displayed blood-brain barrier leakage, cerebral oxidative stress, neuroinflammation and decreased neurogenesis. Finally, we investigated the preventive beneficial effects of *A. borbonica*, an endogenous plant from Reunion Island. Overnight treatment with *A. borbonica* aqueous extract during the 4 weeks of overfeeding limited some detrimental central effects of DIO. In conclusion, we established a relevant DIO model in zebrafish demonstrating that overfeeding impairs peripheral and central homeostasis. This work also highlights the preventive protective effects of *A. borbonica* aqueous extracts in DIO, and opens a way to easily screen drugs aiming at limiting overweight and associated neurological disorders.

3. ACS Med Chem Lett. 2019 Apr 4;10(5):743-748.

doi: 10.1021/acsmchemlett.8b00643. eCollection 2019 May 9.

**Synthesis and Automated Labeling of [(18)F]Darapladib, a Lp-PLA(2) Ligand, as Potential PET Imaging Tool of Atherosclerosis.**

Guibbal F, Meneyrol V, Ait-Arsa, Diotel N, Patché J, **Veeran B**, Bénard S, Gimié F, Yong-Sang J, Khantaline I, Veerapen R, Jestin E, Meilhac O.

**Abstract 3**

Atherosclerosis and its associated clinical complications are major health issues in industrialized countries. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) was demonstrated to play an important role in atherogenesis and to be a potential risk prediction factor of plaque rupture. Darapladib is one of the most potent Lp-PLA2 inhibitors with an IC50 of 0.25 nM. Using its affinity for Lp-PLA2, we describe herein the total synthesis of darapladib radiolabeling precursor and the automated radiolabeling process for positron emission tomography (PET) imaging via an arylboronate moiety. The tracer thus obtained was tested in a mouse model of atherosclerosis (ApoE KO) and compared with the widely used [18F]fluorodeoxyglucose ([18F]FDG) PET tracer, known to label metabolically active cells. [18F]Darapladib showed a significant accumulation within mice aortic atheromatous plaques dissected out ex vivo compared to [18F]FDG. Incubation of the radiotracer with human carotid samples showed a strong accumulation within the atherosclerotic plaques and supports its potential for use in PET imaging.

**4. Free Radic Res. 2019** Feb;53(2):150-169. doi: 10.1080/10715762.2018.1529866. Epub 2019 Mar 1.

**Advanced glycation end-products disrupt human endothelial cells redox homeostasis: new insights into reactive oxygen species production.**

Dobi A, Bravo SB, Veeran B, Paradelo-Dobarro B, Álvarez E, Meilhac O, Viranaicken W, Baret P, Devin A(6), Rondeau P.

**Abstract. 4**

Advanced glycation end-products (AGEs) trigger multiple metabolic disorders in the vessel wall that may in turn lead to endothelial dysfunction. The molecular mechanisms by which AGEs generate these effects are not completely understood. Oxidative stress plays a key role in the development of deleterious effects that occur in endothelium during diabetes. Our main objectives were to further understand how AGEs contribute to reactive oxygen species (ROS) overproduction in endothelial cells and to evaluate the protective effect of an antioxidant plant extract. The human endothelial cell line EA.hy926 was treated with native or modified bovine serum albumin (respectively BSA and BSA-AGEs). To monitor free radicals formation, we used H<sub>2</sub>DCF-DA, dihydroethidium (DHE), DAF-FM-DA and MitoSOX Red dyes. To investigate potential sources of ROS, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and mitochondrial inhibitors were used. The regulation of different types of ROS by the polyphenol-rich extract from the medicinal plant *Doratoxylon apetalum* was also studied for a therapeutic perspective. BSA-AGEs exhibited not only less antioxidant properties than BSA, but also pro-oxidant effects. The degree of albumin glycoxidation directly influenced oxidative stress through a possible communication between NADPH oxidase and mitochondria. *D. apetalum* significantly decreased intracellular hydrogen peroxide and superoxide anions mainly detected by H<sub>2</sub>DCF-DA and DHE respectively. Our results suggest that BSA-AGEs promote a marked oxidative stress mediated at least by NADPH oxidase and mitochondria. *D. apetalum* plant extract appeared to be an effective antioxidant compound to protect endothelial cells.

5. **Mol Nutr Food Res.** 2020 Jul;64(13):e1900779. doi: 10.1002/mnfr.201900779. Epub 2020 Jun 16.

**Protective Effects of Antioxidant Polyphenols against Hyperglycemia-Mediated Alterations in Cerebral Endothelial Cells and a Mouse Stroke Model.**

Arcambal, Tailé J, Couret D, Planesse C, **Veeran B**, Diotel N, Gauvin-Bialecki A, Meilhac O, Gonthier MP.

**SCOPE:** Hyperglycemia alters cerebral endothelial cell and blood-brain barrier functions, aggravating cerebrovascular complications such as stroke during diabetes. Redox and inflammatory changes play a causal role. This study evaluates polyphenol protective effects in cerebral endothelial cells and a mouse stroke model during hyperglycemia. **METHODS AND RESULTS:** Murine bEnd.3 cerebral endothelial cells and a mouse stroke model are exposed to a characterized, polyphenol-rich extract of *Antirhea borbonica* or its predominant constituent caffeic acid, during hyperglycemia. Polyphenol effects on redox, inflammatory and vasoactive markers, infarct volume, and hemorrhagic transformation are determined. In vitro, polyphenols improve reactive oxygen species levels, Cu/Zn superoxide dismutase activity, and both NAPDH oxidase 4 and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) gene expression deregulated by high glucose. Polyphenols reduce Nrf2 nuclear translocation and counteract nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6 secretion, and the altered production of vasoactive markers mediated by high glucose. In vivo, polyphenols reduce cerebral infarct volume and hemorrhagic transformation aggravated by hyperglycemia. Polyphenols attenuate redox changes, increase vascular endothelial-Cadherin production, and decrease neuro-inflammation in the infarcted hemisphere. **CONCLUSION:** Polyphenols protect against hyperglycemia-mediated alterations in cerebral endothelial cells and a mouse stroke model. It is relevant to assess polyphenol benefits to improve cerebrovascular damages during diabetes.

6. **Sci Rep.** 2021 Jan 27;11(1):2291. doi: 10.1038/s41598-021-81638-1.

## **Altered high-density lipoprotein composition and functions during severe COVID-19.**

Begue F, Tanaka S, Mouktadi Z, Rondeau P, **Veeren B**, Diotel N, Tran-Dinh A, Robert T, Vélia E, Mavingui P, Lagrange-Xélot M, Montravers P, Couret D, Meilhac O.

### **Abstract. 6**

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic is affecting millions of patients worldwide. The consequences of initial exposure to SARS-CoV-2 go beyond pulmonary damage, with a particular impact on lipid metabolism. Decreased levels in HDL-C were reported in COVID-19 patients. Since HDL particles display antioxidant, anti-inflammatory and potential anti-infectious properties, we aimed at characterizing HDL proteome and functionality during COVID-19 relative to healthy subjects. HDLs were isolated from plasma of 8 severe COVID-19 patients sampled at admission to intensive care unit (Day 1, D1) at D3 and D7, and from 16 sex- and age-matched healthy subjects. Proteomic analysis was performed by LC-MS/MS. The relative amounts of proteins identified in HDLs were compared between COVID-19 and controls. apolipoprotein A-I and paraoxonase 1 were confirmed by Western-blot analysis to be less abundant in COVID-19 versus controls, whereas serum amyloid A and alpha-1 antitrypsin were higher. HDLs from patients were less protective in endothelial cells stimulated by TNF $\alpha$  (permeability, VE-cadherin disorganization and apoptosis). In these conditions, HDL inhibition of apoptosis was blunted in COVID-19 relative to controls. In conclusion, we show major changes in HDL proteome and decreased functionality in severe COVID-19 patients.

7. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 30;22(3):1385. doi: 10.3390/ijms22031385.

**Hyperglycemic Condition Causes Pro-Inflammatory and Permeability Alterations Associated with Monocyte Recruitment and Deregulated NF $\kappa$ B/PPAR $\gamma$  Pathways on Cerebral Endothelial Cells: Evidence for Polyphenols Uptake and Protective Effect.**

Tailé J, Patché J, Veeran B, Gonthier MP.

**Abstract. 7**

Hyperglycemia alters the function of cerebral endothelial cells from the blood-brain barrier, increasing the risk of cerebrovascular complications during diabetes. This study evaluated the protective effect of polyphenols on inflammatory and permeability markers on bEnd3 cerebral endothelial cells exposed to high glucose concentration. Results show that hyperglycemic condition increased nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) activity, deregulated the expression of interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-10 (IL-10) and endothelial-leukocyte adhesion molecule (E-selectin) genes, raised MCP-1 secretion and elevated monocyte adhesion and transendothelial migration. High glucose decreased occludin, claudin-5, zona occludens-1 (ZO-1) and zona occludens-2 (ZO-2) tight junctions production and altered the endothelial permeability. Characterized polyphenolic extracts from the French medicinal plants *Antirhea borbonica*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa* and *Terminalia bentzoe*, and their major polyphenols quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids limited the pro-inflammatory and permeability alterations caused by high glucose. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) agonist also attenuated these damages while PPAR $\gamma$  antagonist aggravated them, suggesting PPAR $\gamma$  protective action. Interestingly, polyphenols improved PPAR $\gamma$  gene expression lowered by high glucose. Moreover, polyphenols were detected at the intracellular level or membrane-bound to cells, with evidence for breast cancer resistance protein (BCRP) efflux transporter role. Altogether, these findings emphasize the ability of polyphenols to protect cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition and their relevance for pharmacological strategies aiming to limit cerebrovascular disorders in diabetes.