



HAL
open science

Étude des altérations fonctionnelles des cellules endothéliales cérébrales en condition hyperglycémique associée au diabète : rôle protecteur des polyphénols de plantes médicinales

Janice Taïlé

► **To cite this version:**

Janice Taïlé. Étude des altérations fonctionnelles des cellules endothéliales cérébrales en condition hyperglycémique associée au diabète : rôle protecteur des polyphénols de plantes médicinales. Médecine humaine et pathologie. Université de la Réunion, 2021. Français. NNT : 2021LARE0001 . tel-03547907

HAL Id: tel-03547907

<https://theses.hal.science/tel-03547907v1>

Submitted on 29 Jan 2022

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.



UNION EUROPEENNE



UR | UNIVERSITÉ
DE LA RÉUNION

Inserm



Université de La Réunion

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de Docteur en Sciences de l'Université de La Réunion

Spécialité : Biologie Médicale Santé

Par

Janice TAÏLÉ

**Étude des altérations fonctionnelles des cellules endothéliales
cérébrales en condition hyperglycémique associée au diabète :
rôle protecteur des polyphénols de plantes médicinales**

Soutenance publique : le 29 Janvier 2021

Composition du Jury :

Mme. Christine MORAND	Directrice de Recherches INRAE, UMR 1019 Clermont-Auvergne	Rapporteur
Mr. Patrick POUCHERET	Maître de Conférences, HDR UMR 95, Faculté de Montpellier	Rapporteur
Mme. Sandrine DELBOSC	Chargée de Recherches INSERM, UMRS 1148, Paris	Examineur
Mr. Maxime COURNOT	Cardiologue, HDR Clinique les Orchidées de La Réunion	Examineur
Mr. Gilles LAMBERT	Professeur Université de La Réunion	Examineur
Mme. Marie-Paule GONTHIER	Professeur Université de La Réunion	Directrice de thèse

LETTRÉ D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

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

Fait à Saint-Denis le :

Signature :



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

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

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

En conséquence, chaque utilisateur doit :

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

La contrefaçon et le faux

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

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

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

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

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

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

« Dans la vie, rien n'est à craindre ...

... tout est à comprendre. »

Marie Curie

A mes parents.

Remerciements

Je souhaite témoigner mon plus grand respect et remercier Madame Christine Morand et Monsieur Patrick Poucheret de me faire l'honneur de juger et d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs. J'exprime également ma gratitude et mes sincères remerciements à Madame Sandrine Delbosc, Monsieur Maxime Cournot et Monsieur Gilles Lambert pour avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

J'adresse ma plus profonde reconnaissance, mon respect et mon affection à ma directrice de thèse, Madame Marie-Paule Gonthier, qui a cru en moi et qui m'a donnée l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci de m'avoir transmise tes nombreuses connaissances scientifiques et de m'avoir tant appris sur le plan professionnel que personnel. Merci pour ta présence, ta patience, ta rigueur scientifique et surtout ta bonne humeur, qui m'ont aidée à vivre pleinement cette thèse et à m'épanouir dans le monde de la recherche. Merci du fond du cœur pour tout.

Je remercie Monsieur Olivier Meilhac, directeur de l'Unité Mixte de Recherche 1188 Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DÉTROI), de m'avoir accueillie au laboratoire depuis mon stage de Master 1 jusqu'à ma thèse.

Je tiens également à remercier Anne Gauvin-Bialecki, directrice de l'Unité de Recherche 2212 CHEMBIOPRO pour m'avoir fourni la matière première végétale, sans laquelle ce travail de thèse n'aurait pu être possible.

Je remercie l'ensemble des institutions ayant financé cette thèse : la Région Réunion pour m'avoir accordée une bourse doctorale durant ces trois années de travail, ainsi que nos tutelles, l'Université de La Réunion et l'INSERM.

J'adresse mes profonds remerciements à Matthieu, David, Cynthia, Jessica, Steeve, Philippe et Bryan pour leur précieuse aide technique et scientifique durant cette thèse. Merci également à Madame Pascale K-T pour m'avoir généreusement donnée des cellules THP-1.

J'adresse mes sincères remerciements à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer de DÉTROI, PIMIT et CYROI. Merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur. Merci, plus particulièrement aux membres de la Nutriteam, à Angélique, Jessica, Bénédicte et Jennyfer, pour nos petits moments de complicité entre filles, votre sourire et votre douce amitié.

Je remercie également mes amis et mes copines du foot pour leur soutien, leur amitié et tous les bons moments que nous avons partagés ensemble.

Un grand merci à Dydie qui m'a toujours encouragée et motivée en tout temps. Merci pour ta merveilleuse amitié, merci de faire partie de ma vie.

Merci beaucoup Aurely pour ton précieux soutien durant cette rédaction de thèse... tu es l'une de mes plus belles rencontres.

J'adresse ma plus sincère gratitude à ma famille, mon frère, ma belle-sœur, ma filleule et mes parents. Merci pour votre amour, votre respect, votre présence et votre soutien quotidien.

A vous mes parents, mes piliers, ceux qui ont fait de moi celle que je suis et que je ne pourrai jamais assez remercier, c'est à vous que je dédie ma thèse. Ma plus belle récompense est de voir la fierté dans vos yeux et le sourire sur vos lèvres.

A toi Mickaël, celui qui partage ma vie, celui qui m'a toujours soutenue à chaque épreuve difficile de la thèse et de la vie, et qui a toujours su trouver les mots justes pour me redonner confiance en moi, merci pour ta présence et ton amour sans faille.

Une très grande pensée à mes beaux-parents.

Sommaire

RESUME	9
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	10
LISTE DES ABREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES	18
LISTE DES TABLEAUX	20
I. INTRODUCTION	21
II. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	23
1. LA PATHOLOGIE DIABETIQUE	23
1.1. Définition	23
1.2. La régulation de la glycémie	23
1.3. Les différents types de diabète et leur prévalence	26
1.3.1. <i>Le diabète de type 1</i>	26
1.3.2. <i>Le diabète de type 2</i>	27
1.3.3. <i>Le diabète gestationnel</i>	29
1.3.4. <i>Le diabète MODY</i>	29
1.4. Les données épidémiologiques de la pathologie diabétique	29
1.4.1. <i>La prévalence du diabète dans le monde</i>	29
1.4.2. <i>La prévalence du diabète en France métropolitaine</i>	31
1.4.3. <i>La prévalence du diabète à La Réunion</i>	31
1.5. Le dépistage du diabète	32
1.6. Les facteurs de risque associés à la pathologie diabétique	33
1.7. Les complications et conséquences associées à la pathologie diabétique	34
1.7.1. <i>Les complications microvasculaires</i>	35
1.7.2. <i>Les complications macrovasculaires</i>	37
2. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	45
2.1. Les étapes de formation et de développement de la BHE	48
2.2.1. <i>Les cellules endothéliales cérébrales</i>	51
2.2.2. <i>Les péricytes</i>	52
2.2.3. <i>La MEC</i>	53
2.2.4. <i>Les astrocytes</i>	54
2.2.5. <i>Les neurones</i>	55
2.2.6. <i>Les cellules immunitaires</i>	56
2.3. Le complexe jonctionnel	56

2.3.1.	<i>Les protéines des JA</i>	57
2.3.2.	<i>Les protéines des JS</i>	58
2.3.3.	<i>Régulation des JS</i>	60
2.4.	Les systèmes de transports au niveau de la BHE	61
2.4.1.	<i>Le transport passif</i>	61
2.4.2.	<i>Le transport actif via les pompes d'efflux</i>	64
2.5.	La production de molécules vasoactives	67
2.5.1.	<i>Les molécules vasodilatatrices majeures</i>	68
2.5.2.	<i>Les molécules vasoconstrictrices majeures</i>	74
2.6.	Dérégulations de l'endothélium associées au DT2	79
2.6.1.	<i>Le glucose</i>	79
2.6.2.	<i>L'impact de l'hyperglycémie sur l'endothélium</i>	79
2.6.3.	<i>L'impact de l'insulinorésistance sur l'endothélium</i>	83
3.	LE STRESS OXYDATIF	85
3.1.	Définition	85
3.2.	Les principaux radicaux libres	86
3.3.	Les différentes sources de radicaux libres	87
3.3.1.	<i>La chaîne respiratoire mitochondriale</i>	87
3.3.2.	<i>Les NADPH oxydases</i>	89
3.3.3.	<i>Le réticulum endoplasmique</i>	91
3.3.4.	<i>La xanthine oxydase</i>	92
3.3.5.	<i>Les NO synthases</i>	93
3.3.6.	<i>Les COXs</i>	93
3.3.7.	<i>Le tissu adipeux</i>	94
3.4.	Les mécanismes de défense antioxydante	95
3.4.1.	<i>Les antioxydants enzymatiques</i>	96
3.4.2.	<i>Les antioxydants non-enzymatiques</i>	99
3.4.3.	<i>Le facteur de transcription Nrf2</i>	100
3.5.	Impact du stress oxydatif sur le développement de l'insulinorésistance	102
3.4.	Dysfonctionnement endothélial	103
4.	LA REPONSE INFLAMMATOIRE	105
4.1.	Voies de signalisation impliquées dans le statut inflammatoire	107
4.1.1.	<i>NFκB</i>	107
4.1.2.	<i>AMPK</i>	109
4.1.3.	<i>La famille des PPARs</i>	111
4.1.4.	<i>La famille des PGC1</i>	113
4.2.	Cytokines et adipokines sécrétées durant l'inflammation	113
4.2.1.	<i>Les cytokines</i>	113
4.2.2.	<i>La leptine</i>	117
4.2.3.	<i>L'adiponectine</i>	118
4.3.	Le processus de transmigration des monocytes à travers la barrière endothéliale	120

4.4. L'impact du stress oxydatif et de l'inflammation associés à l'hyperglycémie sur la fonction endothéliale et la BHE.....	122
5. LES STRATEGIES DE LUTTE CONTRE LE DIABETE ET SES COMPLICATIONS	125
5.1. Approche nutritionnelle et sportive.....	125
5.2. Approche médicamenteuse	126
6. APPROCHE THERAPEUTIQUE BASEE SUR L'UTILISATION DES MOLECULES NATURELLES	130
6.1. Les polyphénols.....	130
6.1.1. <i>La structure et les différentes classes chimiques des polyphénols</i>	131
6.1.2. <i>La biodisponibilité des polyphénols</i>	137
6.1.4. <i>Les propriétés biologiques des polyphénols</i>	142
6.2. Les plantes médicinales issues de la biodiversité réunionnaise.....	148
6.2.1. <i>La biodiversité végétale de La Réunion</i>	148
6.2.2. <i>Plantes médicinales réunionnaises utilisées en Pharmacopée traditionnelle.....</i>	149
6.2.3. <i>Plantes médicinales réunionnaises inscrites à la Pharmacopée Française</i>	149
6.2.4. <i>Le protocole de Nagoya.....</i>	155
III. OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE	157
IV. APPROCHE EXPERIMENTALE.....	160
1. METHODOLOGIE GLOBALE.....	160
2. MODELES D'ETUDE	167
2.1. La lignée cellulaire bEnd3.....	167
2.2. La lignée cellulaire bEnd3-blue.....	168
2.3. La lignée cellulaire THP-1	169
2.4. Le modèle d'ischémie cérébrale chez la souris en condition hyperglycémique ...	170
2.5. Modèle d'hyperglycémie aiguë	172
2.6. Modèle d'hyperglycémie chronique.....	173
V. RESULTATS	175
VI. DISCUSSION.....	189
VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	204
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	208

Résumé

Au cours du diabète, l'hyperglycémie provoque des altérations du système vasculaire aggravant les complications cérébrovasculaires comme l'accident vasculaire cérébral. En effet, l'hyperglycémie altère l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique qui sépare le cerveau du compartiment sanguin. Les cellules endothéliales cérébrales qui composent cette barrière hémato-encéphalique sont particulièrement affectées par le stress oxydatif et l'état pro-inflammatoire engendrés par l'hyperglycémie. Dans ce contexte, un intérêt croissant est accordé aux effets santé des polyphénols d'origine végétale dotés de propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. L'objectif du travail de thèse était d'évaluer les altérations fonctionnelles des cellules endothéliales cérébrales en condition hyperglycémique et de déterminer le rôle protecteur des polyphénols extraits de plantes médicinales de La Réunion. Pour ce faire, nous avons développé un modèle de cellules endothéliales cérébrales murines exposées à une hyperglycémie expérimentale ainsi qu'un modèle de souris rendues obèses et diabétiques par un régime riche en graisses puis placées en situation d'ischémie cérébrale lors d'un accident vasculaire cérébral provoqué par occlusion de l'artère cérébrale moyenne. Les polyphénols testés ont été extraits de quatre plantes médicinales réunionnaises traditionnellement utilisées pour des effets antidiabétiques. Nos résultats ont montré que l'hyperglycémie a causé un stress oxydatif, une réponse pro-inflammatoire avec adhésion monocytaire et une dérégulation de la production de marqueurs vasoactifs des cellules endothéliales cérébrales. En situation d'ischémie cérébrale, l'hyperglycémie a aggravé le volume de l'infarctus cérébral et la transformation hémorragique chez les souris obèses et diabétiques. De plus, l'hyperglycémie a provoqué l'altération de marqueurs redox et d'intégrité de la barrière hémato-encéphalique, et a exacerbé la neuroinflammation. Plusieurs cibles moléculaires ont été identifiées dont les enzymes antioxydantes Cu/ZnSOD et MnSOD, les médiateurs inflammatoires de type IL-6, TNF- α , MCP-1 et E-sélectine, les facteurs vasoactifs ET-1, eNOS et NO ainsi que les jonctions serrées ZO-1, ZO-2, claudine-5 et occludine. Le rôle de voies de signalisation clés impliquant NF κ B, AMPK, Nrf2 et PPAR γ a été mis en évidence. De manière importante, les polyphénols ont exercé des effets antioxydants et anti-inflammatoires atténuant les altérations fonctionnelles des cellules endothéliales cérébrales et les complications cérébrovasculaires causées par l'hyperglycémie. Ces effets protecteurs des polyphénols ont été associés à leur détection au niveau cérébral et plasmatique ainsi que dans les cellules endothéliales cérébrales. En conclusion, ce travail de thèse a montré l'effet délétère de l'hyperglycémie sur la fonction endothéliale et le rôle protecteur des polyphénols. L'utilisation des modèles expérimentaux développés permettra d'approfondir l'exploration des mécanismes moléculaires impliqués et d'identifier de possibles cibles thérapeutiques innovantes.

Mots clés : Diabète de type 2, hyperglycémie, cellules endothéliales cérébrales, perméabilité, stress oxydatif, inflammation, polyphénols végétaux

Liste des publications et communications scientifiques

Publications dans des journaux à comité de lecture international

Arcambal A., **Taïlé J.**, Rondeau P., Viranaicken W., Meilhac O., Gonthier M-P.
Hyperglycemia modulates redox, inflammatory and vasoactive markers through specific signaling pathways in cerebral endothelial cells: Insights on insulin protective action. *Free Radical Biology and Medicine*, 130: 59-70 (2019).

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. *Molecular Nutrition & Food Research*, 64 (13) (2020).

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*, Vol. 9 (7), 573 (2020).

Taïlé J., Patché J., Veeren B., Gonthier M-P.
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. *International Journal of Molecular Sciences*, (Soumis).

Taïlé J., Bringart M., Planesse C., Patché J., Rondeau P., Veeren B., Gauvin-Bialecki A., Meilhac O., Bourane S., Couret D., Gonthier M-P.
Polyphenols improve cerebrovascular and metabolic disorders aggravated by high fat diet-induced obesity in a mouse stroke model via reduction of blood-brain barrier disruption, inflammation and oxidative stress. *Pharmacological Research*, (En préparation).

Communications orales

Taïlé J., Arcambal A., Meilhac O. and Gonthier M-P.

“Protective antioxidant effects of dietary polyphenols on cerebral endothelial cells during diabetes-related hyperglycemia.”

6^{ème} Rencontre Agroalimentaire QualiREG Océan Indien, Novembre 2017, Reduit, Maurice

Arcambal A., **Taïlé J.**, Bialecki A., Meilhac O. and Gonthier M-P.

“Protective antioxidant effects of polyphenols extracted from the French medicinal plant Antirhea borbonica on cerebral endothelial cells exposed to diabetes-related hyperglycemia.”

23rd International Conference on Herbal and Alternative Remedies for Diabetes & Endocrine Disorders, Novembre 2017, Bangkok, Thaïlande

Communications par affiches

Taïlé J., Arcambal A., Gauvin-Bialecki A., Gonthier M-P.

“Polyphenols improve redox, vasoactive and permeability markers in cerebral endothelial cells during diabetes-related hyperglycemia.”

9th International Conference on Polyphenols and Health, Novembre 2019, Kobe, Japon (Lauréate du Travel Award)

Taïlé J., Arcambal A., Couret D., Planesse C., Gauvin-Bialecki A., Meilhac O., Gonthier M-P.

“Protective effects of polyphenols on cerebral endothelial cells and a mouse stroke model during hyperglycemia.”

15^{ème} congrès annuel de la Nouvelle Société Francophone d’Athérosclérose, Juin 2019, Biarritz, France (Lauréate du Prix Poster)

Arcambal A., **Taïlé J.**, Couret D., Planesse C., Gonthier M-P.

“Polyphenols protect from the cerebrovascular damage of diabetes-related hyperglycemia in a stroke mouse model and cerebral endothelial cells.”

9th International Conference on Polyphenols and Health, Novembre 2019, Kobe, Japon

Arcambal A., **Taïlé J.**, Meilhac O. and Gonthier M-P.

“Protective effects of polyphenols extracted from Antirhea borbonica medicinal plant against hyperglycemia-induced oxidative stress on cerebral endothelial cells.”

8th International Conference on Polyphenols and Health, Octobre 2017, Québec, Canada

Liste des abréviations

- AA : Acide arachidonique
AAL : Acide- α -lipoïque
ABC : ATP-binding cassette
A. borbonica : *Antirhea borbonica*
ADNc : Acide desoxyribonucléique complémentaire
ADP : Adénosine diphosphate
ADPAPAM : Association pour le Développement, la défense et la promotion des Plantes à Parfums Aromatiques et Médicinales de La Réunion
AGE : Advanced glycation end products
AIT : Accident ischémique transitoire
Akt : PKB : Protein Kinase B
AMP : Adénosine monophosphate
AMPK : Adenosine monophosphate activated protein kinase
Ang-1 : Angiopoietine-1
Ang-I -II : Angiotensine-I -II
AOMI : Artériopathie oblitérante des membres inférieurs
APLAMEDOM : Association pour la protection des Plantes Aromatiques et Médicinales de l’Outre Mer – Réunion
AQP : Aquaporine
ARE : Antioxidant response element
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATCC : American type culture collection
ATP : Adénosine triphosphate
A. Triplinervis : *Ayapana triplinervis*
AVC : Accident vasculaire cérébral
- BCA : Bicinchoninic acid
BCRP : Breast cancer resistance protein
bEnd.3 : Brain endothelial cell 3
BH₄ : Tétrahydrobioptérine
BHE : Barrière hémato-encéphalique
- CAM : Cellular adhesion molecule
CAMK : Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase

CML : Cellules musculaires lisses

COX : Cyclooxygénase

CRP : Protéine C réactive

Cu/ZnSOD : Cuivre/zinc superoxide dismutase

DAF-FM : 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate

DAG : Diacylglycérol

DCFH-DA : 2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate

DID : Diabète insulino-dépendant

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

DNID : Diabète non-insulino-dépendant

DPP-4 : Dipeptidyl peptidase-4

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

DT1-2 : Diabète de type 1 ou 2

D. viscosa : *Dodonaea viscosa*

EDHF : Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor

EETs : Acides époxyeicosatriénoïques

EGCG : Epigallocatechine gallate

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

eNOS : Endothelial NO synthase

ER : Récepteur à l'oestrogène

E-selectin : Endothelial-leukocyte adhesion molecule

ET-1 : Endothéline-1

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FADH : Flavine adénine dinucléotide réduite

FID : Fédération internationale du diabète

FITC : Fluorescein isothiocyanate

FMN : Flavine mononucléotide

GAE : Gallic acid equivalent

GC : Guanylate cyclase

GFAP : Glial fibrillary acidic protein

GLP-1 : Glucagon-like peptide-1

GLUT : Glucose transporter

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

GPCR : G protein-coupled receptors
GPx : Glutathion peroxydase
GR : Glutathion réduit
GSH : Glutathion
GSK-3 : Glycogen synthase kinase 3
GSSG : Disulfure de glutathion

HbA1c : Hémoglobine glyquée
HBSS : Hanks' balanced salt solution
HFD : High fat diet
HG : Hyperglycémie
4-HNE : 4-Hydroxynonenal
HO-1 : Hème oxygenase-1

ICAM : Intercellular adhesion molecule
IKK : IK κ B kinase
IKB : Inhibitor of κ B
IL : Interleukin
IMC : Indice de masse corporelle
iNOS : Inducible NO synthase
IR : Insulin receptor
IRS : Insulin receptor substrate

JAM : Junctional adhesion molecules
JA : Jonction adhérente
JAK : Janus kinase
JNK : c-Jun N-terminal kinase
JS : Jonctions serrées

Keap-1 : Kelch-like ECH-associated protein 1

LDL : Lipoprotéine de basse densité
LDLox : Lipoprotéine de basse densité oxydée

MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1
MDA : Malondialdéhyde

MDR : Multi drug resistance
MEC : Matrice extracellulaire
MGO : Methylglyoxal
MMPs : Matrix metalloproteinases
MnSOD : Manganese superoxide dismutase
MODY : Maturity Onset Diabetes of the Young
MPO : Myélopéroxydase
MRP : Multi-drug resistance protein
MTT : 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

NADPH : Nicotinamide adénine dinucleotide
NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ND : Normal diet
NF κ B : Nuclear factor kappa B
NG : Normoglycémie
NO : Nitric oxide
NOS: NO synthase
nNOS: Neuronal NO synthase
Nox : NADPH oxidase
Nrf2 : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORS-OI : Observatoire Régional de la Santé-Océan Indien

PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1
PBS : Phosphate buffer saline
PDGFR- β : β -type platelet-derived growth factor receptor
PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PGE₂ : Prostaglandine
P-gp: P-glycoprotein
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PIP₂ : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP₃ : Phosphatidylinositol 3,4,5-bisphosphate
PKB : Protein kinase B
PKC : Protein kinase C
PLA₂ : Phospholipase A₂
PLC : Phospholipase C

PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

RE : Réticulum endoplasmique

REDIA : REunion DIAbète

RNS : Reactive nitrogen species

ROS : Reactive oxygen species

RPMI : Roswell park memorial institute medium

rt-PA : Activateur du plasminogène de type tissulaire recombinant

RT-qPCR : qPCR précédée d'une transcription inverse

SEAP : Secreted alkaline phosphatase

SGLT : Sodium-glucose linked transporter

SNC : Système nerveux central

SOD : Superoxide dismutase

T. bentzoe : *Terminalia bentzoe*

TEER : Transendothelial electrical resistance

TEM : Migration transendothéliale

TIMP : Tissue inhibitors of MMP

TNF- α : Tumor necrosis factor

t-PA : Activateur du plasminogène de type tissulaire

TXA : Thromboxane

UCP : Uncoupling protein

UPLC-MS : Ultra high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry

VCAM : Vascular cell adhesion molecule

VE-cadhérine : Vascular endothelial cadherin

VEGF : vascular endothelial growth factor

XO : Xanthine oxidase

ZO : Zona occludens

67LR : 67 kDa Laminin Receptor

Liste des figures

<i>Figure 1</i> : Maintien de la glycémie par l'insuline et le glucagon.....	24
<i>Figure 2</i> : Voie de transduction du signal de l'insuline.....	26
<i>Figure 3</i> : Mécanisme de l'insulinorésistance.....	28
<i>Figure 4</i> : Nombre d'adultes (20 à 79 ans) atteints de diabète dans le monde.....	30
<i>Figure 5</i> : Causes d'hospitalisation des patients diabétiques à la Réunion en 2016.....	35
<i>Figure 6</i> : Structure d'une artère en condition physiologique saine.....	38
<i>Figure 7</i> : Pathogenèse de l'athérosclérose.....	39
<i>Figure 8</i> : Les deux principaux types d'AVC : ischémique et hémorragique.....	43
<i>Figure 9</i> : Le principe de la thrombectomie endovasculaire.....	45
<i>Figure 10</i> : Schéma général des différentes barrières du cerveau.....	46
<i>Figure 11</i> : Schéma général de la formation et du développement de la BHE.....	49
<i>Figure 12</i> : Schéma général de la structure cellulaire de la BHE.....	51
<i>Figure 13</i> : Schéma de la structure des jonctions serrées de la BHE.....	57
<i>Figure 14</i> : Mécanismes de transport de la BHE.....	61
<i>Figure 15</i> : Structure prédite des principaux transporteurs d'efflux présents au niveau de la BHE.....	65
<i>Figure 16</i> : Mécanismes impliqués dans la modulation du tonus vasculaire via la relaxation.....	67
<i>Figure 17</i> : Production et action des prostaglandines et thromboxanes.....	69
<i>Figure 18</i> : Synthèse de NO à partir d'eNOS dans les cellules endothéliales.....	71
<i>Figure 19</i> : Voie de transduction de l'insuline impliquée dans la modulation du tonus vasculaire.....	72
<i>Figure 20</i> : Mécanismes impliqués dans l'hyperpolarisation de l'endothélium dépendante du Ca^{2+}	74
<i>Figure 21</i> : Sécrétion et action d'ET-1 sur l'endothélium vasculaire.....	75
<i>Figure 22</i> : Transduction du signal de l'angiotensine.....	77
<i>Figure 23</i> : Voies biochimiques du métabolisme du glucose aboutissant aux ROS.....	80
<i>Figure 24</i> : Voie de la production de ROS induite par une hyperglycémie.....	83
<i>Figure 25</i> : Représentation schématique de l'effet de l'insulinorésistance sur l'endothélium vasculaire.....	84
<i>Figure 26</i> : Étapes de formation des ROS et complications associées.....	85
<i>Figure 27</i> : Production de ROS par la chaîne mitochondriale de transport d'électrons.....	89
<i>Figure 28</i> : Structure et réaction de la NADPH oxydase.....	90
<i>Figure 29</i> : Stress du RE associé à la production de ROS.....	92
<i>Figure 30</i> : Impact du stress oxydatif sur la fonction adipocytaire.....	94
<i>Figure 31</i> : Les composés réactifs retrouvés dans le système de défense antioxydant.....	95
<i>Figure 32</i> : Voies génératrices et détoxifiantes des ROS.....	96
<i>Figure 33</i> : Activité antioxydante de HO-1.....	98
<i>Figure 34</i> : Régulation du facteur de transcription Nrf2 dépendante de Keap1.....	101
<i>Figure 35</i> : Impact des ROS sur la voie de signalisation de l'insuline menant à l'insulinorésistance....	102
<i>Figure 36</i> : Découplage du dimère eNOS.....	104
<i>Figure 37</i> : Mécanisme de la dysfonction endothéliale induite par le stress oxydatif.....	105

<i>Figure 38</i> : Dysfonction endothéliale induite par l'inflammation.....	106
<i>Figure 39</i> : Voies de signalisation de NFκB.....	108
<i>Figure 40</i> : Mode d'action et principales fonctions de l'AMPK.....	109
<i>Figure 41</i> : Représentation schématique des effets de l'AMPK sur l'équilibre vasculaire dans le cadre du diabète.....	111
<i>Figure 42</i> : Représentation schématique de l'activation de PPARγ sur les cellules endothéliales et sur le tonus vasculaire.....	112
<i>Figure 43</i> : Représentation schématique des effets de la leptine.....	118
<i>Figure 44</i> : Représentation schématique de la voie de transduction du signal de l'adiponectine associée à celle de l'insuline.....	119
<i>Figure 45</i> : Étapes de l'adhésion monocytaire et de la transmigration endothéliale.....	121
<i>Figure 46</i> : Mécanisme d'action de Nrf2 en condition hyperglycémique.....	124
<i>Figure 47</i> : Structure des acides phénoliques.....	132
<i>Figure 48</i> : Structure des curcuminoïdes.....	133
<i>Figure 49</i> : Structure basique des flavonoïdes.....	133
<i>Figure 50</i> : Structure des flavonoïdes.....	134
<i>Figure 51</i> : Structure des stilbènes.....	136
<i>Figure 52</i> : Structure des lignanes.....	137
<i>Figure 53</i> : Devenir métabolique des polyphénols apportés par l'alimentation.....	138
<i>Figure 54</i> : Plantes médicinales inscrites à la Pharmacopée Française.....	151
<i>Figure 55</i> : Bois d'osto.....	152
<i>Figure 56</i> : Ayapana.....	153
<i>Figure 57</i> : Faux benjoin.....	154
<i>Figure 58</i> : Bois de reinette.....	155
<i>Figure 59</i> : Approche expérimentale globale réalisée <i>in vitro</i> sur les cellules endothéliales cérébrales bEnd.3 en condition d'hyperglycémie.....	161
<i>Figure 60</i> : Approche expérimentale globale réalisée <i>in vivo</i> sur un modèle d'ischémie-reperfusion de souris en condition d'hyperglycémie aiguë.....	163
<i>Figure 61</i> : Approche expérimentale globale réalisée <i>in vivo</i> sur un modèle d'ischémie-reperfusion de souris en condition d'hyperglycémie chronique.....	164
<i>Figure 62</i> : Photographie de cellules bEnd.3 à faible et forte densités observées au microscope électronique.....	167
<i>Figure 63</i> : Photographie de cellules THP-1 à faible et forte densité observées au microscope électronique.....	169
<i>Figure 64</i> : Différentes méthodes de réalisation d'une occlusion de l'artère cérébrale moyenne.....	171

Liste des tableaux

<i>Tableau 1</i> : Origines et fonctions des principales cytokines.....	114
<i>Tableau 2</i> : Concentrations plasmatiques des polyphénols ingérés via l'alimentation chez l'Homme.....	140
<i>Tableau 3</i> : Description des extraits de plantes médicinales et des polyphénols de référence étudiés.....	166

I. Introduction

Le diabète de type 2 et ses complications vasculaires font l'objet de nombreuses études indispensables pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de la maladie. La pathologie diabétique représente un problème de santé public majeur et est un facteur de risque pour le développement des maladies cardiovasculaires qui sont la première cause mondiale de mortalité. L'hyperglycémie chronique, qui est une conséquence d'un diabète non contrôlé, induit des dommages neurovasculaires comme l'accident vasculaire cérébral qui constitue la première cause mondiale de handicap chez l'adulte. En effet, l'hyperglycémie entraîne l'altération de la fonction des cellules endothéliales cérébrales et de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique via une activation du stress oxydatif et d'un état pro-inflammatoire. De ce fait, il est primordial d'évaluer les mécanismes moléculaires mis en jeu dans les altérations fonctionnelles des cellules endothéliales cérébrales au cours du diabète. C'est dans ce contexte qu'un intérêt croissant est porté sur l'étude des effets bénéfiques de polyphénols végétaux, qui possèdent des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. De manière intéressante, La Réunion est définie comme un *hot spot* de la biodiversité végétale mondiale avec une grande variété de ressources végétales dont des plantes à parfum, aromatiques et médicinales qui sont des sources naturelles de polyphénols. A ce jour, 27 plantes médicinales réunionnaises sont inscrites à la Pharmacopée Française dont une dizaine référencée pour des propriétés anti-inflammatoires et antidiabétiques d'après des données ethnopharmacologiques. Néanmoins, il manque encore beaucoup de résultats validés scientifiquement pour attester de ces propriétés. De même, il existe peu de données concernant l'effet des polyphénols des plantes médicinales réunionnaises sur les cellules endothéliales cérébrales microvasculaires en condition diabétique.

L'objectif de mon travail de thèse était de déterminer les altérations fonctionnelles des cellules endothéliales cérébrales en condition hyperglycémique associée au diabète de type 2 via l'étude de marqueurs redox, inflammatoires, vasoactifs et de perméabilité. Par ailleurs, mon travail de thèse visait à évaluer les effets bénéfiques des polyphénols extraits de plantes médicinales réunionnaises. Nous avons plus particulièrement

étudié le rôle protecteur des polyphénols extraits de quatre plantes médicinales réunionnaises, à savoir *Antirhea borbonica*, *Ayapana triplinervis*, *Terminalia bentzoe* et *Dodonaea viscosa* ainsi que de la quercétine et des acides caféique, chlorogénique et gallique détectés comme composés phénoliques majoritaires de ces plantes. Pour répondre à nos objectifs de recherche, l'utilisation de modèles d'études *in vitro* sur lignée de cellules endothéliales cérébrales et *in vivo* sur modèle animal exposés à une hyperglycémie aiguë ou chronique a été requise. Les résultats obtenus ont mis en évidence l'effet délétère de l'hyperglycémie sur la fonction endothéliale et le rôle protecteur de polyphénols végétaux.

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction scientifique du Pr. Marie-Paule GONTHIER au sein de l'UMR 1188 DÉTROU (Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien) sous tutelle de l'Université de La Réunion et de l'Inserm. Cette thèse a été effectuée de 2018 à 2021 dans le cadre d'une bourse doctorale obtenue auprès de la Région Réunion.

Le manuscrit présenté s'organise en sept grands chapitres avec cette introduction générale puis une description du contexte bibliographique concernant les connaissances actuelles sur le diabète de type 2, les complications cérébrovasculaires associées, le rôle causal du stress oxydatif et de l'inflammation et les altérations fonctionnelles des cellules endothéliales cérébrales en condition hyperglycémique. Ce chapitre établit également un bilan des effets protecteurs antioxydants et anti-inflammatoires des polyphénols, et en particulier des polyphénols extraits de plantes médicinales réunionnaises. Les chapitres suivants exposent l'objectif du travail de thèse, l'approche méthodologique suivie, la description et la discussion des résultats obtenus. Le dernier chapitre dresse la conclusion de mon travail de thèse et évoque des propositions de perspectives possibles.

II. Contexte bibliographique

1. La pathologie diabétique

1.1. Définition

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le diabète est défini comme étant une maladie métabolique caractérisée par un taux de glucose sanguin élevé ou une hyperglycémie chronique, qui est une complication fréquente d'un diabète non contrôlé, conduisant avec le temps à des atteintes graves au niveau du cœur, des vaisseaux sanguins, des yeux, des reins et des nerfs. On parle de pathologie diabétique lorsque la glycémie à jeun d'un individu est ≥ 6 mmol/L ou $\geq 1,26$ g/L, entraînant une homéostasie énergétique dérégulée. Ce taux de glucose sanguin peut être élevé pour deux principales raisons, soit le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline, soit l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit, on parle alors d'insulinorésistance (OMS 2016, IDF 2019).

1.2. La régulation de la glycémie

L'insuline est une hormone peptidique hypoglycémiante fabriquée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Elle joue un rôle majeur dans l'absorption des glucides d'origine alimentaire, métabolisés en glucose dans le sang, dans le but de produire de l'énergie ou de stocker du glucose sous forme de glycogène par glycogénogénèse, généralement au niveau du foie, des muscles et du tissu adipeux. Lorsque la glycémie est trop élevée, c'est-à-dire ≥ 7 mmol/L ou $\geq 1,26$ g/L, le glucose est rapidement libéré par glycogénèse principalement hépatique et musculaire. A l'inverse, quand la glycémie est basse, c'est-à-dire ≥ 4 mmol/L ou $\geq 0,65$ g/L, la sécrétion d'insuline est alors interrompue et les cellules α du pancréas sécrètent du glucagon, ce qui augmente le taux de glucose sanguin via la glycogénolyse ou la gluconéogénèse (**Figure 1**) (Boquist, Hellman et al., 1974, Röder, Wu et al., 2016)

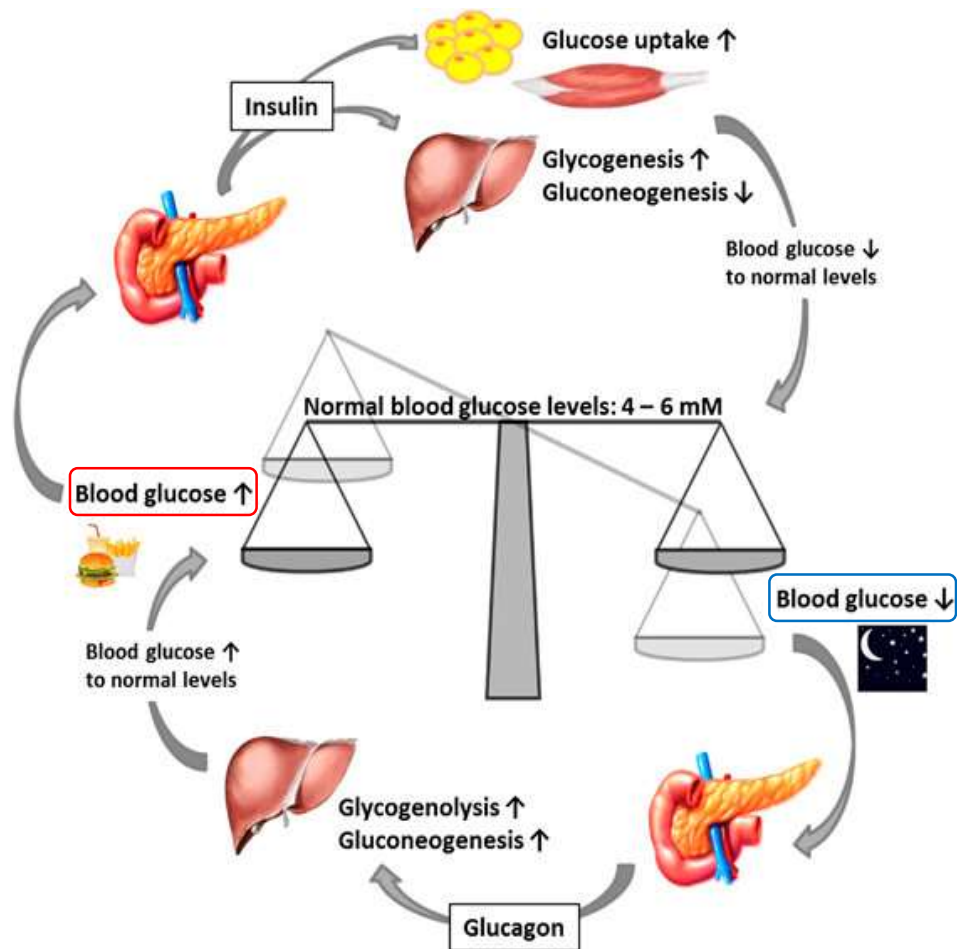


Figure 1 : Maintien de la glycémie par l'insuline et le glucagon.

(Röder, Wu, 2016)

Le mécanisme de signalisation de l'insuline est complexe et implique plusieurs protéines intervenant dans la transduction du signal (**Figure 2**). L'insuline est libérée dans la circulation sanguine par exocytose de manière dépendante au taux de glucose mais est également dépendante du taux d'acides gras d'origine endogène (lipolyse) ou exogène (apportés par l'alimentation) via le récepteur G-protein-coupled receptor 40. L'insuline peut aussi être sécrétée en réponse aux protéines de type incrétine tel que le glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Cette hormone intestinale affecte les niveaux de glucose postprandial en stimulant la sécrétion d'insuline et en inhibant la sécrétion de glucagon (Stoffers, Kieffer et al., 2000, Itoh, Kawamata et al., 2003). L'hyperglycémie entraîne une activité électrique de la membrane cellulaire via les taux d'adénosine triphosphate/ adénosine diphosphate (ATP/ADP) qui induisent une dépolarisation membranaire via des canaux K^+ favorisant ainsi la sécrétion de cette hormone

hypoglycémiant (Rorsman and Renström 2003). Lorsque l'insuline est sécrétée par les cellules β pancréatiques, celle-ci va se lier à son récepteur membranaire présent au niveau du foie, des muscles et du tissu adipeux. Le récepteur à l'insuline (IR) est l'une des principales protéines de ce mécanisme de signalisation. Cette glycoprotéine transmembranaire se compose de deux sous-unités extracellulaires α et de deux sous-unités transmembranaires β . Les deux sous-unités α sont impliquées dans la fixation de l'hormone et dans le rétrocontrôle négatif de l'activité tyrosine sur les sous-unités β par la phosphorylation des résidus sérine du récepteur. Cette première phosphorylation va induire une cascade de phosphorylation nécessaire à la régulation de la glycémie. Les sous-unités β sont responsables du recrutement puis de l'activation d'autres protéines comme les substrats du récepteur à l'insuline IRS-1 et IRS-2, favorisant elles-mêmes, la phosphorylation d'une autre protéine impliquée dans la transduction du signal, la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) (Patti and Kahn 1998, Saltiel and Kahn 2001). L'activation de PI3K induit la phosphorylation de la protéine Akt-kinase, également connue sous le nom de protéine kinase B (PKB), aboutissant ainsi à la translocation de vésicules qui transportent du glucose, les GLUT, du cytosol vers la membrane cytoplasmique des cellules cibles (Chakraborty, Roy et al., 2011). Les protéines GLUT ont des spécificités de substrats, des propriétés cinétiques et des distributions tissulaires qui dictent leurs rôles fonctionnels. Les transporteurs GLUT1 sont largement exprimés au niveau cérébral, dans les cellules endothéliales et les érythrocytes. Les GLUT2 sont retrouvés au niveau des cellules rénales, hépatiques et β pancréatiques alors que les GLUT3 sont plutôt présents au niveau neuronal et placentaire. Les GLUT4, insulino-dépendants, sont responsables du transport du glucose dans les cellules graisseuses, musculaires squelettiques et cardiaques (Saltiel and Kahn 2001, Wilcox 2005). Il existe également des transporteurs de type sodium-glucose linked transporters (SGLT), qui sont des symports utilisant un gradient transmembranaire de Na^+ , à savoir SGLT1 et SGLT2 (Lupsa and Inzucchi 2018).

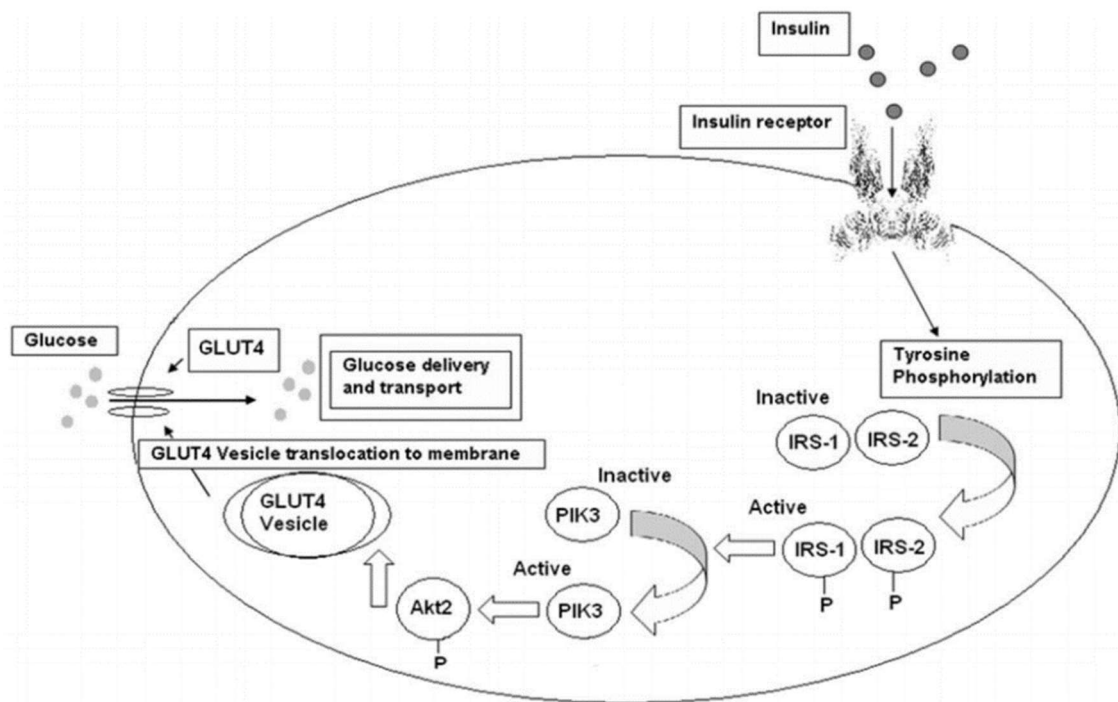


Figure 2 : Voie de transduction du signal de l'insuline.

Akt : protein kinase B; **GLUT 4** : glucose transporter type 4; **IRS-1/-2** : insulin receptor substrate-1/-2; **PIK3** : phosphatidylinositol-3 kinase

(Chakraborty, Roy, 2011)

1.3. Les différents types de diabète et leur prévalence

1.3.1. Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT1) concerne près de 10% des personnes atteintes de diabète. Il est plus connu sous le nom de diabète insulino-dépendant (DID) et est caractérisé par une production insuffisante d'insuline menant à la longue à une accumulation de glucose sanguin. En effet, il est causé par une réaction auto-immune entraînant la destruction sélective des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, induisant un manque drastique d'insuline. Les causes exactes du DT1 ne sont pas encore complètement connues, mais elles seraient liées à une combinaison de conditions génétiques et environnementales. Le DT1 se développe généralement chez les enfants ou chez les jeunes adultes de moins de 30 ans et n'est découvert que lorsqu'environ 90% des cellules β pancréatiques sont détruites. Les symptômes les plus fréquents sont une polydipsie, une polyphagie, une polyurie, une perte de poids importante, un

manque d'énergie ainsi qu'une vision floue. Ce type de diabète se soigne uniquement par des injections intramusculaires quotidiennes d'insuline dans le but de compenser et de réguler

1.3.2. Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) représente le diabète le plus fréquent car il concerne près de 90% des diabétiques et est plus connu sous le nom de diabète non insulino-dépendant (DNID). Le DT2 est généralement diagnostiqué chez les personnes âgées, mais il est de plus en plus observé chez les enfants, les adolescents et les jeunes adultes en raison de l'augmentation des niveaux d'obésité, de la sédentarité et d'une alimentation riche en acides gras saturés, d'où son appellation de « diabète gras ». Le DT2 est caractérisé par une surproduction et une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme, ou par un déficit insulinaire, dû à un épuisement des cellules β pancréatiques entraînant alors une glycémie encore plus élevée, c'est le phénomène d'insulinorésistance (Wilcox 2005, IDF 2020). Il est à noter que les mutations du récepteur de l'insuline sont rares dans les formes courantes de DT2. Cependant, des anomalies de la structure et de la fonction des récepteurs de l'insuline sont présentes dans la résistance à l'insuline chronique. Chez les personnes obèses, une baisse de la liaison de l'insuline aux récepteurs situés dans le foie, le tissu adipeux et les muscles a été recensée en raison d'une diminution de la quantité de récepteurs à l'insuline, sans altération de l'affinité (Patti and Kahn 1998). Les événements physiopathologiques impliquent une voie indépendante de l'insuline où le stress oxydatif induit une dysfonction mitochondriale et l'activation de kinases de stress telles que les p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) et c-Jun N-terminal kinase (JNK) qui vont stimuler la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) et l'interleukine 6 (IL-6) ainsi que la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) via l'activation du facteur transcriptionnel « nuclear factor-kappa B » (NF κ B) et de la protéine kinase C (PKC). Par ailleurs, l'inhibition de PI3K, la diminution de la production de l'ATP et du contrôle du transport du glucose par la translocation GLUT4 induisent l'insulinorésistance (**Figure 3**) (Patel, Rawal et al., 2016).

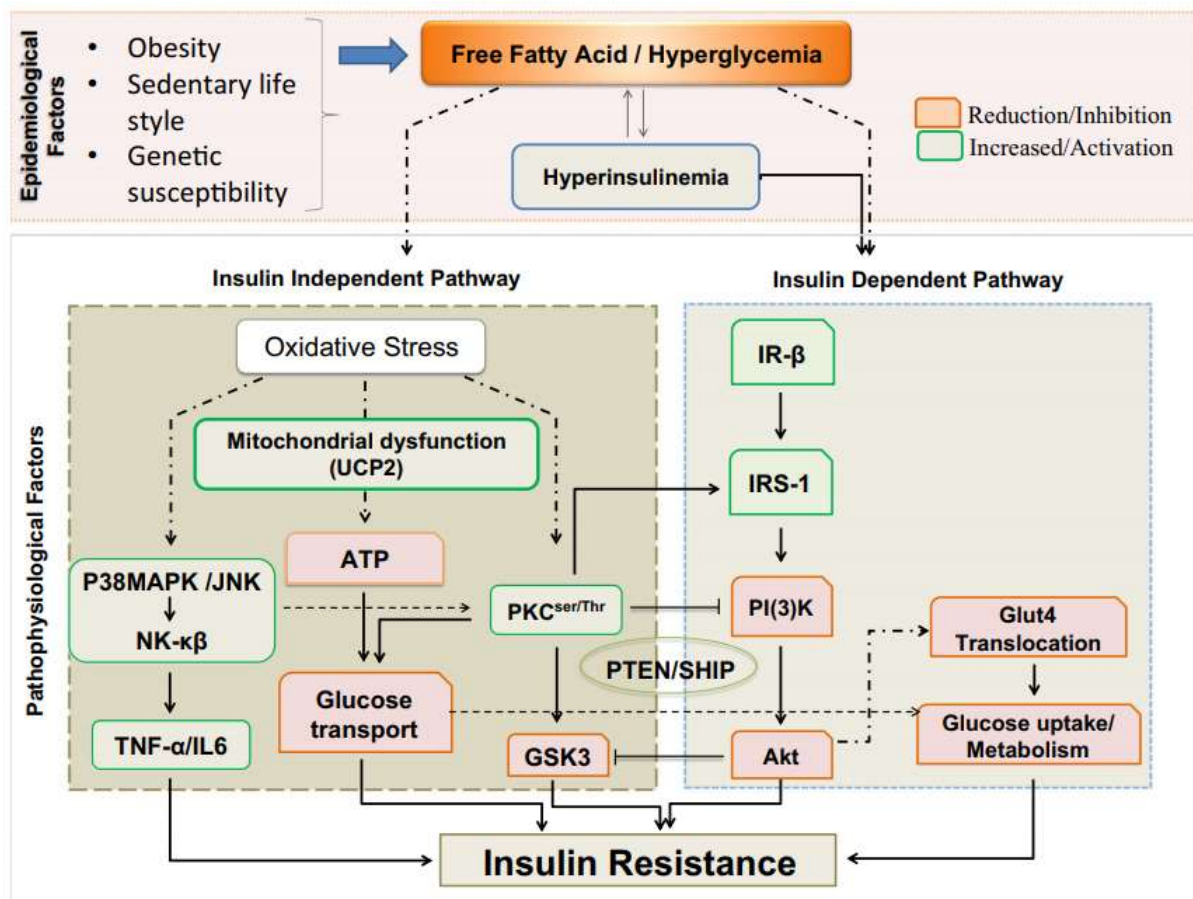


Figure 3 : Mécanisme de l'insulinorésistance.

Akt : protein kinase B ; **ATP** : adenosine triphosphate ; **Glut4** : glucose transporter type 4 ; **GSK3** : glycogen synthase kinase 3 ; **IL-6** : interleukine-6 ; **IR-β** : insulin receptor β ; **IRS-1** : insulin receptor substrate-1 ; **PKC** : protein kinase C ; **PI3K** : phosphoinositide 3-kinase ; **TNF-α** : tumor necrosis alpha ; **UCP2** : mitochondrial uncoupling protein 2

(Patel, Rawal, 2016)

Le DT2 présente des symptômes assez similaires à ceux du DT1, mais ils sont habituellement beaucoup moins aigus. En effet, il est généralement impossible de déterminer le moment exact de l'apparition du DT2, car l'individu peut être complètement asymptomatique. De ce fait, il a été recensé que près d'un tiers voire la moitié des personnes vivant avec le DT2 peuvent ne pas être diagnostiquées dès le début de l'apparition de la pathologie. Ce type de diabète se soigne d'abord de manière naturelle par une réadaptation en termes d'alimentation saine et équilibrée, une activité physique adaptée journalière et une surveillance du poids corporel. De plus,

des médicaments oraux et de l'insuline sont souvent prescrits afin d'aider à réguler la glycémie.

1.3.3. Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel aussi appelé diabète de grossesse se déclare chez la femme enceinte vers la fin de son deuxième trimestre de grossesse. Selon l'OMS, il est défini comme étant un trouble de la tolérance glucidique induisant une hyperglycémie de sévérité variable et aléatoire (OMS 2016). Le diabète sucré gestationnel affecte environ 6% des femmes enceintes et la prévalence augmente parallèlement à l'obésité et au DT2 (Mack and Tomich 2017). Ce type de diabète peut survenir dans deux cas : soit chez une femme possédant un diabète méconnu et révélé par la grossesse, soit chez une femme développant un diabète uniquement pendant la grossesse et qui va disparaître après la grossesse. Durant une grossesse normale, la sécrétion d'hormones diabétoènes par le placenta, telles que l'hormone de croissance, l'hormone libérant la corticotropine, le lactogène placentaire et la progestérone, entraîne une augmentation de la résistance à l'insuline. Il est important de suivre correctement un diabète gestationnel car l'excès de sucre chez la mère peut être transmis en trop grande quantité au fœtus et va être stocké dans les organes de l'enfant entraînant alors des complications au niveau du poids et de la croissance de l'enfant (Friedman, Khoury-Collado et al., 2006).

1.3.4. Le diabète MODY

Le diabète « Maturity-Onset Diabetes of the Young » (MODY) ou diabète de type adulte chez le jeune est une forme particulière et très rare de diabète, avec une prévalence inférieure à 2% parmi les diabètes sucrés. Il survient dès l'enfance ou l'adolescence avec une hérédité chez un individu atteint d'une anomalie génétique autosomique dominante de la glucokinase qui est une enzyme impliquée dans la voie de la glycolyse et la régulation de la sécrétion d'insuline (Anık, Çatlı et al., 2015).

1.4. Les données épidémiologiques de la pathologie diabétique

1.4.1. La prévalence du diabète dans le monde

La pathologie diabétique est qualifiée de maladie chronique émergente. En 2014, l'OMS a recensé 422 millions de personnes, de plus de 18 ans, atteintes de diabète (OMS 2016). Cinq années plus tard, en 2019, cette prévalence a augmenté et 463 millions de personnes, âgées entre 20 et 79 ans, étaient identifiées comme étant diabétiques selon la Fédération Internationale du Diabète (FID) (IDF 2019). Leurs données épidémiologiques démontrent que près de 79,4 % de ces personnes vivent dans des pays à faibles revenus ou à revenus intermédiaires. D'après les données approximatives de 2019, 578 millions d'adultes âgés de 20 à 79 ans d'ici à 2030 et 700 millions d'ici à 2045 vivront avec un diabète, soit une augmentation conséquente de la prévalence mondiale de 51% (**Figure 4**).

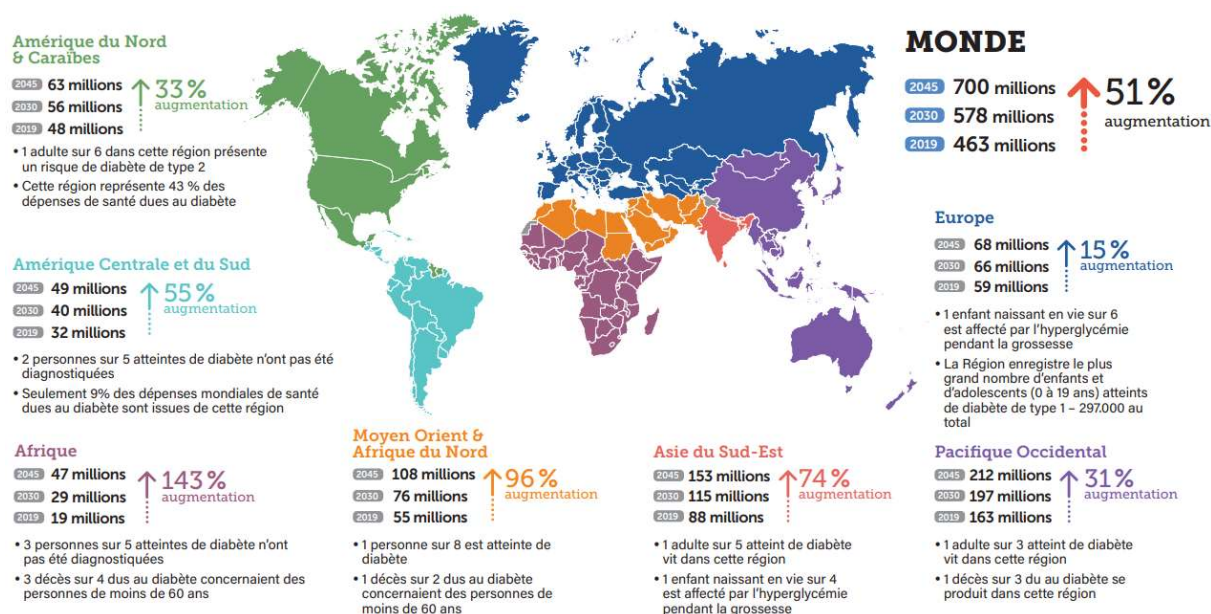


Figure 4 : Nombre d'adultes (20 à 79 ans) atteints de diabète dans le monde.
(IDF 2019)

L'âge des individus influe sur l'apparition du diabète. En effet, la prévalence la plus faible concerne les adultes âgés de 20 à 24 ans avec 1,4 % en 2019. Chez les adultes dans la tranche d'âge de 75 à 79 ans, celle-ci est estimée à 19,9 % en 2019 et devrait s'élever jusqu'à 20,4 % et 20,5 % en 2030 et 2045, respectivement (IDF 2020).

De plus, la pathologie diabétique a été recensée comme étant variable en fonction du sexe des individus, avec une prévalence légèrement plus élevée chez les hommes

(9,6 %) que chez les femmes (9,0 %) de 20 à 79 ans. Selon des études épidémiologiques réalisées en 2019, un adulte sur deux (50,1 %), âgés de 20 à 79 ans soit un total de 231,9 d'adultes sur les 463 millions vivant avec un diabète, principalement de type 2, ignore qu'il vit avec cette maladie. En effet, l'accès limité aux services de soins de santé dans les pays à faibles revenus entraîne un pourcentage élevé de cas de diabète non diagnostiqué avec par exemple, 66,8 % en Afrique. Dans les pays à revenus élevés, le pourcentage de personnes ignorant qu'elles vivent avec le diabète (38,3 %) est également alarmant (IDF 2020). Ces données illustrent bien l'urgence d'une détection rapide pour un meilleur dépistage du diabète à l'échelle mondiale.

1.4.2. La prévalence du diabète en France métropolitaine

La France métropolitaine subit également une augmentation croissante de la prévalence du diabète. En effet, les chiffres sont passés de 2,6% en 2000 à 4,6% en 2012, selon des données recueillies chez des patients traités pharmacologiquement (Nathan, Buse et al., 2009). Une autre étude a également révélé que la pathologie diabétique touche plus fortement les hommes et plus particulièrement les personnes entre 75 et 79 ans, soit 1/5 des hommes et 1/7 des femmes traités pour un diabète en 2009 (Ricci P. 2010). Même si la prise en charge du DT2 s'est considérablement améliorée, celle-ci a lieu trop tardivement et cela continue de progresser, de dépasser les prévisions chiffrées et d'augmenter le risque cardiovasculaire. Par ailleurs, ces données sont positivement corrélées aux facteurs de risques et à la prévalence des complications associées, ce qui induit une augmentation croissante des taux de mortalité et comorbidités du diabète.

1.4.3. La prévalence du diabète à La Réunion

Depuis ces dernières décennies, la prévalence du diabète est alarmante dans les départements d'outre-mer et particulièrement à La Réunion. Des études épidémiologiques ont été menées par l'Observatoire Régional de la Santé de l'Océan Indien (ORS-OI) afin de mieux comprendre les raisons majeures de cette prévalence marquée. Il en ressort que les prédispositions génétiques, l'alimentation déséquilibrée et la sédentarité contribuent à accroître la prévalence du DT2 à La Réunion (ORS 2015). Selon l'ORS, 69 800 réunionnais ont été pris en charge pour un diabète en 2017

soit environ 9% des réunionnais. La prévalence du diabète à La Réunion est ainsi deux fois plus élevée que celle de la France entière et La Réunion reste le département français avec la prévalence connue la plus forte. De plus, près de 250 décès étaient directement liés au diabète sur la période de 2014 à 2016, en notant que le diabète cause un décès tous les 1,5 jours (ORS 2015). L'enquête REDIA (REunion DIAbète) réalisée sur une cohorte de 3600 patients réunionnais par l'équipe de Favier et al. entre 1999-2000 a démontré que 52% des femmes et 48% des hommes obèses étaient diabétiques. Dans cette étude, l'aspect médical, sociétal et économique des patients a été pris en compte car cela corrèle significativement au développement du DT2, avant les prédispositions génétiques. Associé à la pathologie diabétique, il a également décrit que la prévalence de l'obésité était de 10 % chez les hommes contre 20 % chez les femmes (Favier, Jausent et al., 2005). Enfin, en 2016, 82% des patients recensés étaient pris en charge en affection longue durée à La Réunion pour leur diabète (ORS 2017). Compte tenu de la prévalence alarmante du diabète qui tend à s'accroître, il est indispensable de développer des outils pour diagnostiquer la pathologie dès le début de son apparition afin de réaliser une prise en charge rapide des patients et d'atténuer les désordres médicaux et sociétaux associés.

1.5. Le dépistage du diabète

Des millions d'analyses de glycémie sont réalisées en France chaque année et sont accessibles à tous. Le principal objectif de cet examen est de détecter un prédiabète ou encore un diabète le plus tôt possible. Chez les individus atteints de DT1, la maladie peut être rapidement diagnostiquée avec la survenue de symptômes spécifiques tels que la polydipsie, la polyurie, la fatigue et la perte de poids, généralement à un âge assez jeune. En revanche dans le cas du DT2, ces mêmes symptômes excepté la perte de poids apparaissent de manière lente et passent très souvent inaperçus. D'ailleurs, il est estimé qu'un tiers voire la moitié des cas de DT2 sont non diagnostiqués pendant plusieurs années jusqu'à l'apparition des complications causées par l'hyperglycémie telles qu'une vision amoindrie, une insuffisance rénale ou encore des infections à cicatrisation lente (IDF 2020). La première méthode de dépistage possible est la prise de glycémie capillaire consistant à mesurer le taux de sucre dans une gouttelette de sang prélevée au bout du doigt via un glucomètre. Elle peut être réalisée chez-soi à l'aide d'un glucomètre, à la pharmacie ou lors de campagnes de dépistage du diabète.

On considère qu'il y a présence d'un DT2 si la glycémie à jeun (après un jeûne de 8 heures) est supérieure ou égale à 126 mg/dL et supérieure ou égale à 2 g/L après le repas, et on parle de glycémie postprandiale. Si la glycémie est très élevée, il est primordial d'effectuer une prise de sang afin de confirmer la présence de la maladie. Depuis les années 1970, l'hémoglobine glyquée (HbA1c) est un marqueur largement évalué dans le cadre du dépistage du diabète car elle est le reflet de la glycémie sur les deux à trois derniers mois. L'HbA1c est constituée par la liaison lente et irréversible du glucose au résidu valine en position N-terminale d'une ou des deux chaînes bêta de l'hémoglobine. La valeur normale de l'HbA1c d'un individu sain est inférieure à 5,7% (< 100 mg/dL de glucose), un individu pré-diabétique se situe entre 5,7 et 6,4% (100 à 125 mg/dL de glucose) alors que chez un individu diabétique, cette valeur est supérieure 6,5% (> 126 mg/dL de glucose) (American Diabetes 2018). Un autre marqueur largement utilisé est l'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO). L'examen est basé sur la prise de glycémie 2 heures après absorption de 75 g de glucose anhydre dissout dans 300 mL d'eau. Si la glycémie mesurée est supérieure ou égale à 200 mg/dL, il y a présence de diabète. Enfin, l'étude de l'albuminurie et de la glycosurie consistant à doser respectivement les taux d'albumine et de glucose dans l'urine apparaît également comme un test complémentaire utile pour diagnostiquer un diabète.

1.6. Les facteurs de risque associés à la pathologie diabétique

Les facteurs de risque liés la pathologie diabétique sont variables, ce qui rend cette maladie assez complexe. Parmi les causes majeures du diabète, nous retrouvons les antécédents familiaux, l'ethnicité, l'âge, une hypertension artérielle, un ancien diabète gestationnel, un régime riche en acides gras saturés et pauvre en fibres alimentaires, une surcharge pondérale et un manque d'activités physiques (IDF 2020).

Selon l'OMS, la prévalence du diabète est également directement corrélée à celle de l'obésité, on parle alors de « diabésité » (OMS 2016). L'obésité induit des troubles du métabolisme glucidique importants à l'origine de complications d'ordre métabolique. Elle est définie comme une accumulation excessive de masse grasse au sein de l'organisme, engendrant une résistance à l'insuline ou insulino-résistance (Wirth and Rothenfelde 1996). L'insulino-résistance représente l'incapacité de l'insuline à faciliter l'entrée du glucose dans les tissus. En effet, de nombreuses études ont démontré que

l'accumulation excessive de graisse corporelle caractérisée par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur aux normes, favorise le développement de la pathologie diabétique. L'IMC représente mathématiquement le rapport du poids de la personne (en kilogrammes) sur sa taille au carré (en mètre). Une personne dont l'IMC est égal ou supérieur à 25 kg/m² est considérée comme étant en surpoids (OMS 2016). En effet, plus les dépôts graisseux sont importants, plus la glycémie sera élevée, plus l'insuline sera produite en quantité excessive (hyperinsulinémie) et plus sa sécrétion sera importante, entraînant l'épuisement du pancréas et ainsi le développement du diabète (Wirth and Rothenfelde 1996). Le tissu adipeux blanc, caractérisé par des dépôts graisseux viscéraux et sous-cutanés, est plus particulièrement lié à la résistance à l'insuline de par sa fonction de stocker du gras (Misra and Vikram 2003).

A La Réunion, plusieurs études d'ordre médico-social ont été menées par l'ORS-OI dans le but de mieux comprendre l'origine de la prévalence élevée du diabète. Les principales raisons qui en découlent sont les antécédents familiaux et le changement de mode de vie et d'alimentation. En effet, l'évolution et la modernisation de la Réunion au cours des 50 dernières années a engendré un développement conséquent de l'obésité et du DT2 (ORS 2015). La Réunion a ainsi connu une transition importante en termes de consommation alimentaire via l'implantation de grandes distributions industrielles, et de condition de vie par le développement des moyens de transport et de nouvelles technologies (RE-CONSAL 2002). De ce fait, l'alimentation des réunionnais s'est enrichie en graisses et en glucides, et associée à la diminution de la pratique des activités physiques, elle a favorisé le développement de l'obésité et de la pathologie diabétique.

1.7. Les complications et conséquences associées à la pathologie diabétique

L'hyperglycémie chronique associée au diabète altère le système vasculaire regroupant l'aorte, les artères, les artérioles, les capillaires et les veinules, à l'intérieur desquels le débit sanguin est le plus faible. Ces dommages contribuent au développement de complications d'ordre microvasculaire ou macrovasculaire (**Figure 5**).

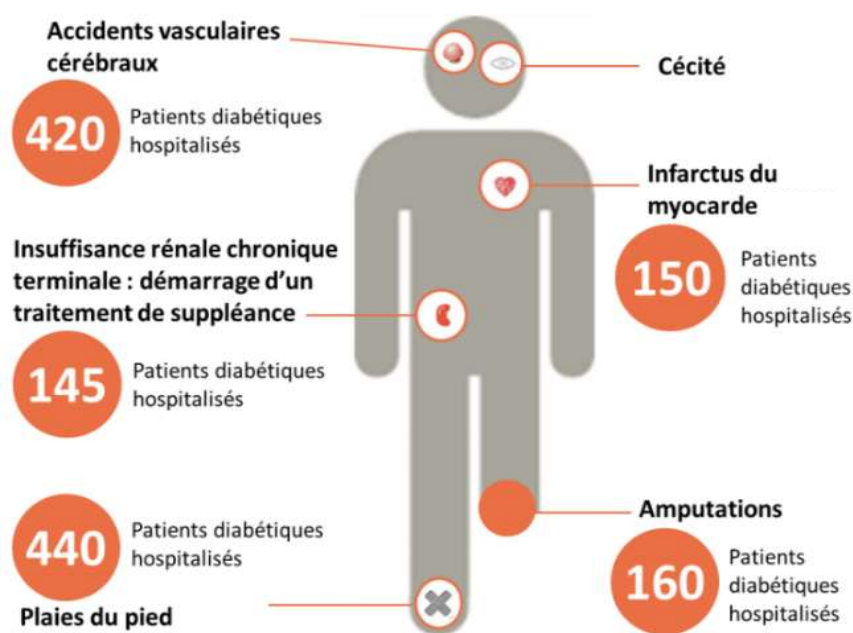


Figure 5 : Causes d'hospitalisation des patients diabétiques à la Réunion en 2016.

(ORS 2018)

1.7.1. Les complications microvasculaires

1.7.1.1. Rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique encore appelée maladie maculaire diabétique, est une complication microvasculaire courante et spécifique du diabète. Il est établi qu'une personne diabétique sur trois développera cette pathologie. Elle résulte directement d'une hyperglycémie chronique provoquant une fragilisation de la paroi des capillaires présents au niveau de la rétine. Ces événements vont engendrer une perte de leur étanchéité, une rupture puis un éclatement des vaisseaux rétiniens et un épaissement de la macula induisant ainsi une baisse de l'acuité visuelle menant à une cécité sur le long terme. La principale cause du développement et de la progression de la rétinopathie est un mauvais contrôle de la glycémie, de la pression artérielle et éventuellement de la cholestérolémie (Cheung, Mitchell et al., 2010, IDF 2020). En 2015, la rétinopathie diabétique concernait 22% des diabétiques réunionnais contre 8% en Métropole (ORS 2015).

1.7.1.2. Néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique est causée par des dommages des petits vaisseaux sanguins situés au niveau des reins, ce qui entraîne une perte d'efficacité des reins ou dans le pire des cas une défaillance rénale totale. Elle touche plus particulièrement les glomérules rénaux responsables de la filtration du sang et de la formation de l'ultrafiltrat. Cette pathologie peut être dépistée par la mesure de la quantité d'albumine dans l'urine. Le diabète est reconnu comme étant l'une des principales causes d'insuffisance rénale chronique. En effet, des études épidémiologiques ont démontré que cette pathologie touche près de 30 à 40% des diabétiques et que plus de 80% des cas d'insuffisance rénale terminale sont causés par le diabète, l'hypertension artérielle ou une combinaison des deux. Un traitement avec des médicaments qui réduisent l'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone en cas d'albuminurie persistante, même en l'absence d'hypertension artérielle, est très efficace pour prévenir le développement et la progression de l'insuffisance rénale chronique chez les personnes diabétiques. Le maintien de niveaux de glycémie et de tension artérielle presque normaux peut réduire considérablement le risque de maladie rénale (IDF 2017). En 2017, 58% des patients dialysés à La Réunion étaient diabétiques (ORS 2018).

1.7.1.3. Neuropathie diabétique

Selon la FID, la neuropathie diabétique correspond à une altération des activités normales des nerfs dans tout le corps et peut altérer les fonctions autonomes, motrices et sensorielles. Elle touche principalement la fonction sensorielle, provoquant des sensations anormales et un engourdissement progressif qui facilite le développement d'ulcères. Près de 40 à 60 millions de diabétiques dans le monde sont concernés par les complications sévères et chroniques du pied diabétique et des membres inférieurs. En effet, lorsque la glycémie et la pression artérielle sont trop élevées, cela peut endommager les nerfs et plus fréquemment ceux situés aux extrémités, en particulier les pieds. Les lésions nerveuses affectant les nerfs externes des membres, appelées neuropathies périphériques, peuvent être assez importantes et rendent les blessures inaperçues à la suite d'une perte de sensation entraînant ainsi des ulcérations, des

infections graves et dans certains cas des amputations (Iqbal, Azmi et al., 2018, Feldman, Callaghan et al., 2019). Malheureusement, il a été recensé que moins d'un tiers des médecins sont capables de reconnaître les signes de neuropathie périphérique liée au diabète et que ces diagnostics manqués contribuent fortement aux taux élevés de cette maladie. Par conséquent, les diabétiques présentent un risque d'amputation qui peut être plus de 25 fois supérieur à celui des personnes non diabétiques. Même en cas d'amputation, des bons soins et un bon suivi permettent de préserver la jambe restante et la vie de la personne (IDF 2020).

1.7.2. Les complications macrovasculaires

1.7.2.1. Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie qui touche les artères de moyen et gros diamètre, comme les artères carotides ou vertébrales longeant le cou ainsi que les artères intracrâniennes se situant à la base et autour du cerveau. Une artère est composée de trois couches distinctes, que sont l'adventice, la media et l'intima, allant de l'extérieur vers l'intérieur de l'artère, respectivement (**Figure 6**). La face interne de l'artère est tapissée par des cellules endothéliales liées entre elles par des jonctions serrées qui forment l'endothélium vasculaire (Lusis 2000). L'intima se compose d'une matrice extracellulaire, notamment du collagène et des protéoglycanes, et une lame élastique qui sépare l'intima et la média. La media est constituée de cellules musculaires lisses (CML) alignées de manière longitudinale, d'élastine et du collagène responsables de son élasticité, notamment grâce à la sécrétion par les cellules endothéliales de facteurs vasoactifs. Enfin, l'adventice se compose de fibroblastes, de CML et de macrophages. Cet ensemble de couches cellulaires joue un rôle anticoagulant et antithrombotique, et est responsable de la régulation de l'homéostasie vasculaire et du tonus vasculaire (Kirchhofer, Sakariassen et al., 1993).

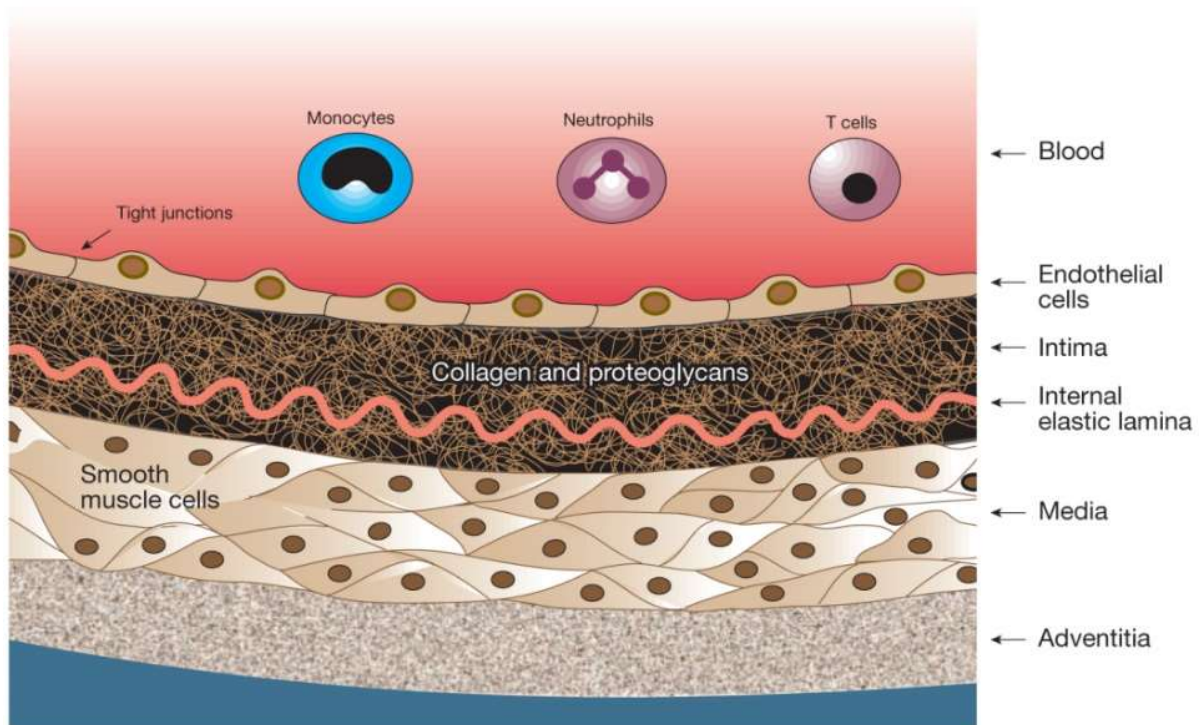


Figure 6 : Structure d'une artère en condition physiologique saine.

(Lusis 2000)

L'athérosclérose est caractérisée par une altération de l'intima et de la formation progressive d'une plaque d'athérosclérose au niveau de la paroi de l'artère (**Figure 7**). Au début du développement de la maladie, les lipoprotéines de basse densité (LDL) qui circulent dans le flux sanguin se déposent et s'accumulent dans l'espace sous-endothélial au niveau de l'intima jusqu'à former un cœur lipidique (Plump, Smith et al., 1992). Ces LDL vont subir une modification oxydative donnant des LDL oxydées (LDLox) (Hulthe and Fagerberg 2002). Ces lipoprotéines oxydées contribuent au développement d'un état pro-inflammatoire et pro-oxydant en stimulant les cellules endothéliales qui expriment alors des molécules d'adhésion vasculaire, dans le but de recruter des monocytes sanguins. Une fois recrutés, les monocytes transmigrent dans l'intima par diapédèse et se différencient en macrophages pro-athérogènes qui vont internaliser par phagocytose les LDLox. Ces macrophages gorgés de lipides se transforment par la suite en cellules spumeuses, formant ainsi les stries lipidiques (Ross 1999, Steinl and Kaufmann 2015). Les cellules spumeuses et le recrutement de leucocytes favorisent la sécrétion de diverses cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des interleukines et des facteurs de croissance qui vont engendrer la

migration des CML de la media vers l'intima induisant à leur tour une stabilisation de la plaque fibreuse naissante. L'augmentation du volume de plaque favorise la néovascularisation (Zhang-Ho-Tin-Noé and Michel 2011). Le dépôt de fibrine, d'élastine, de collagène et de plaquettes activées sur l'endothélium dysfonctionnel favorise la formation d'une chappe fibreuse tout autour des stries lipidiques et d'un milieu pro-thrombotique. Les cellules spumeuses vont ensuite entrer en apoptose et libérer des débris cellulaires et des lipides, ce qui entraînera la formation d'un noyau nécrotique. De plus, les protéases sécrétées par les cellules spumeuses peuvent déstabiliser la plaque, engendrant une rupture de la plaque. Cette plaque peut alors engendrer l'obstruction partielle de l'artère (Lusis 2000, Steinl and Kaufmann 2015). Lorsqu'il y a un contact entre un caillot sanguin ou thrombose et une plaque devenue instable, cette maladie peut atteindre un degré de gravité sévère. En effet, le thrombus peut ensuite se développer dans la lumière artérielle en obstruant complètement l'artère ou en se fragmentant pour aller obstruer une artère distale plus petite (Michel, Delbosc et al., 2012). C'est ce qu'on appelle une embolie.

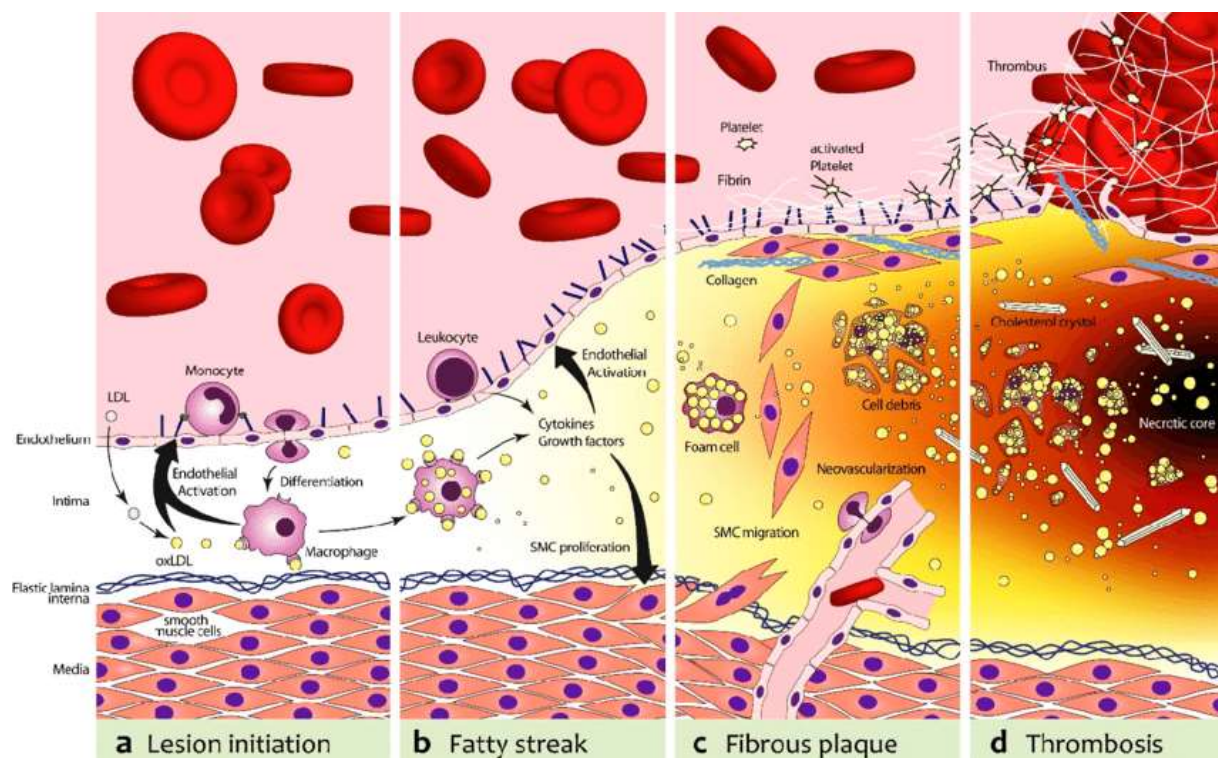


Figure 7 : Pathogenèse de l'athérosclérose.

(a) Initiation de la lésion, (b) strie grasse, (c) plaque fibreuse et (d) thrombose.

(Steinl and Kaufmann 2015)

1.7.2.2. Artériopathie oblitérante des membres inférieurs

L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) est une conséquence fréquente chez les individus ayant des facteurs de risques vasculaires et particulièrement chez les diabétiques. Cette pathologie est une conséquence due à la présence de thrombose qui va obstruer les artères des membres inférieurs, empêchant ainsi l'irrigation des muscles fessiers jusqu'aux orteils. Les artères concernées sont l'aorte, les artères iliaques, fémorales, tibiales et les artères dorsales du pied. L'AOMI n'est généralement diagnostiquée qu'à un stade avancé de la maladie, lorsque l'apport de sang devient vraiment insuffisant à cause des artères sténosées ou thrombosées et que les muscles souffrent en devenant douloureux. Au stade de gravité le plus élevé, les pieds et les orteils, qui sont les plus fragiles du fait de leur éloignement, peuvent être sujets à une mortification de tissus entraînant une nécrose ou une gangrène (Becker 1985). Les plaies diabétiques au niveau des pieds qui ont du mal à cicatriser mènent généralement à des ulcères. La présence d'ulcères, de nécroses et de gangrènes signifie que l'artériopathie est sévère et que le risque d'amputation est important (Rossi and Carpi 2004).

1.7.2.3. Cardiopathie ischémique

Les maladies cardiovasculaires affectent particulièrement le cœur et les vaisseaux sanguins en entraînant des complications mortelles comme la maladie coronarienne ou crise cardiaque. Elles représentent la première cause de mortalité au monde et sont la cause de décès la plus courante chez les patients diabétiques. En effet, ces patients ont deux à quatre fois plus de risque de développer des maladies cardiovasculaires (Aronson and Edelman 2014, IDF 2016). Le diabète, associé à une hypertension artérielle, une hypercholestérolémie et une hyperglycémie, contribue à rendre le système de coagulation sanguine plus actif, augmentant ainsi le risque de formation de caillots sanguins en induisant un risque accru de complications cardiovasculaires telles que l'angine de poitrine, les maladies coronariennes, l'infarctus du myocarde, la maladie artérielle périphérique et l'insuffisance cardiaque congestive (Ali, Narayan et al., 2010, Aronson and Edelman 2014). Ces maladies coronariennes résultent de la présence de plaques d'athéromes au niveau de la lumière des artères coronaires. L'obstruction de ces artères peut être totale ou partielle, plus ou moins rapide ou

brutale, avec différents degrés de gravité. Des lésions se forment alors dans le myocarde, allant de l'ischémie à une nécrose et se traduisent par des syndromes aigus comme l'infarctus du myocarde (IDF 2020).

1.7.2.4. Accident vasculaire cérébral

➤ Définition

Selon l'OMS, l'accident vasculaire cérébral (AVC) est défini par « une apparition rapide de signes cliniques liés à une dysfonction cérébrale, sans autre cause apparente qu'une origine vasculaire avec des symptômes pouvant engendrer la mort ». En effet, il correspond à une anomalie de la circulation sanguine cérébrale irriguant une région plus ou moins importante du cerveau (OMS 2016). L'AVC est devenu la troisième cause de mortalité la plus importante chez l'Homme et peut survenir chez les personnes jeunes, âgées et souvent chez les personnes diabétiques. Il survient à la suite de la réduction ou de la rupture d'un vaisseau sanguin engendrant ainsi la mort des cellules nerveuses, qui sont alors privées de dioxygène et d'éléments nutritifs essentiels à leurs fonctions. Lorsque le flux sanguin est réduit et cela même pour quelques minutes, les cellules nerveuses sont privées de dioxygène, elles meurent et elles ne se régénéreront pas. Dans le cas où l'absence de flux perdure sur quelques heures et que le débit sanguin est restreint, la partie du cerveau qui n'est plus irriguée va entrer en phase de nécrose tissulaire et ainsi provoquer un déficit neurologique irréversible plus ou moins important en fonction de la sévérité de l'AVC. Les AVC ont des conséquences très variables. En effet, environ un individu sur dix récupère complètement, alors qu'à l'inverse neuf individus sur dix en gardent des séquelles importantes. La gravité des séquelles dépend de la région du cerveau atteinte et des fonctions qu'elle contrôle. Plus la région privée de dioxygène est grande, plus les séquelles risquent d'être importantes. Après un AVC, certaines personnes montrent certaines difficultés à écrire, à parler (aphasie), à se mouvoir, ou ont des déficits mnésiques. Ces personnes peuvent également présenter une paralysie plus ou moins importante, d'une ou de plusieurs parties du corps, en fonction de la zone cérébrale lésée (American_Stroke_Association 2020).

➤ Les différents types d'AVC

Il existe deux principaux types d'AVC, à savoir l'AVC ischémique et l'AVC hémorragique (**Figure 8**). L'AVC ischémique, encore appelé « thrombose cérébrale » est le plus fréquent et représente 80 % des cas. L'embolie cérébrale correspond à un caillot sanguin formé à un autre endroit du système circulatoire, généralement le cœur et les grandes artères de la poitrine et du cou, qui se détache, pénètre dans la circulation sanguine et traverse les vaisseaux sanguins du cerveau jusqu'à ce qu'elle atteigne des vaisseaux trop petits pour le laisser passer. Une cause principale d'embolie est un rythme cardiaque irrégulier appelé fibrillation auriculaire. Il peut provoquer la formation de caillots dans le cœur, se déloger et se déplacer vers le cerveau. Il peut arriver que la réduction de l'apport sanguin d'une artère cérébrale ne soit que temporaire et qu'elle se résorbe naturellement, sans laisser de séquelles. Ce phénomène est nommé accident ischémique transitoire (AIT). Les symptômes sont les mêmes que ceux d'un AVC ischémique total mais ils disparaissent en moins d'une heure. L'AVC hémorragique, lui, représente environ 20 % des cas, mais est considéré comme étant la forme d'AVC la plus grave. Souvent causé par une hypertension artérielle de longue date, il résulte de la rupture du vaisseau sanguin affaibli, là où se situent généralement les malformations artérioveineuses ou les anévrismes, on parle alors de rupture d'anévrisme. En plus de priver une partie du cerveau de dioxygène, l'hémorragie caractérisée par une accumulation de sang, détruit les tissus cérébraux environnants en exerçant une pression sur les tissus. L'hémorragie cérébrale peut se produire à n'importe quel endroit du cerveau (American Stroke Association 2020, Fondation des maladies du cœur et de l'AVC du Canada 2020).

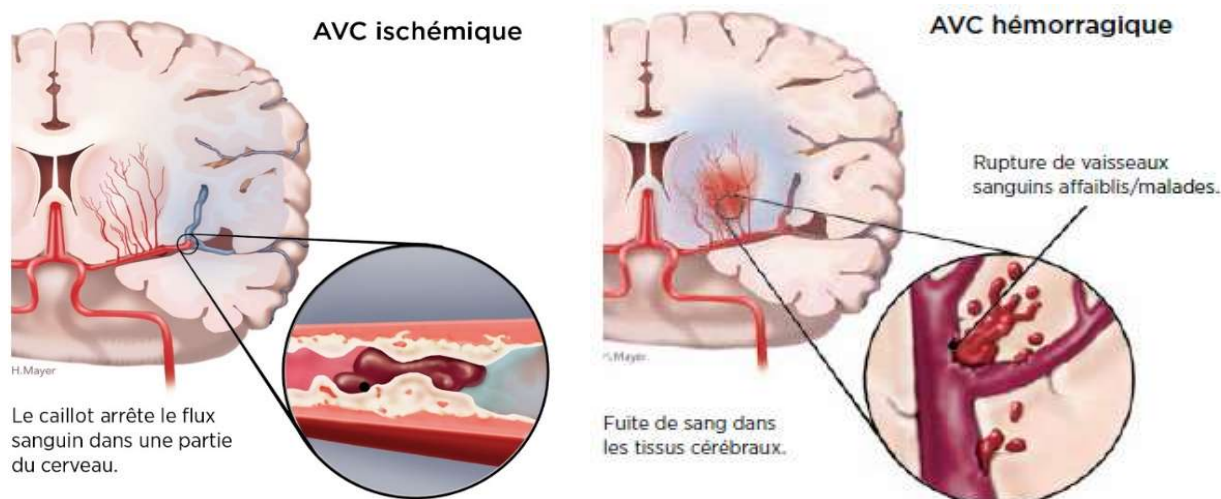


Figure 8 : Les deux principaux types d'AVC : ischémique et hémorragique.

(Fondation des maladies du cœur et de l'AVC du Canada 2020)

Après un AVC aigu, un phénomène de neuroinflammation se met en place, en provoquant une altération de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique, une transformation hémorragique, une production accrue de signaux pro-inflammatoires tels que les cytokines, chimiokines et la sécrétion de la protéine C-réactive (CRP). Il en résulte également une expression de molécules d'adhésion engendrant l'infiltration de cellules inflammatoires (neutrophiles, monocytes / macrophages) dans la région ischémique, aggravant les lésions cérébrales. D'autres facteurs délétères sont également activés tels que le stress oxydatif, l'excitotoxicité, les métalloprotéinases matricielles (Jayaraj, Azimullah et al., 2019, Yang, Hawkins et al., 2019).

➤ L'impact du diabète sur la survenue d'AVC

Chaque année, en France, 125 000 personnes sont hospitalisées pour un AVC et une grande partie d'entre eux sont diabétiques. En effet, le diabète est un facteur de risque doublant, voire triplant la probabilité de contracter un AVC. Ceci est largement démontré pour le DT2 (Aronson and Edelman 2014). Les critères influant plus fortement sur la survenue d'un AVC sont l'ancienneté du diabète ou encore la coexistence d'autres facteurs de risque tels que l'âge, le tabagisme, l'hypertension artérielle, l'athérosclérose (Barrett-Connor and Khaw 1988). Comme le diagnostic

clinique peut se faire plusieurs années après le début de l'apparition de la pathologie diabétique, les complications vasculaires sont le plus souvent déjà présentes lorsque le diagnostic est établi. En effet, une étude prospective finlandaise a montré que les hommes diabétiques dès le début de l'étude semblaient présenter un risque 6 fois plus élevé de décès par AVC, tandis que celui-ci était de 1,7 pour ceux qui ont développé un diabète au cours du suivi. Concernant les femmes, celles qui étaient diabétiques au départ présentaient un risque 8,2 fois plus élevé contre 3,7 fois chez celles qui ont développé un diabète plus tard. Au terme de l'étude, 16% chez les hommes et 33% chez les femmes des décès par AVC étaient attribués au diabète (Tuomilehto, Rastenyte et al., 1996).

➤ Les différents traitements possibles

Concernant les possibilités de traitements pour lutter contre un AVC, un seul médicament est approuvé dans le but de réduire le risque de lésions cérébrales irréversibles. Il est prescrit dans le cas des AVC ischémiques causés par une thrombose ou par une embolie. Il s'agit d'un activateur du plasminogène de type tissulaire recombinant (rt-PA), une protéine du sang qui aide à résorber les caillots rapidement, en une heure ou deux. Pour une efficacité optimale, le médicament doit être injecté par voie intraveineuse dans les 3 à 4,5 heures maximum qui suivent l'AVC, ce qui limite beaucoup son usage (Hacke, Kaste et al., 2008). Une fois l'AVC stabilisé, des médicaments anticoagulants ou antiagrégants plaquettaires tels que de l'héparine, du clopidogrel ou de l'aspirine, sont souvent prescrits sur le long terme. Ceux-ci aident à prévenir la formation de nouveaux caillots sanguins dans les artères ou préviennent le grossissement des caillots déjà formés. Si des symptômes de paralysie sont observés, une rééducation doit débuter au plus vite pour être efficace et atténuer voire éliminer les séquelles motrices. Cependant, même si le rt-PA est largement reconnu pour ses effets protecteurs, des études ont également démontré que la transformation hémorragique et l'apoptose sont des complications fréquentes après une thrombolyse avec du rt-PA dans le cadre d'un AVC ischémique (Liu, Cheng et al., 2004, Liu, Xie et al., 2020) ; ce qui le rend inutilisable chez les patients diabétiques subissant un AVC. De manière intéressante, Liu et al., ont montré qu'une protéase, la protéine activée C, ayant des propriétés anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et neuroprotectrices durant l'AIT, favorise l'activation des mécanismes anti-apoptotiques dans les cellules

cérébrales en agissant directement sur l'endothélium et les neurones. La protéine activée C est connue pour bloquer les toxicités vasculaires et neuronales du rt-PA *in vitro* et *in vivo*, augmentant ainsi considérablement l'efficacité du traitement par rt-PA lors d'AVC (Liu, Cheng, 2004).

Une nouvelle technique appelée thrombectomie endovasculaire consiste à insérer un tube mince au niveau de l'artère fémorale d'une personne et à l'amener jusqu'aux vaisseaux cérébraux via une visualisation aux rayons X. Une fois à la zone obstruée, le caillot sanguin est enlevé par une endoprothèse récupérable dans le but de rétablir la circulation sanguine (**Figure 9**). Cette technique est désormais le traitement normalisé de l'AVC ischémique grave car elle a montré sa capacité à sauver des vies. En effet, elle est préconisée aux personnes prises en charge dans les 6 heures suivant le début d'un AVC, voire dans les 24 heures dans certains cas. Toutefois, plus l'intervention se fait rapidement, plus les chances qu'elle fonctionne sont élevées (Fondation des maladies du cœur et de l'AVC du Canada 2020).

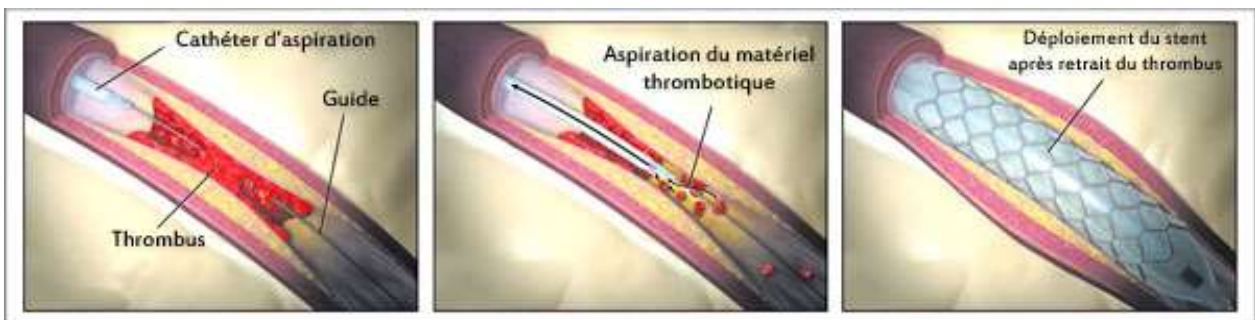


Figure 9 : Le principe de la thrombectomie endovasculaire.

(*Journal International de Médecine 2020*

)

2. La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) correspond à l'ensemble des structures séparant le compartiment sanguin de l'encéphale. Il existe trois interfaces : une interface sang / tissu cérébral, une interface sang / liquide cébrospinal et une interface au niveau des plexus choroïdes et des méninges (**Figure 10**). La BHE est donc présente à toutes les barrières séparant le sang du tissu cérébral, à l'exception de certaines petites zones cérébrales spécialisées, appelées organes circumventriculaires

(Abbott, Patabendige et al., 2010). Ces zones de petite taille sont très perméables et laissent passer les hormones peptidiques comme l'angiotensine-II (Ang-II) ou des molécules qui ne sont pas capables de traverser la BHE (Ganong 2000).

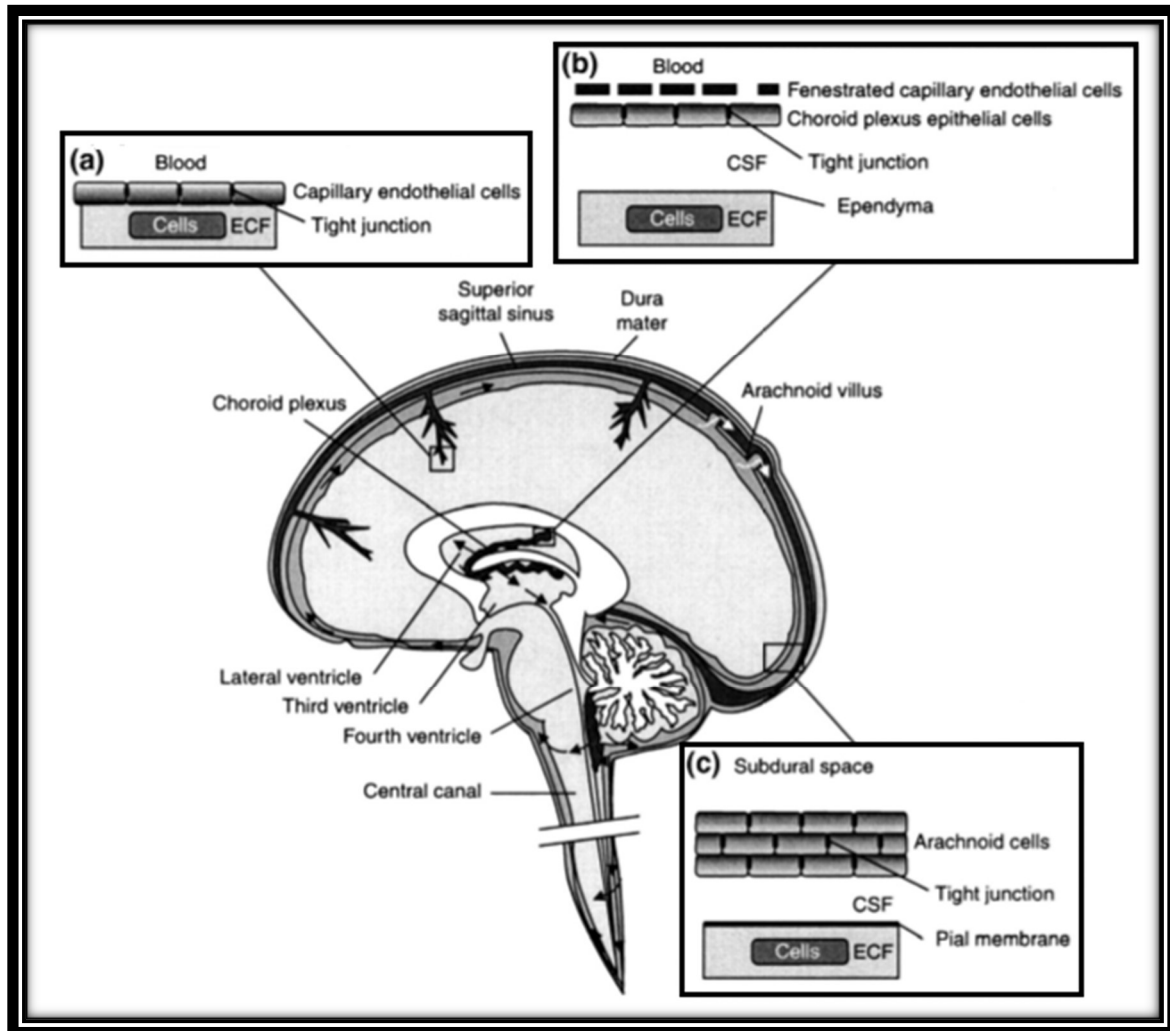


Figure 10 : Schéma général des différentes barrières du cerveau.

CSF : fluide cébrospinal ; **ECF** : fluide extracellulaire ou interstitiel

(Abbott, Patabendige, 2010)

(a) La BHE se compose essentiellement de cellules endothéliales cérébrales retrouvées dans les capillaires sanguins, liées entre elles par des jonctions serrées (JS). Cette BHE, au niveau des microcapillaires cérébraux est de loin la plus grande surface d'échange chez l'adulte humain avec une surface comprise entre 12 et 18 m². Elle a pour rôle de limiter les échanges entre le sang et le tissu cérébral dans le but de protéger le cerveau d'éventuels pathogènes ou de substances toxiques.

(b) *La barrière épithéliale des plexus choroïdes / fluide cérébro-spinal* se situe au niveau des plexus choroïdes dans les ventricules latéraux, dans le troisième et le quatrième ventricules du cerveau. La surface apicale des cellules épithéliales des plexus choroïdes présentent des JS alors que les cellules endothéliales des capillaires sont fenestrées.

(c) *La barrière sang / liquide cérébro-spinal sous arachnoïdien* se compose de l'épithélium de l'arachnoïde qui est un épithélium à multicouches présentant des JS et permettant d'assurer dans une certaine mesure l'étanchéité de cette méninge. Le cerveau est enveloppé par les méninges : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère. Ces trois barrières sont essentielles pour protéger le système nerveux central (SNC) contre d'éventuels pathogènes, toxines, substances chimiques ou autres molécules circulant au niveau sanguin.

La BHE est une unité fonctionnelle qui a été décrite pour la première fois en 1885 par Paul Ehrlich. Celui-ci a noté que les colorants qu'il avait injecté dans le système circulatoire de rats coloraient tous les organes excepté le cerveau et la moelle épinière (Ehrlich 1885). Par ailleurs, en 1913, Edwin Goldmann, l'élève de Paul Ehrlich a montré qu'après une injection de bleu trypan directement dans le liquide céphalo-rachidien, tous les types cellulaires présents au niveau du cerveau ont été coloré mais que le colorant n'a pas réussi à circuler en périphérie (Goldmann 1913). Cela suggérait qu'il existait une barrière entre le SNC et la circulation périphérique empêchant la libre circulation du colorant (Hawkins and Davis 2005). La BHE se compose d'une monocouche de cellules endothéliales qui reposent sur une lame basale en présence de péricytes qui recouvrent les capillaires cérébraux et des pieds astrocytaires formant la couche externe des capillaires matures (Ballabh, Braun et al., 2004, Benarroch 2012). Les principales fonctions de cette barrière sont le maintien de l'homéostasie cérébrale, la régulation du transport d'afflux et d'efflux et la protection des dommages grâce à sa structure multicellulaire spécialisée. Chaque type cellulaire constituant la BHE apporte une contribution indispensable à l'intégrité de la BHE. Lorsque l'une des composantes est endommagée, la barrière s'effondre en engendrant des conséquences importantes telles qu'une neuroinflammation et une neurodégénérescence (Obermeier, Daneman et al., 2013). La barrière endothéliale cérébrale possède deux caractéristiques morphologiques importantes qui sont induites par les astrocytes : elle est non fenestrée et les cellules endothéliales présentent des JS étanches. Ces jonctions rendent la paroi vasculaire étanche et régulent le passage de molécule et d'ions tels que le Na^+ , K^+ , Ca^{2+}

(Hawkins, Egleton et al., 2005). La résistance électrique trans-endothéliale (TEER) de la BHE est de ~ 1500 à $2000 \Omega \text{ cm}^2$ comparé à $\sim 33 \Omega \text{ cm}^2$ pour le système vasculaire périphérique, indiquant que la BHE est très imperméable (Andjelkovic, Stamatovic et al., 2020). Les différents types cellulaires présents au niveau de la BHE expriment divers récepteurs, canaux ioniques, et transporteurs vésiculaires nécessaires aux interactions paracrines. Ces interactions se font par des signaux chimiques et des mécanismes de transduction (Benarroch 2012). Etant donné que la BHE possède une faible perméabilité passive à de nombreux nutriments et métabolites hydrosolubles essentiels pour le tissu cérébral, ces systèmes de transport spécifiques assurent un approvisionnement adéquat de ces substances au cerveau. Cette faible bioaccessibilité à la BHE représente un frein important pour de nombreux médicaments à but thérapeutique qui ne peuvent pas traverser la BHE (Ballabh, Braun, 2004, Abbott, Rönnbäck et al., 2006, Daneman and Prat 2015).

2.1. Les étapes de formation et de développement de la BHE

Le développement et le maintien de la BHE sont orchestrés en plusieurs étapes par les éléments cellulaires et non-cellulaires interagissant avec les cellules endothéliales. En effet, les astrocytes, les péricytes et la matrice extracellulaire (MEC) sont impliqués dans le maintien structural et fonctionnel de la BHE. Sa formation se fait en trois étapes clés : l'angiogenèse, la différenciation et la maturation (**Figure 11**).

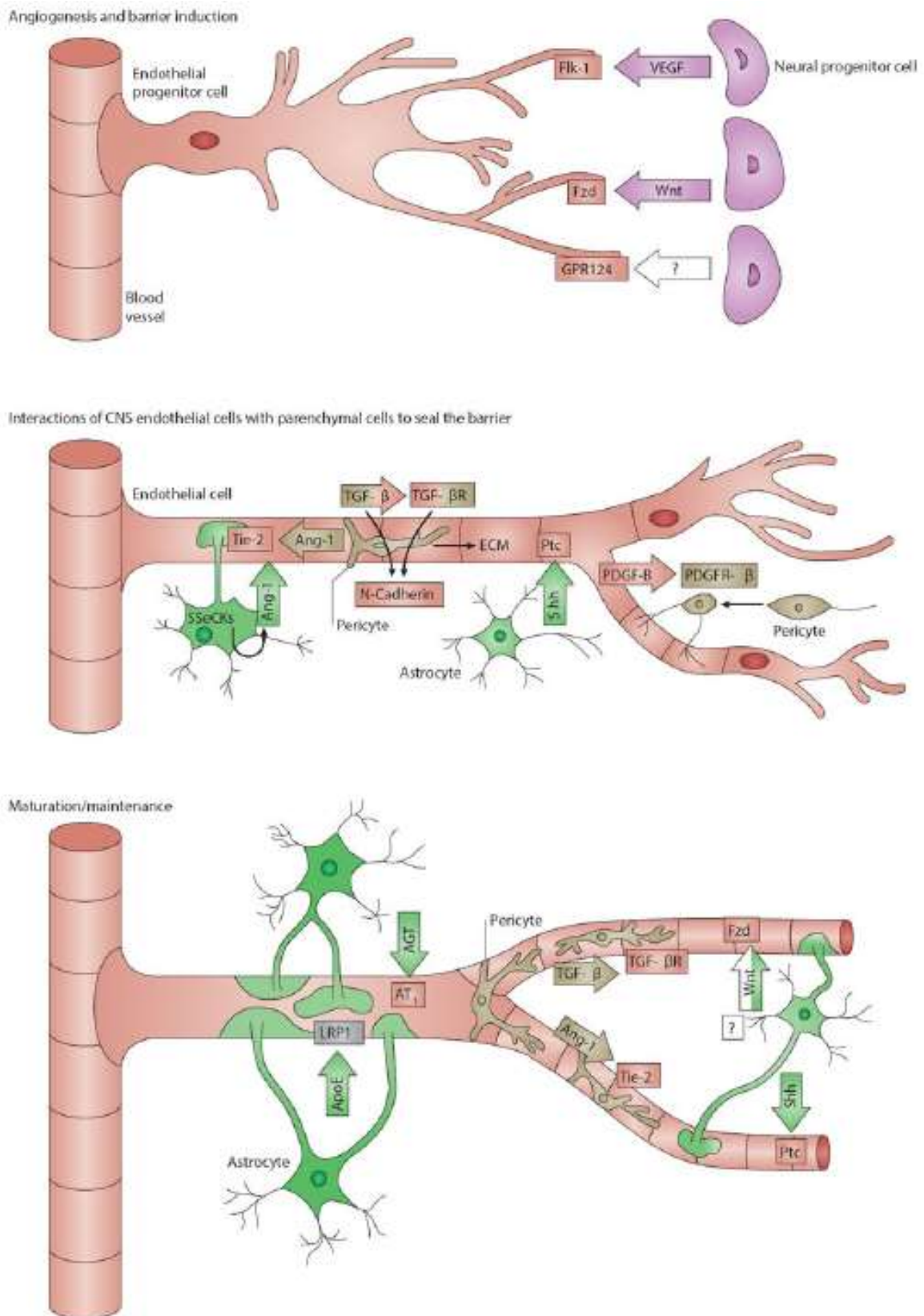


Figure 11 : Schéma général de la formation et du développement de la BBE.
(Obermeier, Daneman, 2013)

La *première étape* du développement de la BHE est l'angiogenèse qui est un processus visant à la formation de néovaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Celle-ci est contrôlée par divers activateurs et facteurs angiogéniques. Dans cette étape, les néovaisseaux et les cellules endothéliales progénitrices occupent le neuroectoderme embryonnaire. Les cellules neurales progénitrices vont ensuite sécréter des facteurs tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) servant de signal aux cellules endothéliales exprimant le récepteur « foetal liver kinase-1 » Flk-1 et le ligand Wnt se liant aux récepteurs Frizzled (Fzd) impliqués dans la migration des cellules endothéliales dans le tissu neural embryonnaire (Shalaby, Rossant et al., 1995). Enfin, le récepteur endothélial Gpr124 régulant la migration des cellules endothéliales et l'expression de Glut-1 sont également indispensables pour la germination angiogénique (Zlokovic 2008).

La *deuxième étape* concerne la phase de différenciation et l'implication des péricytes et des astrocytes dans le développement et les propriétés de la BHE. Les cellules endothéliales issues des néovaisseaux sécrètent le facteur de croissance b (Pdgf-b) dans le but de recruter les péricytes exprimant le récepteur Pdgfr- β , le facteur de croissance transformant β (Tgf- β) et son récepteur (Tgf- β R) ainsi que la N-cadhérine endothéliale, impliqués dans l'interaction entre les cellules endothéliales et les péricytes. Les péricytes vont également relarguer des composants de la MEC nécessaires à la formation de la lame basale. Une fois en place, les péricytes et les astrocytes vont limiter la perméabilité de la BHE et remodeler l'endothélium vasculaire en activant le substrat de la C-kinase inhibée par le Src (SSECKS) menant à la production de l'angiopoiétine-1 (Ang-1) et de son récepteur tyrosine kinase endothélial Tie2 ainsi que la protéine Sonic Hedgehog (Shh) activant la signalisation Hh dans les cellules endothéliales via le récepteur Patched-1 (Ptc1) (Alvarez, Dodelet-Devillers et al., 2011). Ces diverses interactions conduisent au développement des JS, à la perte des molécules d'adhésion leucocytaire et à l'inhibition de la transcytose.

La *dernière étape* consiste en la maturation et le maintien de la BHE avec la redistribution des protéines des JS et leur scellement. L'ensemble des éléments cellulaires à savoir les astrocytes, les péricytes, les cellules endothéliales et la MEC participent donc à la formation et la maturation de la BHE et des JS indispensables au maintien de l'unité neurovasculaire (Zlokovic 2008, Obermeier, Daneman, 2013).

2.2. L'unité neurovasculaire

L'unité neurovasculaire est constituée de plusieurs types cellulaires en étroite association, travaillant ensemble pour maintenir une fonction cérébrale optimale. Les cellules endothéliales cérébrales, qui sont les cellules clés de la BHE forment des JS qui restreignent la voie paracellulaire. Les péricytes enveloppent partiellement les cellules endothéliales et partagent avec elles une lame basale commune encore appelée MEC. Les pieds astrocytaires enveloppent la paroi du microvaisseau. Les péricytes et les astrocytes sont importants dans l'induction et le maintien de la barrière, et les astrocytes sont en lien direct avec les neurones. Enfin, les microglies sont des cellules immunitaires qui résident dans le SNC (**Figure 12**) (Abbott, Rönnbäck, 2006).

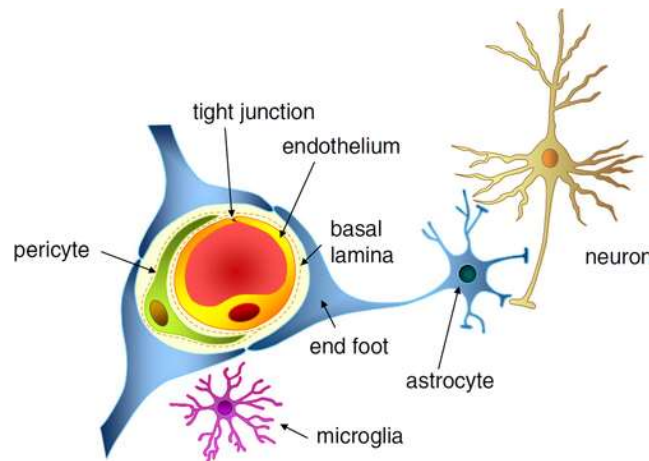


Figure 12 : Schéma général de la structure cellulaire de la BHE.

(Abbott, Rönnbäck, 2006)

2.2.1. Les cellules endothéliales cérébrales

Les cellules endothéliales tapissent l'intérieur de la paroi des capillaires sanguins. Les cellules endothéliales microvasculaires du SNC sont extrêmement minces (**Figure 12**). En effet, elles seraient 39% moins épaisses que les cellules endothéliales retrouvées au niveau du muscle (Daneman and Prat 2015). Elles se caractérisent par la présence de transporteurs membranaires polarisés, de récepteurs responsables du transport actif de nutriments et de l'efflux des substances potentiellement toxiques et d'aquaporines qui sont des canaux spécialisés pour le passage de l'eau, nécessaires pour la régulation de la quantité d'eau au sein du cerveau (Hawkins, Eggleton, 2005,

Abbott, Patabendige, 2010, Yang, Mei et al., 2017). Anatomiquement, les cellules endothéliales de la BHE se distinguent de celles de la périphérie par la présence des JS (Kniesel and Wolburg 2000), le manque de fenestrations (Fenstermacher, Gross et al., 1988), la quantité élevée de mitochondries entraînant une activité énergétique cellulaire et une biogenèse mitochondriale importantes (Oldendorf, Cornford et al., 1977) et l'activité pinocytotique minimale. Ces caractéristiques restreignent considérablement le mouvement transcellulaire de solutés médié par des vésicules (Sedlakova, Shivers et al., 1999). Au niveau cérébral, les cellules endothéliales ont une structure particulièrement étanche. En effet, celles-ci sont liées une à une par de solides liaisons, appelées jonctions serrées (JS), qui rendent imperméable l'espace entre cellules et empêchent très fortement les échanges et transports paracellulaires. Plusieurs types de protéines membranaires les ceinturent afin d'assurer cette étanchéité. Les cellules endothéliales sont également entourées par une couche protéique, la lame basale (Ballabh, Braun, 2004, Hawkins and Davis 2005, Abbott, Patabendige, 2010). De manière intéressante, au niveau de la BHE, l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) est exprimé de manière constitutive alors que l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1) est surexprimé suite à l'activité des astrocytes en induisant un environnement pro-thrombotique (Hultman, Blomstrand et al., 2010).

2.2.2. Les péricytes

Les péricytes sont des cellules périvasculaires d'origine mésodermique localisées au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires qu'elles entourent par de longs prolongements circonférentiels et cytoplasmiques (**Figure 12**). Les péricytes forment avec les CML ce qu'on appelle les cellules murales (Daneman and Prat 2015). Le système vasculaire cérébral possède une couverture de péricytes significativement plus élevée que les vaisseaux périphériques (Keaney and Campbell 2015). Les péricytes sont espacés le long de la partie externe des capillaires. Le cytoplasme des péricytes contient des microtubules qui s'étendent dans l'axe des prolongements primaires. Les plaques d'adhésion focales assurent un solide ancrage mécanique des péricytes avec l'endothélium. Ils joueraient un rôle essentiel dans la sécrétion des taux de protéines de la MEC, et dans la régulation de l'étanchéité et de l'intégrité de la BHE. En effet, ils vont soit permettre le passage des molécules qui n'affectent pas le cerveau, soit

empêcher le passage de toutes molécules pouvant induire des lésions au cerveau. De plus, ils comportent une proportion importante de protéines de structure telles que l'actine, la tropomyosine, la myosine. Ces différentes structures permettent à ces péricytes de se contracter et de moduler le diamètre des capillaires, et ainsi de réguler localement la pression et le débit sanguin. En effet, une étude de Hall et de ses collaborateurs a mis en évidence le rôle essentiel des péricytes dans la régulation du flux sanguin cérébral via le glutamate. Ce neurotransmetteur favorise la libération de messagers tels que la prostaglandine E2 et l'oxyde nitrique qui participent à la dilatation des capillaires en relaxant activement les péricytes (Hall, Reynell et al., 2014). Entre les péricytes et les cellules endothéliales sous-jacentes, il existe des jonctions communicantes reliant directement par leur canal les deux cytoplasmes via le facteur de croissance transformant b et son récepteur (TGFRb), et permettant l'échange d'ions et de petites molécules entre les deux types cellulaires. Les péricytes posséderaient aussi un rôle dans l'angiogenèse ainsi qu'un rôle immunitaire (Daneman and Prat 2015, Keaney and Campbell 2015).

2.2.3. La MEC

Le microvaisseau est enveloppé de deux types de lames basales : la lame basale vasculaire interne et le parenchyme externe. La lame basale interne est sécrétée par les cellules endothéliales et les péricytes tandis que celle du parenchyme externe est majoritairement sécrétée par les astrocytes. Cette MEC épaisse de 30 à 40 nm se compose de plusieurs types moléculaires dont la laminine, les collagènes de type IV, les protéoglycanes dont les héparanes sulfates et d'autres glycoprotéines comme la fibronectine extrinsèque interagissant avec le collagène et les protéoglycanes et le nidogène lié à la laminine et au collagène. La lame basale est liée aux cellules endothéliales. De ce fait, elle joue également un rôle de barrière supplémentaire aux molécules voulant accéder au tissu cérébral (Hawkins and Davis 2005, Daneman and Prat 2015).

Il a été démontré que la MEC est remodelée par une famille d'enzymes protéolytiques neutres dépendantes du calcium et contenant du zinc appelées métalloprotéinases matricielles (MMP), dans le but de favoriser la migration cellulaire et l'élongation axonale. Elles sont également impliquées dans l'élimination de débris après une blessure, l'angiogenèse, les processus de formation des oligodendrocytes et le relargage

de facteurs de croissance ancrées dans la MEC (Yong, Krekoski et al., 1998). La famille des MMP se compose d'au moins 20 membres qui ont un propeptide commun et des domaines catalytiques en N-terminal (Vincenti 2001). La catégorisation des MMP est basée sur les répétitions de type fibronectine, les domaines transmembranaires et des domaines de type hémopexine en C-terminal. A partir de là, celles-ci sont classées dans des sous-familles, que sont les collagénases, les gélatinases, les stromélysines et les MMP de type membranaire (Yong, Krekoski, 1998). En condition physiopathologique, les MMP peuvent engendrer une dégradation de la MEC induisant un dysfonctionnement et une altération de l'intégrité structurelle de la BHE (Bauer, Bürgers et al., 2010, Turner and Sharp 2016). En effet, les MMP vont collectivement dégrader les protéines impliquées dans la structure de la MEC, comme les collagènes interstitielles, les collagènes de la MEC, la fibronectine, la laminine, l'élastine et les protéoglycanes (Vincenti 2001). De plus, elles vont avoir un impact sur la démyélinisation, la production et la propagation de cytokines pro-inflammatoires et le dépôt de protéines amyloïdes (Fingleton 2017). Il existe trois moyens pour réguler l'activité enzymatique des MMP : par la transcription des gènes, par l'activation de la proenzyme ou encore par l'action de quatre protéines inhibitrices connues sous le nom d'inhibiteurs tissulaires des MMP (TIMP), allant de TIMP-1 à TIMP-4 (Yong, Krekoski, 1998, Vincenti 2001). De plus, il a été démontré que les plasminogènes circulants peuvent être clivés en plasmine via l'action du t-PA ou l'urokinase sous le contrôle de PAI-1, induisant une augmentation de l'activité enzymatique des MMP (Delbosc, Glorian et al., 2008).

2.2.4. Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales du SNC. Elles ont généralement une morphologie plus ou moins ramifiée avec une forme étoilée, contiennent un noyau ovoïde et très peu de cytoplasme (**Figure 12**). Les prolongements cytoplasmiques des astrocytes ou pieds astrocytaires enveloppent les vaisseaux sanguins au niveau du système nerveux. Ils se composent de plusieurs protéines telles que la dystroglycane, la dystrophine et l'aquaporine, qui participent au maintien de l'architecture cellulaire, en reliant le cytosquelette des pieds astrocytaires à la lame basale et à la régulation de l'homéostasie de l'eau au niveau du SNC (Daneman and Prat 2015, Cohen-Salmon, Slaoui et al., 2020). Les astrocytes servent de relais entre les circuits neuronaux et les

vaisseaux sanguins. De ce fait, ils aident les neurones dans le contrôle des concentrations de neurotransmetteurs et d'ions via des jonctions lacunaires ou GAP, afin de maintenir l'équilibre homéostatique de l'activité et de l'environnement neuronal par modulation synaptique (Keaney and Campbell 2015). Il a été démontré que ces cellules nerveuses ne jouent pas un rôle dans l'induction initiale de la BHE mais qu'elles sécrètent des facteurs régulant la fonction et le maintien de la BHE une fois formée (Oldendorf, Cornford, 1977). En plus de leur participation dans la mise en place des JS plus complexe et dans l'augmentation de la TEER par l'intermédiaire de signaux au niveau de la BHE, les astrocytes sont également capables de contrôler la vasoconstriction et la vasodilatation des vaisseaux sanguins, régulant ainsi le débit sanguin afin de gérer le prélèvement des substances en fonction des besoins. Les astrocytes jouent également un rôle dans la défense immunitaire, la réparation et la cicatrisation cérébrale après une lésion (Daneman and Prat 2015, Keaney and Campbell 2015). Par ailleurs, les astrocytes expriment la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), généralement observée par la technique d'immunohistochimie et référencée comme marqueur de l'activation astrocytaire ou astrocytose en condition inflammatoire.

2.2.5. Les neurones

Les neurones encore appelés cellules nerveuses sont les unités fonctionnelles du système nerveux et forment le tissu nerveux avec les cellules gliales (**Figure 12**). Ce sont des cellules largement impliquées dans la communication intercellulaire. En effet, les neurones ont la capacité de recevoir, de traiter et de transmettre les informations sous forme de signaux électriques. Il a été démontré que la communication des neurones avec les cellules gliales et endothéliales est essentielle pour leur survie et leurs fonctions. Les neurones sont capables d'innover directement l'endothélium vasculaire, mais également d'interagir avec les astrocytes via des terminaisons nerveuses noradrénergiques, sérotoninergiques et cholinergiques (Hawkins, Eggleton, 2005). Selon les besoins métaboliques, les neurones sont capables de moduler certaines fonctions des cellules endothéliales, notamment la perméabilité, en activant des enzymes exprimées par les cellules endothéliales mais aussi en libérant des facteurs

de croissance dans le but de stimuler l'angiogenèse (Tontsch and Bauer 1991, Zlokovic 2008).

2.2.6. Les cellules immunitaires

Les deux principaux types de cellules immunitaire retrouvées au niveau du SNC sont les macrophages périvasculaires et les cellules microgliales. Les macrophages périvasculaires sont des monocytes qui se retrouvent du côté externe du tube vasculaire (Daneman and Prat 2015). Ces cellules sont capables de traverser la BHE et représentent la première ligne d'immunité innée en phagocytant les débris cellulaires. Les cellules microgliales sont les cellules immunitaires dérivant de précurseurs hématopoïétiques, migrantes et résidentes dans le SNC. Les microglies agissent comme la principale ligne de défense du cerveau et interviennent dans la réponse immunitaire innée du SNC, mais également dans la régulation du développement neuronal et dans les processus de blessure en tant que cellules présentatrices d'antigènes en immunité adaptative (Streit, Conde et al., 2005, Ajami, Bennett et al., 2007). La microglie peut survenir dans l'un de ces deux cas : dans la classique voie des M1 activés, où les microglies vont libérer des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 beta (IL-1 β) et TNF- α , ou dans la voie alternative M2 où les microglies vont agir sur la réparation tissulaire, la phagocytose des neurones endommagés en libérant des chimiokines et des facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Fujiwara and Kobayashi 2005, Keaney and Campbell 2015).

2.3. Le complexe jonctionnel

Le complexe jonctionnel de la BHE regroupe les JS et les jonctions d'adhérence (JA), et éventuellement des jonctions lacunaires ou GAP. Les JS interviennent structurellement dans la liaison des feuillettes externes de la membrane plasmique des cellules endothéliales adjacentes. Le nombre de brins de JS ainsi que la fréquence de leurs ramifications peuvent être variables (Hawkins and Davis 2005). Les JS jouent également un rôle déterminant dans la polarité fonctionnelle des cellules endothéliales entraînant une ségrégation des domaines apicaux et basaux avec différentes expressions des canaux ioniques et des transporteurs aux niveaux luminal et abluminal de la membrane (Benarroch 2012). Les JA sont composées d'un complexe cadhérine -

caténine et celui-ci est associé à des protéines. Les JS se composent de trois protéines membranaires que sont les claudines, les occludines, et les « junctional adhesion molecules » (JAM), et d'un certain nombre de protéines accessoires cytoplasmiques dont les zona occludens (ZO) (**Figure 13**). Ces protéines cytoplasmiques participent à la liaison des JS au cytosquelette d'actine qui est nécessaire au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle de l'endothélium (Ballabh, Braun, 2004, Abbott, Patabendige, 2010).

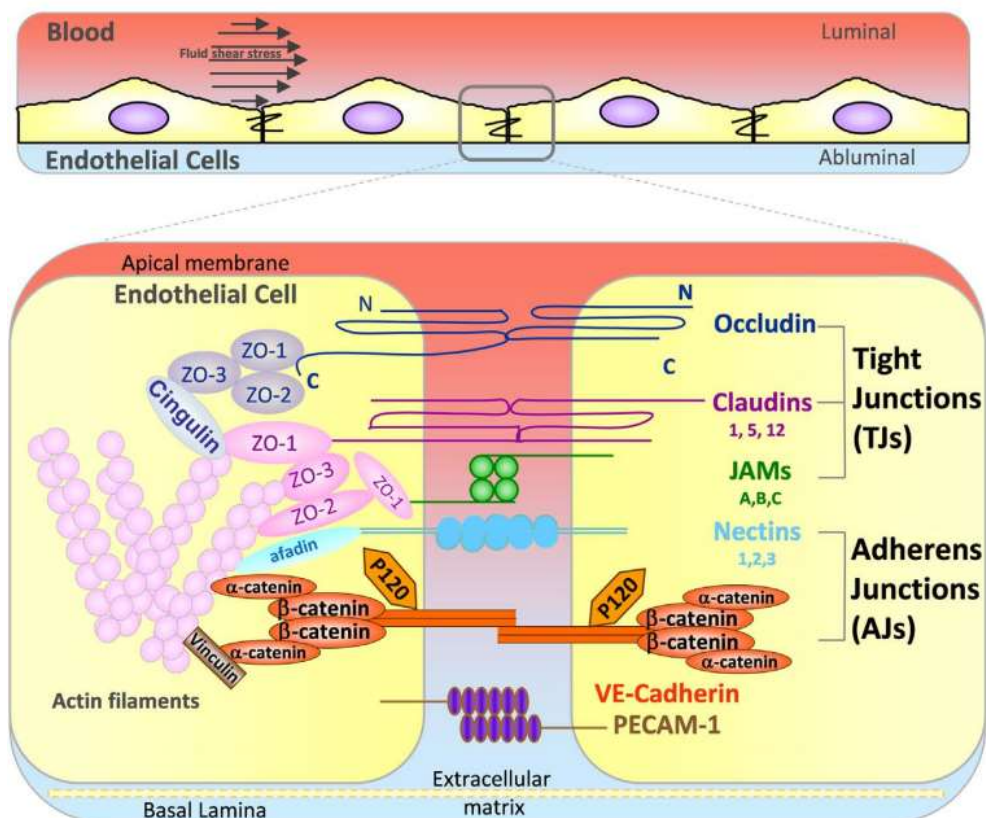


Figure 13 : Schéma de la structure des jonctions serrées de la BHE.

JAMs : junctional adhesion molecules ; **PECAM-1** : platelet endothelial cell adhesion molecule-1 ; **ZO1-3** : zona occludens 1-3
(Cerutti and Ridley 2017)

2.3.1. Les protéines des JA

La composante principale des JA est la cadhérine de l'endothélium vasculaire (**VE-cadhérine**), encore appelée CD144, qui est une protéine transmembranaire régulée

par le Ca^{2+} . Celle-ci est fortement liée aux filaments d'actine grâce à sa partie intracellulaire via des caténines. La VE-cadhérine est indirectement liée aux filaments d'actine par un complexe de protéines y compris les nectines, les α - et β -caténines, la plakoglobine (γ -caténine), la p120-caténine, vinculine et l' α -actinine via sa queue cytoplasmique (**Figure 13**) (Yamada, Pokutta et al., 2005, Cerutti and Ridley 2017). La molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires 1 (**PECAM-1**), également connue sous le nom de CD31 et le **CD99** sont des protéines transmembranaires qui ne sont pas directement impliquées dans le maintien de la BHE. Même si elles ne font pas partie intégrante du complexe jonctionnel, elles sont fortement impliquées dans la migration des leucocytes à travers l'endothélium induisant une perte de la perméabilité de la barrière endothéliale (Zlokovic 2008, Torzicky, Viznerova et al., 2012).

2.3.2. Les protéines des JS

L'**occludine** a été la première protéine membranaire découverte par l'équipe de Furuse et al., en 1993 (Furuse, Hirase et al., 1993). C'est une protéine d'environ 60 kDa. Elle possède quatre domaines transmembranaires avec les extrémités C-terminale et N-terminale orientées vers le cytoplasme, formant ainsi deux boucles extracellulaires qui enjambent la fente intercellulaire. Les occludines sont fortement exprimées dans un motif continu distinct le long des cellules endothéliales. Ce sont des composantes extracellulaires des JS qui ont pour rôle de limiter la perméabilité aux molécules. Les occludines augmentent la résistance électrique dans les tissus contenant des JS, une propriété médiée par la seconde boucle extracellulaire du domaine. Les occludines ont plusieurs sites pour la phosphorylation de sérines et de thréonines. L'état de phosphorylation des occludines semble être impliqué dans la régulation de leur association avec la membrane cellulaire, bien que les mécanismes précis varient selon les tissus et les espèces. Le domaine cytoplasmique C-terminal est probablement impliqué dans l'association des occludines avec le cytosquelette par l'intermédiaire de protéines accessoires, comme les ZO (**Figure 13**). L'expression de la région C-terminale tronquée des occludines engendre une augmentation de la perméabilité paracellulaire des molécules à faible poids moléculaire. Des études sur des modèles de souris « knock-out » ont montré que les occludines ne sont pas indispensables pour la formation des JS, malgré le fait que la diminution de l'expression des occludines est

associée à la perturbation de la BHE dans un certain nombre de maladies (Ballabh, Braun, 2004, Hawkins and Davis 2005, Abbott, Patabendige, 2010).

Les **claudines** ont une topographie proche de celle des occludines (quatre domaines transmembranaires), mais elles n'ont aucune homologie de séquence. Les claudines sont des protéines de 20 à 24 kDa, dont au moins 25 membres ont été identifiés chez les mammifères. Toutes les claudines possèdent une homologie de séquence élevée entre elles dans le premier et le quatrième domaines transmembranaires et dans les boucles extracellulaires (**Figure 13**). Les boucles extracellulaires de claudines interagissent via des interactions homophiles et hétérophiles entre les cellules. Ainsi, il est émis l'hypothèse que les claudines forment le « joint d'étanchéité » primaire des JS et les occludines agissent comme une structure de support supplémentaire (Hawkins and Davis 2005).

La région C-terminale des claudines se lie aux protéines cytoplasmiques incluant ZO-1, ZO-2, et ZO-3, qui forment un hétérodimère. Les **ZO** sont des protéines intracellulaires appartenant à la famille des « membrane associated guanylate kinase-like protein » (MAGUK) et jouent un rôle crucial pour la stabilité du complexe jonctionnel (**Figure 13**). Les ZO sont responsables de la liaison entre les filaments d'actine et les JS et JA. Ces protéines se lient aux domaines C-terminaux des JS, grâce à leurs domaines PDZ et GUK (Itoh, Furuse et al., 1999). Des protéines « accessoires » impliquées dans les interactions entre le cytosquelette et les JS, interviennent également dans le maintien du complexe jonctionnel, comme la cinguline et l'afadine (AF-6) (Yamada, Pokutta, 2005).

Les **JAM** appartiennent à la superfamille des IgG et possèdent une taille de ~40 kDa. Les JAM se fixent de manière prématurée aux membranes de cellules adjacentes par l'intermédiaire d'interactions homophiles. Une JAM est composée d'une chaîne unique traversant la membrane avec un grand domaine extracellulaire (**Figure 13**). JAM-1 est spécifique des JS des cellules épithéliales et endothéliales et est impliquée dans la régulation de l'intégrité et de la perméabilité jonctionnelle. Elle peut également se lier de manière hétérophile car elle sert de ligand à l'intégrine LFA-1 (CD11a) et joue un rôle clé dans le processus de la transmigration des leucocytes (Woodfin, Reichel et al., 2007). Les protéines JAM-2 et JAM-3 sont également présentes dans les tissus et les

cellules endothéliales lymphatiques, mais pas au niveau de l'épithélium (Hawkins and Davis 2005, Abbott, Patabendige, 2010).

Il existe également des jonctions communicantes au niveau de la BHE appelées **GAP junctions**. Ces jonctions sont des canaux intercellulaires favorisant la liaison entre les cytoplasmes des cellules endothéliales adjacentes et le passage des molécules de petite taille c'est-à-dire <1000 Da, comme les ions Ca^{2+} . Les petites molécules vont passer par un canal central formé de deux hexamères de connexines, composées de 4 domaines transmembranaires, d'une boucle intracellulaire et d'une boucle extracellulaire (Griffith, Chaytor et al., 2004). Les principales connexines retrouvées sont les Cx37, Cx40 et Cx43.

2.3.3. Régulation des JS

Au cours des dernières décennies, plusieurs études ont mis en avant les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la formation des JS. En effet, la phosphorylation des résidus tyrosine des protéines jonctionnelles, plus particulièrement ZO-1 et occludine, mène à une diminution de la TEER et de la perméabilité (Wachtel, Frei et al., 1999). Le Ca^{2+} agissant intracellulairement et extracellulairement est aussi connu pour réguler l'activité des JS. Le Ca^{2+} intracellulaire joue un rôle dans le contact entre deux cellules endothéliales adjacentes sur la résistance électrique, la migration de ZO-1 et sur l'assemblage des JS. Lorsque le Ca^{2+} extracellulaire est réduit, il y a une diminution importante de la résistance électrique à travers la membrane ou encore de l'interaction de la VE-cadhérine ainsi qu'une augmentation de la perméabilité, impliquant la voie de signalisation de la PKC (Stuart and Nigam 1995, Stuart, Sun et al., 1996). PKC est le principal régulateur de la formation des JS. En effet, elle joue un rôle essentiel dans l'entretien physiologique et la réponse pathologique des JS, mais également dans la mise en place de la polarité des cellules, indispensable pour la différenciation et la fonctionnalité de la BHE (Izumi, Hirose et al., 1998). D'autres études ont mis en avant le rôle neuroprotecteur du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR- γ) dans la régulation des JS à la suite de lésions ischémiques cérébrales ou des hémorragies intracérébrales (Wu, Tsai et al., 2016). En effet, selon une étude de Zhao et al., PPAR- γ réduit l'altération et la perte de la perméabilité de la BHE induites par une hypoxie

combinée à une déprivation en glucose. PPAR- γ agit en réduisant la libération d'agents inflammatoires tels que TNF- α , IL-1 β et IL-6, et en favorisant le maintien des JS comme ZO-1, claudine-5 et occludine (Zhao, Zhang et al., 2019).

2.4. Les systèmes de transports au niveau de la BHE

La BHE joue aussi bien un rôle physiologique qu'anatomique. Les gaz c'est-à-dire le dioxygène et le dioxyde de carbone, ainsi que les substances liposolubles peuvent librement la traverser selon leur gradient de concentration. Au niveau cérébral, le mode d'échange transcellulaire est celui qui est privilégié. Les molécules polaires (ionisées, hydrophiles), elles, ne peuvent diffuser que grâce à des mécanismes de transport actif qui font appel à des canaux et des pompes spécifiques et qui ne se font qu'en fonction des besoins (**Figure 14**) (Abbott, Patabendige, 2010).

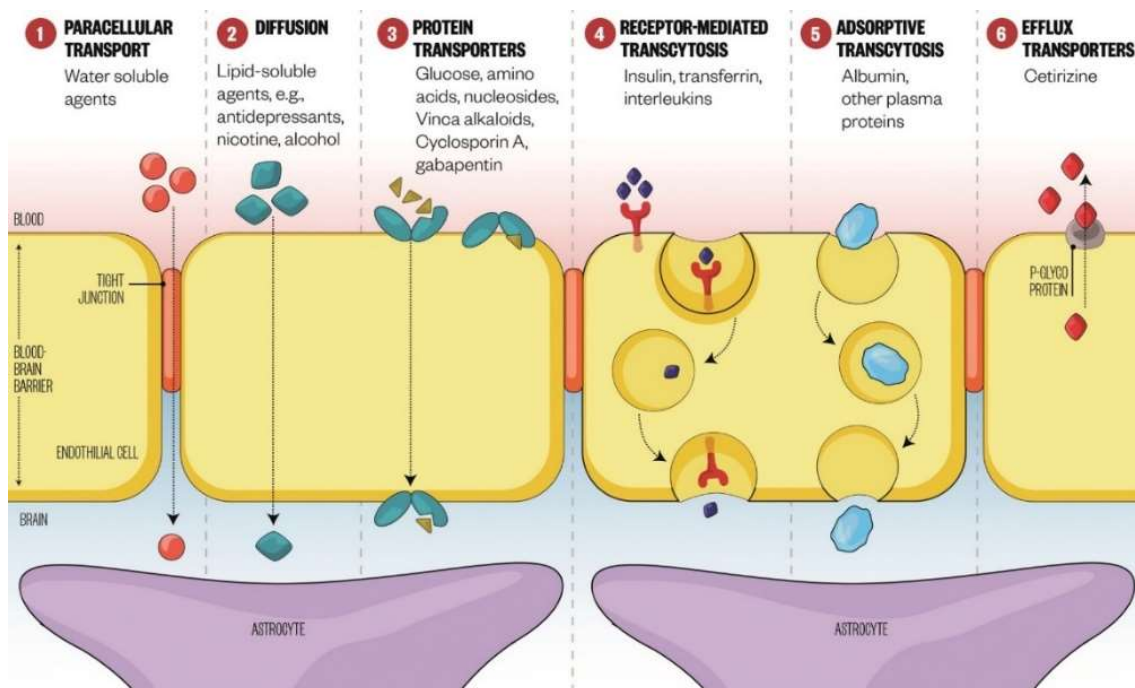


Figure 14 : Mécanismes de transport de la BHE.

(Brazil 2017)

2.4.1. Le transport passif

2.4.1.1. Le transport paracellulaire

L'identification de l'ultrastructure de la BHE a permis une compréhension claire du trafic réglementé de substances à travers la barrière. En condition physiologique normale, au niveau de l'endothélium, les cellules endothéliales sont reliées entre elles de façon hermétique par les JS. Celles-ci limitent la diffusion paracellulaire uniquement aux très petites molécules polaires. Ces molécules sont, par exemple, l'eau, la glycérine ou l'urée (Hinow, Radunskaya et al., 2016, Kaya and Ahishali 2020).

2.4.1.2. La diffusion libre

Le passage par diffusion libre ou diffusion passive est le principal moyen pour la plupart des molécules et des composés thérapeutiques pour entrer dans le cerveau à partir de la circulation sanguine (**Figure 14**). Les petits agents apolaires hautement liposolubles avec des poids moléculaires inférieurs à 400 et 500 Da, tels que les antidépresseurs, traversent la BHE par diffusion à travers les cellules endothéliales. La nicotine, l'octanol, les molécules d'O₂ et de CO₂ sont également capables de la traverser (Abbott and Romero 1996). Cependant, cela n'est pas une garantie car un grand nombre de molécules respectant ces caractéristiques ne passent pas (Hinow, Radunskaya, 2016). Le passage de ces molécules à travers la BHE ne nécessite pas de consommation d'énergie, car elle est basée sur les différences de gradient entre le fluide extracellulaire et le sang.

2.4.1.3. La diffusion facilitée

Le transport par diffusion facilitée nécessite des transporteurs. En effet, il existe des canaux sélectifs de la BHE permettant le passage par diffusion facilitée mais ces canaux existent dans le reste du corps (**Figure 14**). Au niveau cérébral, on distingue quelques spécificités d'expression, tels que les transporteurs pour les hormones thyroïdiennes, le glucose, les vitamines, les acides aminés ou la cyclosporine qui sont surexprimés au niveau de la BHE (Abbott, Rönnbäck, 2006). Le glucose est indispensable au bon fonctionnement du cerveau, il est défini comme étant son carburant essentiel apportant tous les besoins énergétiques nécessaires. La protéine GLUT1 est responsable du transport du glucose au cerveau. En effet, le glucose présent dans le sang se lie à un transporteur localisé dans la membrane, qui change de conformation

et libère le glucose à l'intérieur de la cellule endothéliale. Le glucose traverse la cellule et, de l'autre côté, se lie de nouveau à un transporteur GLUT1, qui transporte la molécule dans le cerveau (Pardridge, Boado et al., 1990). La distribution asymétrique de GLUT1 au niveau de la BHE permet un contrôle homéostatique de l'afflux de glucose dans le cerveau en y empêchant son accumulation à des niveaux supérieurs à ceux retrouvés dans le sang (Zlokovic 2008). Les acides aminés sont également essentiels dans la synthèse de neurotransmetteurs. On note l'existence de deux types de transporteurs spécifiques d'acides aminés : les transporteurs neutres comme le L1 exprimés sur les faces luminale et abluminale et les transporteurs Na⁺-dépendants qui permettent un transport actif nécessitant de l'énergie, comme les systèmes A (alanine-preferring) et N (nitrogen-rich amino acids) retrouvés uniquement sur la face abluminale (Hawkins, Egleton, 2005).

2.4.1.4. La perméabilité par les canaux

Au niveau cérébral, il existe des canaux de type aquaporine (AQP), plus particulièrement les AQP-4 et -9, responsables du transport de l'eau, du glycérol et de l'urée. Les aquaporines sont des protéines transmembranaires formant des pores perméables aux molécules d'eau et permettent la régulation de l'économie en eau. Les astrocytes disposent d'une grande quantité d'AQP-4, au niveau des pieds astrocytaires en contact direct avec les cellules endothéliales cérébrales (Schrier 2007, Obermeier, Daneman, 2013) (**Figure 14**).

2.4.1.5. L'endocytose non spécifique

Le passage de grosses molécules à travers les cellules endothéliales peut se faire également via la formation de vésicules d'endocytose. Ce système de transport est plus utilisé au niveau des capillaires périphériques. En effet, la membrane plasmique se déforme en puits autour de la molécule en formant des vésicules, se referme et se détache du milieu (**Figure 14**).

2.4.1.6. La transcytose

La transcytose permet le passage de macromolécules à travers la barrière endothéliale. Il existe deux types de transport par transcytose : la transcytose par des récepteurs et la transcytose par adsorption (**Figure 14**). La transcytose par des récepteurs est spécifique à la BHE et permet le passage de grosses molécules telles que les LDL, l'insuline, la transferrine et les cytokines par un mécanisme d'endocytose : la membrane plasmique se replie sur elle-même en internalisant la molécule liée à son récepteur en formant des vésicules qui sont transportées vers le côté abluminal. Les vésicules expulsent ensuite les molécules sans le récepteur. Il existe deux sortes de vésicules, celles qui sont recouvertes de clathrine ou les cavéoles (Galley and Webster 2004, Benarroch 2012). Dans le système de transcytose par adsorption, les molécules chargées positivement vont interagir avec le glycocalyx de la membrane plasmique qui est chargé négativement, déclenchant ainsi une endocytose conduisant à la transcytose (Pardridge 1992).

2.4.2. Le transport actif via les pompes d'efflux

Les transports décrits ci-dessus ne nécessitent de la part de la cellule aucune contribution énergétique. Cependant, il existe des substances qui doivent être transportées contre le gradient de concentration via une consommation d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) dans le but d'actionner des systèmes de transport actif ou « pompes » (**Figure 14**). Ce genre de transport actif et les transporteurs polarisés associés vont permettre un transport actif de molécules ou de substances du sang vers le cerveau, on parle d'influx et en sens inverse, d'efflux, dans le cadre de l'élimination des déchets produits par le SNC vers le sang. Au niveau de la BHE, il existe quelques principaux transporteurs (**Figure 15**) (Daneman, Zhou et al., 2010, Keaney and Campbell 2015, Hinow, Radunskaya, 2016).

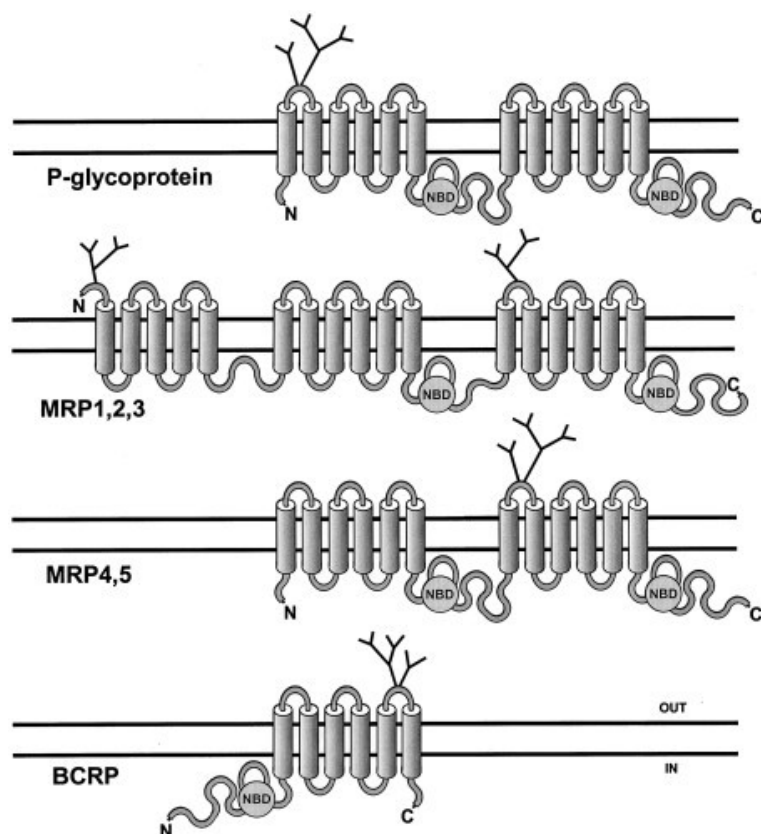


Figure 15 : Structure prédite des principaux transporteurs d'efflux présents au niveau de la BHE.

BCRP : breast cancer resistance protein ; **MRP 1-5** : multidrug resistance protein 1-5 (Schinkel and Jonker 2003)

2.4.2.1. La glycoprotéine P

La glycoprotéine p (P-gp) encore appelée ABCB1 est une glycoprotéine transmembranaire phosphorylée de 170 kDa. Elle se compose de deux parties similaires, contenant chacune 6 segments transmembranaires et un site de liaison intracellulaire à l'ATP (**Figure 15**) (Schinkel and Jonker 2003). Elle a été décrite pour la première fois en tant que transporteur ABC ou transporteur à cassette liant l'ATP causant des « multidrug resistance » (MDR) au niveau de la BHE en 1989 (Cordon-Cardo, O'Brien et al., 1989, Thiebaut, Tsuruo et al., 1989). Cette famille de transporteur, exprimée au niveau de la BHE, utilise l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie dans le but d'effectuer un transport actif en libérant un groupement phosphate et de l'ADP. La P-gp est impliquée dans la régulation de la captation et

l'exclusion rapide de médicaments ou de métabolites lipophiles toxiques ingérés au niveau du cerveau. Cette résistance aux drogues représente un obstacle majeur dans l'administration de produits à usage thérapeutique comme la chimiothérapie dans le traitement du cancer.

2.4.2.2. La MRP

En 1992, un deuxième transporteur causant la MDR a été découvert dans une lignée cellulaire hautement résistante à un médicament cytotoxique, la doxorubicine : il s'agit de la MRP-1 pour « multidrug resistance protein-1 » (Cole, Bhardwaj et al., 1992). MRP-4 et-5 qui font partie de la famille des MRP possèdent la même architecture globale que la P-gp. En revanche les MRP-1, -2 et -3 ont la même structure de base mais ont une extension N-terminale composée de 5 segments transmembranaires (**Figure 15**). Contrairement à la P-gp, la MRP-1 agit majoritairement comme un co-transporteur d'anions organiques amphipathiques et est capable de transporter des médicaments hydrophobes ou d'autres composés conjugués ou complexés (Schinkel and Jonker 2003).

2.4.2.3. La BCRP

La protéine BCRP pour « breast cancer resistance protein » ou ABCG2 est le transporteur ABC d'efflux de médicaments découvert le plus récemment, en 1998 par Doyle et ses collaborateurs, dans une lignée cellulaire de cancer du sein résistante à la chimiothérapie (Doyle, Yang et al., 1998). Elle possède 6 segments transmembranaires et devrait jouer un rôle de protection contre les xénobiotiques potentiellement nocifs (**Figure 15**). D'après des analyses d'ARNm, l'équipe d'Eisenblätter a démontré que la BCRP était plus fortement exprimée au niveau de la BBB que la P-gp ou la MRP-1 (Eisenblätter, Hüwel et al., 2003).

Ainsi, le mode de fonctionnement et les transporteurs d'efflux présents au niveau de la BHE démontrent pourquoi beaucoup de molécules, notamment des substances médicamenteuses ne peuvent pas accéder facilement au cerveau. Depuis quelques années, de nombreuses études ont démontré leur présence au niveau des cellules endothéliales cérébrales et ont mis en avant l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces transporteurs dans le but de limiter l'exclusion des drogues et de favoriser leur

action au niveau de la BHE (Cordon-Cardo, O'Brien, 1989, Sun, Dai et al., 2003, Figueira, Garcia et al., 2017). De plus, l'équipe de Poller et ses collaborateurs a démontré que les niveaux d'expression et l'activité de la P-gp et de la BCRP au niveau de la BHE sont altérés par une inflammation aiguë et que cela affecte la pénétration des substances au niveau cérébral (Poller, Drewe et al., 2010).

2.5. La production de molécules vasoactives

L'endothélium a longtemps été considéré comme une « couche de cellophane » inerte ayant des propriétés de barrière non réactives. Au fil des années et des études, il est dorénavant clairement établi que l'endothélium et plus particulièrement les cellules endothéliales sont métaboliquement actives avec d'importantes fonctions paracrine, endocrine et autocrine et participent à l'homéostasie et aux réactions immunitaires et inflammatoires. Elles jouent également un rôle majeur dans la régulation du tonus vasculaire via la production de diverses molécules vasodilatatrices (**Figure 16**) et vasoconstrictrices.

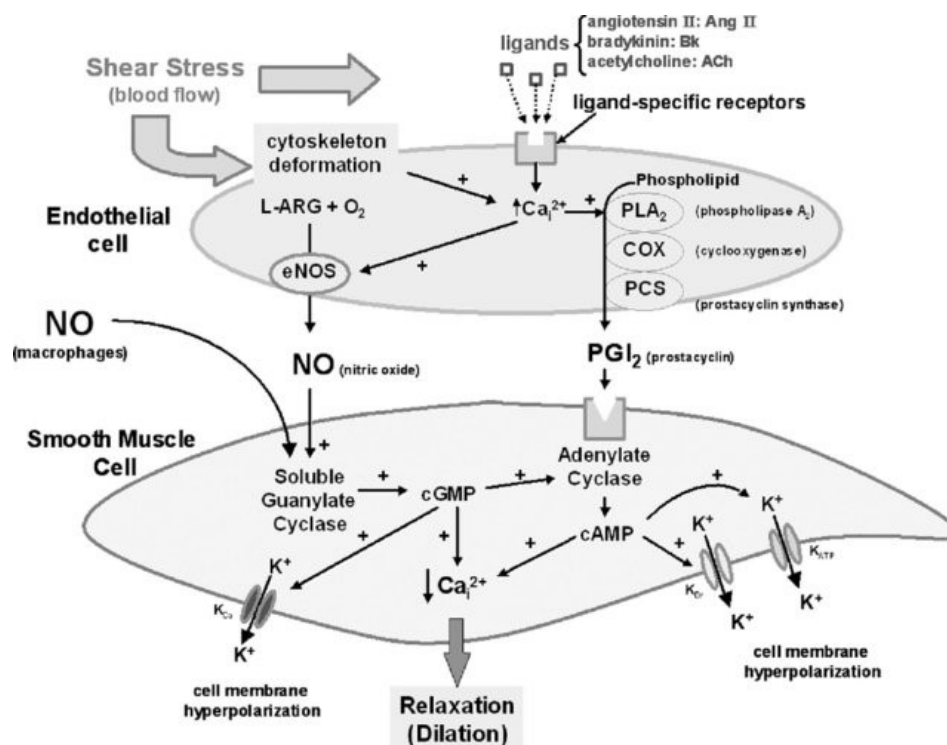


Figure 16 : Mécanismes impliqués dans la modulation du tonus vasculaire via la relaxation.

(Wideman, Chapman et al., 2004)

2.5.1. Les molécules vasodilatatrices majeures

2.5.1.1. La prostacycline ou prostaglandine

La prostacycline ou prostaglandine E₂ (PGE₂) fait partie de la famille des eicosanoïdes (Egan and FitzGerald 2006). Elle est synthétisée par les cellules endothéliales mais joue différents rôles en fonction des tissus et du type de prostaglandines exprimé. Elle résulte du catabolisme oxydatif de l'acide arachidonique libéré de la membrane phospholipidique par la phospholipase A₂ (PLA₂) et produit par les cyclooxygénases-1 et -2 (COX-1 et-2) et l'hydroperoxydase (HOX) dans l'endothélium. Les COXs sont responsables de la formation de l'intermédiaire PGG₂ puis du précurseur PGH₂ (**Figure 17**) (Egan, Lawson et al., 2004). Pour finir, PGE₂ est hydrolysé en 6-céto-PGF_{1α} sous forme stable et inactive (Egan and FitzGerald 2006). L'action de PGE₂ est médiée par des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) avec sept domaines transmembranaires. On les surnomme « récepteurs IP » pour rhodopsin-like GPCR. PGE₂ est également connue pour son action sur PPAR_γ (Falcetti, Flavell et al., 2007). PGE₂ active l'adénylate cyclase via une protéine G, entraînant une augmentation de la production d'AMPc et de la vasorelaxation des CML. La PGE₂ exerce plusieurs fonctions importantes nécessaire à l'homéostasie de l'endothélium vasculaire. Elle est définie comme étant un anti-agrégant à action vasodilatatrice et un agent antiprolifératif dans les CML. Elle atténue les stress oxydatif et réduit l'adhésion cellulaire au niveau de la paroi vasculaire (Egan and FitzGerald 2006).

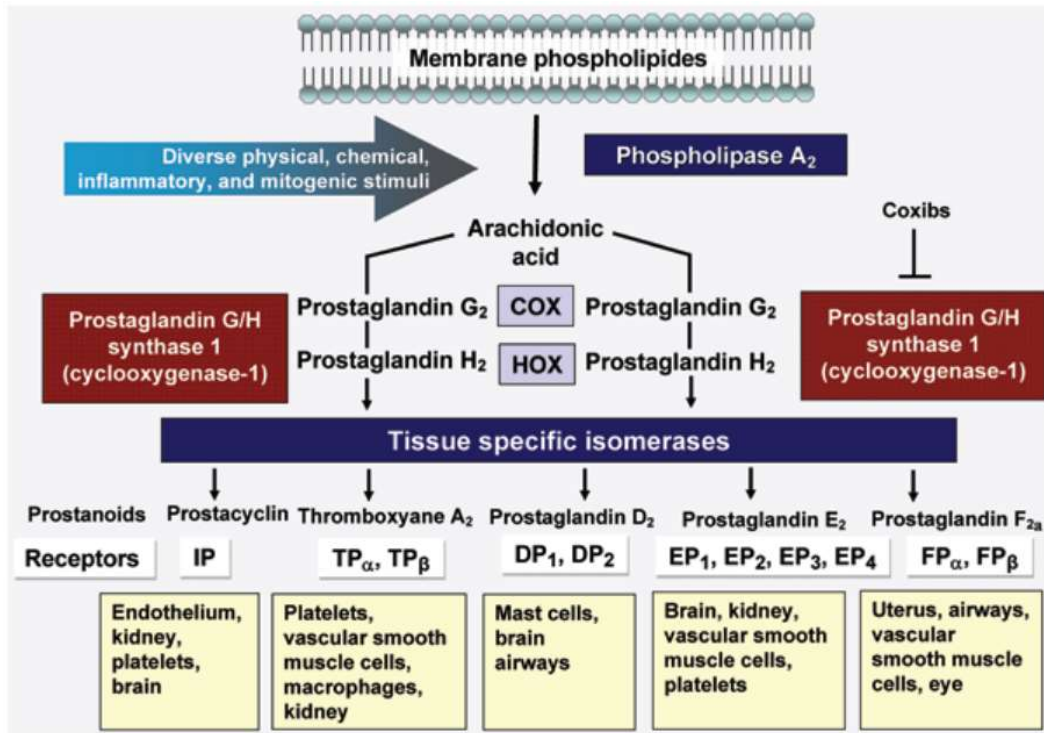


Figure 17 : Production et action des prostaglandines et thromboxanes.

(Hermes-DeSantis and Aranda 2007)

Des études ont mis en avant le rôle protecteur de la PGE₂ contre l'apparition d'athéromatose avec l'utilisation de modèles souris knock-out pour les récepteurs de la prostacycline. Les souris ont montré une réponse proliférative accrue à une lésion vasculaire carotidienne avec une augmentation du ratio entre l'intima et la media, d'une thrombose et d'une athérosclérose. Cela a fourni une première preuve que la prostacycline et son récepteur jouent un rôle important dans l'athéromatose (Murata, Ushikubi et al., 1997, Cheng, Austin et al., 2002, Egan, Lawson, 2004).

2.5.1.2. L'oxyde nitrique

L'oxyde nitrique (NO) joue un rôle crucial dans l'homéostasie vasculaire. Ce composé chimique gazeux est synthétisé dans les cellules endothéliales après conversion de la L-arginine en L-citrulline par une NOS pour « nitric oxide synthase » (Vallance and Chan 2001). Il existe trois isoformes de NOS, à savoir, la NOS neuronale (nNOS ou NOS₁), la NOS inductible (iNOS ou NOS₂) et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS₃). Elles sont composées d'une chaîne polypeptidique possédant plusieurs domaines

organisés autour de deux molécules d'hème. La eNOS et la nNOS sont appelées NOS constitutives alors que l'iNOS, elle, est majoritairement exprimée dans les phagocytes, tels que les monocytes, les macrophages et les neutrophiles (Nathan and Xie 1994). La nNOS produit du NO dans les tissus nerveux et les muscles squelettiques, alors qu'eNOS est principalement exprimée dans les cellules endothéliales des vaisseaux et des microvaisseaux sanguins. Elle joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. L'expression d'iNOS est induite par des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interféron gamma (IFN- γ) et TNF- α pour produire du NO et peut être associée à des réponses immunitaires ou inflammatoires à la suite d'une exposition à des agents pathogènes (Yang, Wu et al., 2015). Ces isoformes sont principalement exprimées dans le cytoplasme et les mitochondries pour la nNOS, dans la membrane plasmique et le cytoplasme pour la eNOS, et dans le cytoplasme pour l'iNOS (Jobgen, Fu et al., 2009).

Les NOS sont sécrétées à la suite d'un stress venant de la circulation sanguine ou de substances se liant à des récepteurs tels que l'acétylcholine, la bradykinine, l'angiotensine-II (Ang-II) ou encore la sérotonine. Les trois isoformes de NOS sont des enzymes dimériques dépendantes de plusieurs cofacteurs tels que la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN), la calmoduline, l'hème et la tétrahydrobioptérine (BH₄) par l'intermédiaire de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). L'augmentation des taux de Ca²⁺ cytoplasmiques induit la liaison de la calmoduline aux NOS. Cette enzyme utilise la L-arginine et l'oxygène moléculaire comme substrats ainsi que la NADPH réduite comme co-substrat (Vásquez-Vivar, Kalyanaraman et al., 1998). De nombreux types cellulaires sont capables de recycler la L-citrulline en L-arginine via l'argininosuccinate synthase (ASS) et l'argininosuccinate lyase (ASL), et ce cycle intracellulaire participe au maintien des concentrations d'arginine de manière suffisante, dans le but de gérer la production de NO (**Figure 18**) (Wu and Brosnan 1992).

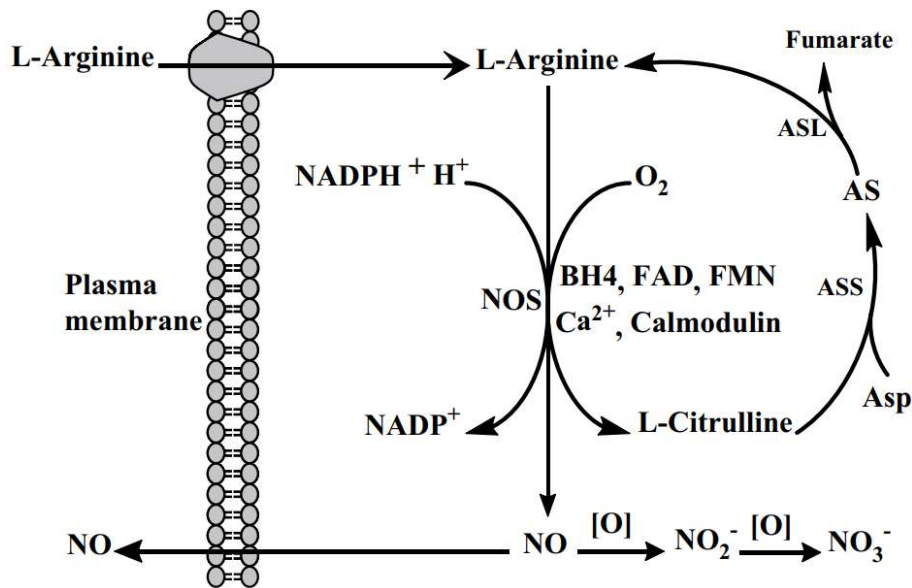


Figure 18 : Synthèse de NO à partir d'eNOS dans les cellules endothéliales.

AS : argininosuccinate ; **ASL** : argininosuccinate lyase ; **Asp** : l-aspartate ; **ASS** : argininosuccinate synthase ; **BH₄** : tetrahydrobiopterin

(Li, Bazer et al., 2009)

Le NO produit par l'eNOS dans les cellules endothéliales se diffuse vers les CML et active la guanylate cyclase soluble (GCs) produisant ainsi des niveaux importants de guanosine-3,5-monophosphate cyclique (GMPc) et la relaxation des CML via une diminution des taux de Ca²⁺ (**Figure 18**) (Joannides, Haefeli et al., 1995, Vallance and Chan 2001).

L'activité d'eNOS peut être régulée au niveau post-traductionnel, par phosphorylation de l'enzyme au niveau des résidus sérine ou thréonine. La phosphorylation d'eNOS est induite par la voie PI3K/Akt mais aussi par l'activité d'autres enzymes comme l'adénosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) ou encore la protéine kinase A (PKA) (Dimmeler, Fleming et al., 1999). En effet, quelques études ont démontré que la phosphorylation de la sérine 1177, dépendante d'Akt chez l'humain, induit une activation de l'activité d'eNOS (Fulton, Gratton et al., 1999, Yang, Nie et al., 2010), alors que la phosphorylation des thréonines 497 ou 495 engendre sa diminution (Bouloumié, Bauersachs et al., 1997).

L'activité enzymatique d'eNOS peut également être modulée par l'insuline possédant une action vasodilatatrice via la voie PI3K/Akt, en augmentant la synthèse de BH₄

(Muniyappa, Montagnani et al., 2007). La signalisation de l'insuline est transduite via deux voies : par la voie PI3K et par la voie MAPK, principalement impliquée dans la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire (Avruch 1998) (**Figure 19**). L'insuline stimule la production de NO dans les cellules endothéliales et la translocation de GLUT4 dans les tissus sensibles à l'insuline en activant eNOS via la voie PI3K. Dans le cadre de la résistance à l'insuline, cette voie est altérée et la production de NO est diminuée (Kim, Montagnani et al., 2006). En effet, l'insulinorésistance active la voie MAPK menant à un dysfonctionnement endothélial, avec la stimulation de la production d'un agent vasoconstricteur, l'endothéline-1, l'augmentation de PAI-1 et de l'expression des molécules d'adhésion (Muniyappa and Sowers 2013). En conclusion, l'insuline module le tonus vasculaire et le flux sanguin tissulaire à travers un mécanisme dépendant de NO.

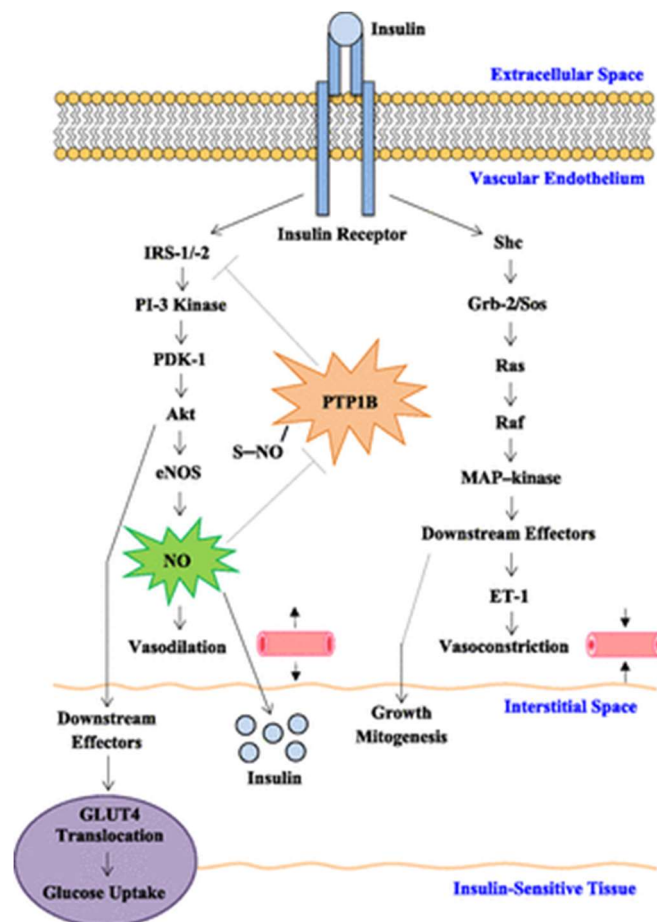


Figure 19 : Voie de transduction de l'insuline impliquée dans la modulation du tonus vasculaire.

(Richey 2013)

eNOS joue également un rôle dans l'adhésion et la migration des leucocytes, la prolifération des CML, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire, et s'oppose à l'apoptose et l'inflammation avec un effet antiathérogène. En effet, une diminution de l'expression d'eNOS et de la biodisponibilité de NO induit une dysfonction endothéliale (Oemar, Tschudi et al., 1998). Sachant que la durée de demi-vie du NO est très courte soit moins de 4 secondes, il est rapidement métabolisé en nitrite puis en nitrate, avant d'être excrété dans l'urine.

2.5.1.3. EDHF

Le facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium (EDHF) est défini comme étant une substance ou un signal électrique généré et libéré par l'endothélium, ayant un rôle dans la distribution du débit, la relaxation musculaire et vasculaire. La vasodilatation dans les plus petites artères est principalement médiée par l'EDHF des CML. Ce facteur agit en ouvrant des canaux K^+ , via l'utilisation de Ca^{2+} (**Figure 20**). En effet, l'hyperpolarisation des cellules endothéliales induit une activation des canaux small SK_{Ca} et intermediate IK_{Ca} dépendants du Ca^{2+} . Cette hyperpolarisation se passant au niveau des cellules endothéliales se propage le long de l'endothélium et est transmise aux CML soit par les GAP jonctions à travers les jonctions myo-endothéliales via les connexines (Cx37, Cx40 et Cx43) soit par le passage d'ions K^+ retrouvés dans l'espace intercellulaire via la pompe Na^+/K^+ ATPase, engendrant une diminution de Ca^{2+} et par conséquent une hyperpolarisation des CML (Harris, Martin et al., 2000).

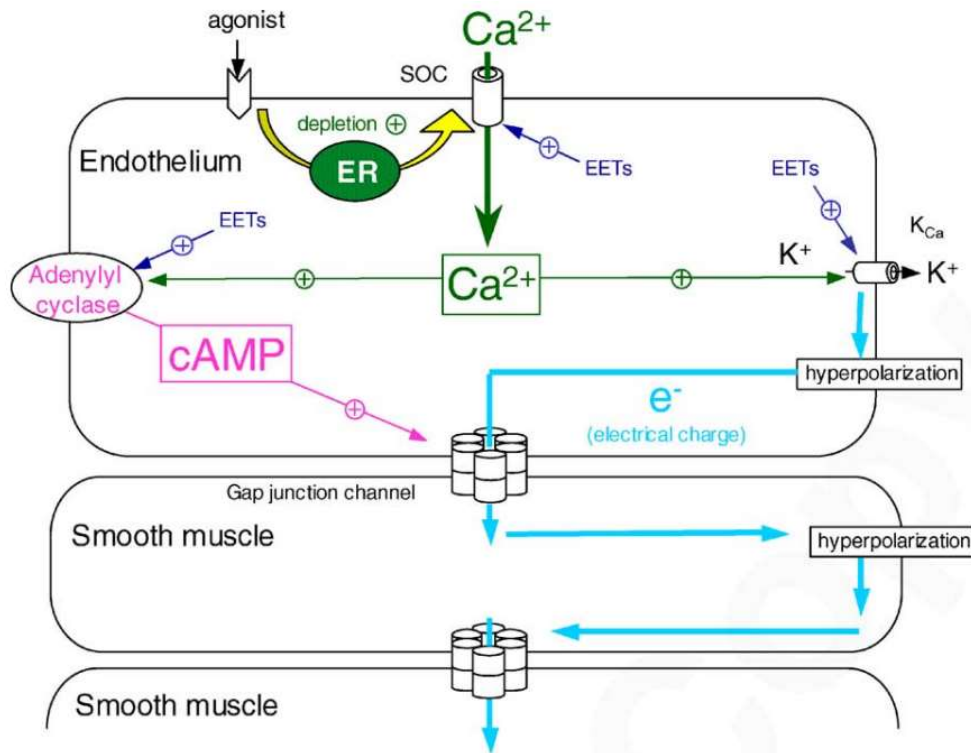


Figure 20 : Mécanismes impliqués dans l'hyperpolarisation de l'endothélium dépendante du Ca²⁺.

EETs : epoxyeicosatrienoic acids ; **ER** : endoplasmic reticulum ; **SOC** : a store-operated channels

(Griffith, Chaytor, 2004)

Dans certains vaisseaux, les métabolites de l'acide époxyeicosatriénoïque (EET), dérivé de l'acide arachidonique via l'action du cytochrome P450 époxygénase, peuvent induire l'hyperpolarisation par des effets directs sur les canaux K_{Ca} endothéliaux. L'augmentation du taux de Ca²⁺ cytosolique peut également élever les niveaux d'AMPC en stimulant l'adenylyl cyclase, ce qui va améliorer la conductance électrique des GAP jonctions (**Figure 20**) (Griffith, Chaytor, 2004).

2.5.2. Les molécules vasoconstrictrices majeures

2.5.2.1. L'endothéline

L'endothéline (ET) est un neuropeptide de 21 acides aminés sécrété par les cellules endothéliales, ayant un puissant effet vasoconstricteur sur les CML et contrecarrant

naturellement les effets de NO. Il existe trois formes d'endothéline, ET-1, ET-2 et ET-3, qui sont présentes dans plusieurs tissus avec des effets pléiotropes et qui sont impliquées dans la régulation de la prolifération via la modulation de l'expression de gènes comme la collagénase, de la production d'hormones et principalement dans le tonus vasculaire (Bellien, Iacob et al., 2017). Il est à noter que les cellules endothéliales vasculaires produisent uniquement ET-1. Les contraintes de cisaillement, des facteurs de croissance, des cytokines, des molécules d'adhésion et d'autres vasoconstricteurs telles que la noradrénaline et l'Ang-II sont capables de réguler de manière positive la biosynthèse et la libération d'ET-1. Une fois sécrétée, ET-1 va exercer une action vasoconstrictrice en stimulant des récepteurs ETA et ETB exprimés dans les CML, qui vont activer la phospholipase C (PLC) stimulant ainsi la libération intracellulaire de Ca²⁺ et l'activation de la PKC via les voies phosphoinositide-3 (PI3) et diacylglycérol (DAG) (**Figure 21**). ET-1 exerce également une action vasodilatatrice via des récepteurs ETB exprimés au niveau des cellules endothéliales avec la sécrétion d'agents vasodilatateurs tels que l'acide arachidonique, l'EDHF et la L-arginine (Barton, Haudenschild et al., 1998, Mey and Vanhoutte 2014). Une dérégulation dans la synthèse, la libération ou l'activité de ET-1 peut donc engendrer un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire (Nacci et al., 2009).

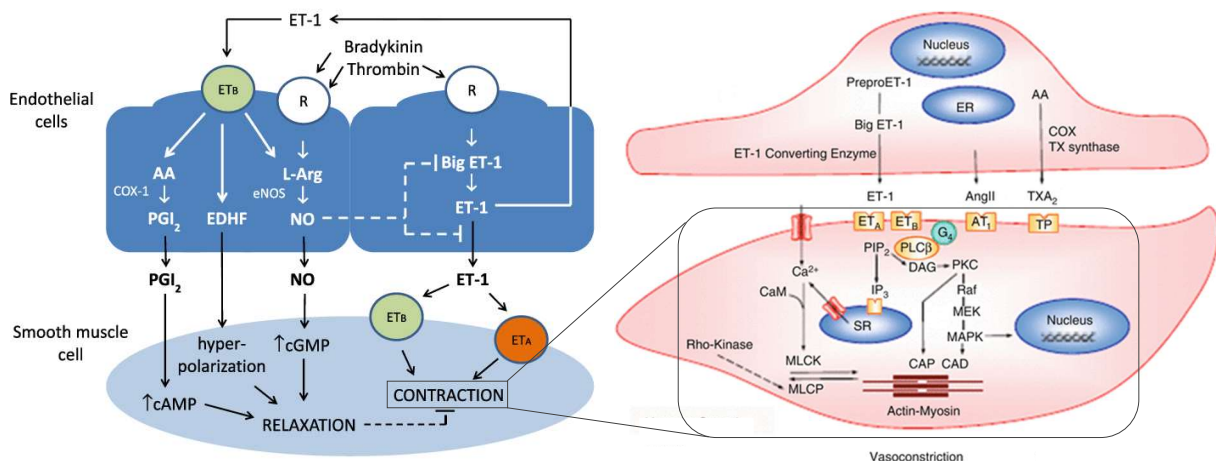


Figure 21 : Sécration et action d'ET-1 sur l'endothélium vasculaire.

AA : arachidonic acid ; **AngII** : angiotensin II ; **cAMP** : cyclic AMP ; **CAD** : caldesmon ; **CaM** : calmodulin ; **CAP** : calponin ; **COX** : cyclooxygenase ; **cGMP** : cyclic GMP ; **COX** : cyclooxygenases ; **DAG** : diacylglycerol ; **EDHF** : endothelium-derived hyperpolarizing factor ; **eNOS** : nitric oxide synthase endothelial ; **ER** : endoplasmic reticulum ; **ET-1** : endothelin-1 ; **ETA and ETB** : endothelin-receptors ;

IP₃ : inositol-1,4,5-trisphosphate ; **MAPK** : mitogen-activated protein kinase ; **MLCK** : Myosin light-chain kinase ; **MLCP** : Myosin light-chain protein ; **NO** : nitric oxide ; **NOS** : nitric oxide synthase ; **PGI₂** : prostacyclin ; **PIP₂** : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; **PKC** : protein kinase C ; **PLC β** : phospholipase C ; **R** : cell membrane receptor ; **SR** : sarcoplasmic reticulum ; **TXA₂** : thromboxane A₂
(Khalil 2013, Mey and Vanhoutte 2014)

2.5.2.2. Angiotensine-II

L'angiotensinogène est un peptide libéré dans la circulation sanguine par le foie et joue un rôle majeur dans le maintien du volume sanguin et du tonus vasculaire. C'est un puissant agent vasoconstricteur retrouvé dans le système vasculaire périphérique, les cardiomyocytes, les CML mais également dans les cellules endothéliales, qui agit dans le développement et le maintien de l'hypertension artérielle, l'athérosclérose et le diabète. L'angiotensinogène est clivé par la rénine en formant de l'angiotensine-I (Ang-I) puis est transformé en Ang-II via les enzymes de conversion de l'angiotensine (ACE). Dans la voie classique, l'Ang-II se fixe au récepteur de l'Ang-II de type I (AT₁R) induisant une vasoconstriction, une neuro-inflammation, un stress oxydatif, une apoptose et une prolifération cellulaire (**Figure 22**). Il existe une deuxième voie, qualifiée de voie alternative, où l'Ang-I et l'Ang-II sont métabolisées par la néprilysine (NEP), l'ACE et l'ACE2, pour former de l'Ang-(1-9) et de l'Ang-(1-7). L'Ang-II et l'Ang-(1-7) peuvent se lier au récepteur AT₂R et au récepteur Mas (MasR), respectivement. Ces liaisons engendrent une vasodilatation, une angiogenèse, des effets anti-inflammatoires, antioxydants et anti-apoptotiques (Yayama and Okamoto 2008, Arroja, Reid et al., 2016).

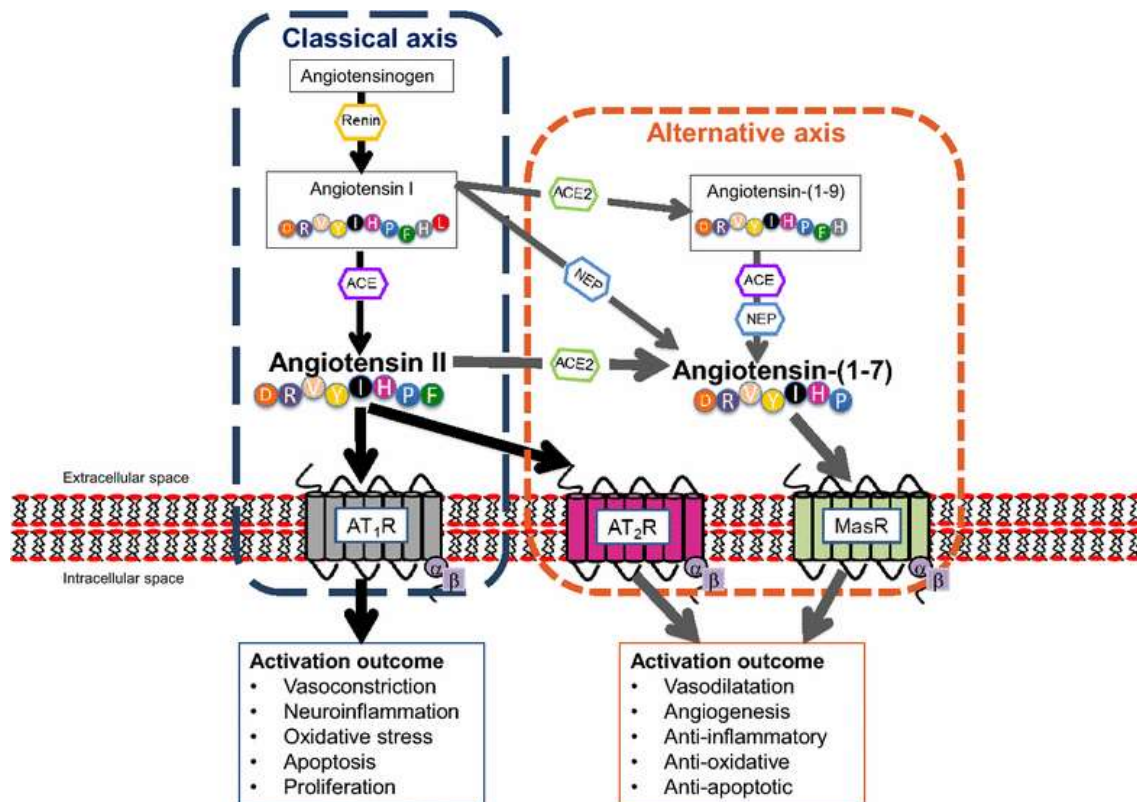


Figure 22 : Transduction du signal de l'angiotensine.

ACE : angiotensin conversion enzyme ; **AT₁₋₂R** : angiotensin receptor type 1-2 ;
MasR : Mas receptor ; **NEP** : neprylisin
(Arroja, Reid, 2016)

Quelques études ont démontré le rôle protecteur du récepteur AT₂R dans les maladies cardiovasculaires ischémiques et rénales via la voie bradykinine/NO/GMPc qui impacte sur les inhibiteurs d'ACE (Yayama and Okamoto 2008).

2.5.2.3. ROS

Le stress oxydatif décrit la condition dans laquelle une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) submerge les mécanismes de défense antioxydants endogènes [Paragraphe 3 : Stress oxydatif]. En situation physiopathologique, l'élévation des niveaux de ROS engendre un effet délétère sur la fonction cellulaire, les lipides, les enzymes et les acides nucléiques, dérégulant ainsi l'homéostasie vasculaire et redox. Les ROS comprennent l'anion superoxyde (O₂⁻), le radical hydroxyle (OH[•]), le NO, les radicaux lipidiques, le peroxyde d'hydrogène

(H₂O₂), l'acide hypochloreux (HClO) et le peroxyxynitrite (ONOO⁻) (Chan 2001). Une production excessive de ROS au niveau vasculaire est caractérisée comme étant un facteur de risque des maladies cardiovasculaires et du DT2 menant à un dysfonctionnement endothélial [Paragraphe 3.4 : Dysfonctionnement endothélial]. L'une des premières conséquences du stress oxydatif chez l'homme est l'altération de la vasodilatation de l'endothélium caractérisée par une baisse de la biodisponibilité du NO à la suite du découplage d'eNOS. Ainsi, le fait de pouvoir accéder aux biomarqueurs du stress oxydatif dans le système vasculaire pourrait permettre d'évaluer le risque de développement des maladies vasculaires selon le type de biomarqueur analysé (Cai and Harrison 2000, Harrison, Griendling et al., 2003, Cournot, Burillo et al., 2018).

2.5.2.4. Dérivés de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique (AA) appartient à la famille des acides gras polyinsaturés oméga-6 à 20 carbones, présents au niveau des phospholipides composant les membranes plasmiques cellulaires. Il joue également un rôle essentiel dans la signalisation cellulaire en tant que messager secondaire participant ainsi à la régulation de la PLC et de la PKC. Ce médiateur inflammatoire est impliqué dans de nombreux processus moléculaires et cellulaires. L'AA peut être libéré d'une molécule de phospholipide sous l'action de la PLA2 activée ou d'autres stimuli physiques ou chimiques (**Figure 17**). Les métabolites issus de l'AA sont essentiels dans divers processus et notamment dans l'inflammation (Hermes-DeSantis and Aranda 2007). Les eicosanoïdes représentent les dérivés de l'AA et les COXs participent activement à leur production. Le thromboxane A₂ (TXA₂) est un composé dérivé de la prostaglandine H₂ sous l'action de la thromboxane synthase (Egan and FitzGerald 2006). Cet agent est considéré comme un puissant inducteur de l'agrégation plaquettaire en agissant directement sur ses récepteurs « thromboxan prostanoid » (TP) et un important vasoconstricteur (Zhao, Hu et al., 2017). L'activation de TP déclenche l'apoptose des cellules endothéliales en inhibant la phosphorylation d'Akt. Elle bloque également la migration des cellules endothéliales et l'angiogenèse induites par VEGF en réduisant la phosphorylation d'Akt et d'eNOS (Gao, Yokota et al., 2000, Ashton and Ware 2004).

2.6. Dérégulations de l'endothélium associées au DT2

Depuis quelques années, l'excès de nutriments, la surcharge énergétique et le stockage de graisses menant au syndrome métabolique font l'objet de nombreuses études. Cependant, il est important de se focaliser sur le glucose qui est à l'origine de nombreuses maladies métaboliques et notamment le DT2.

2.6.1. Le glucose

Le glucose est un monosaccharide appartenant à la famille des aldohexoses, de formule chimique $C_6H_{12}O_6$. Il se présente sous forme cyclique de pyranose mais aussi en ses isomères, le fructose ou le mannose. Les glucides, les lipides et les protéines sont métabolisés en glucose et celui-ci joue un rôle essentiel dans la production d'énergie. En plus d'être un carburant métabolique indispensable, il sert de précurseur majeur dans la synthèse de glycogène, de ribose et de désoxyribose, de galactose, des glycolipides, des glycoprotéines et des protéoglycanes. Le métabolisme du glucose est associé à de nombreux processus physiologiques indispensables à l'homéostasie telles que la glycolyse, la gluconéogenèse, la glycogénolyse et la glycogénèse (Nakrani, Wineland et al., 2020, Remesar and Alemany 2020). Même s'il est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme, dans des conditions d'énergie chroniquement élevée, le glucose peut induire un syndrome métabolique. En effet, le glucose représente notre principale source d'énergie mais s'il est consommé en grande quantité, il engendre à la longue un statut métabolique dérégulé avec une conversion d'énergie et son stockage sous forme de graisses induisant un état pro-inflammatoire. Il est par ailleurs bien établi que l'excès alimentaire de sucres et de graisses engendre le développement de maladies métaboliques comme le diabète et l'obésité associée à une insulino-résistance (Alemany 2011).

2.6.2. L'impact de l'hyperglycémie sur l'endothélium

En condition physiologique, le glucose va principalement subir une glycolyse et une phosphorylation oxydative. Dans le cadre du diabète, associé à une hyperglycémie chronique, les taux de glucose excessifs inhibent le catabolisme du glycéraldéhyde, ce qui entraîne la métabolisation du glucose, du fructose-1,6-bisphosphate et du

glycéraldéhyde 3-phosphate en d'autres générateurs de ROS. Le glycérol-3-phosphate est un précurseur du DAG, une molécule de signalisation capable de moduler l'activité de la voie PKC, qui va engendrer la production de ROS. Lorsqu'ils réagissent avec NO, les ROS sont convertis en RNS. Des niveaux excessifs de ROS et de RNS endommagent directement les cellules en oxydant l'ADN, les protéines et les lipides, mais endommagent aussi indirectement les cellules en activant diverses voies de signalisation intracellulaires sensibles au stress telles que la p38 MAPK, JNK, NFκB ou la PKC. Ces événements entraînent la modulation de facteurs transcriptionnels impliqués dans le statut redox, la prolifération, l'apoptose, le dysfonctionnement endothélial, l'altération de la perméabilité et l'inflammation (**Figure 23**) (Giacco and Brownlee 2010, Kassab and Piwovar 2012, Babizhayev, Strokov et al., 2015).

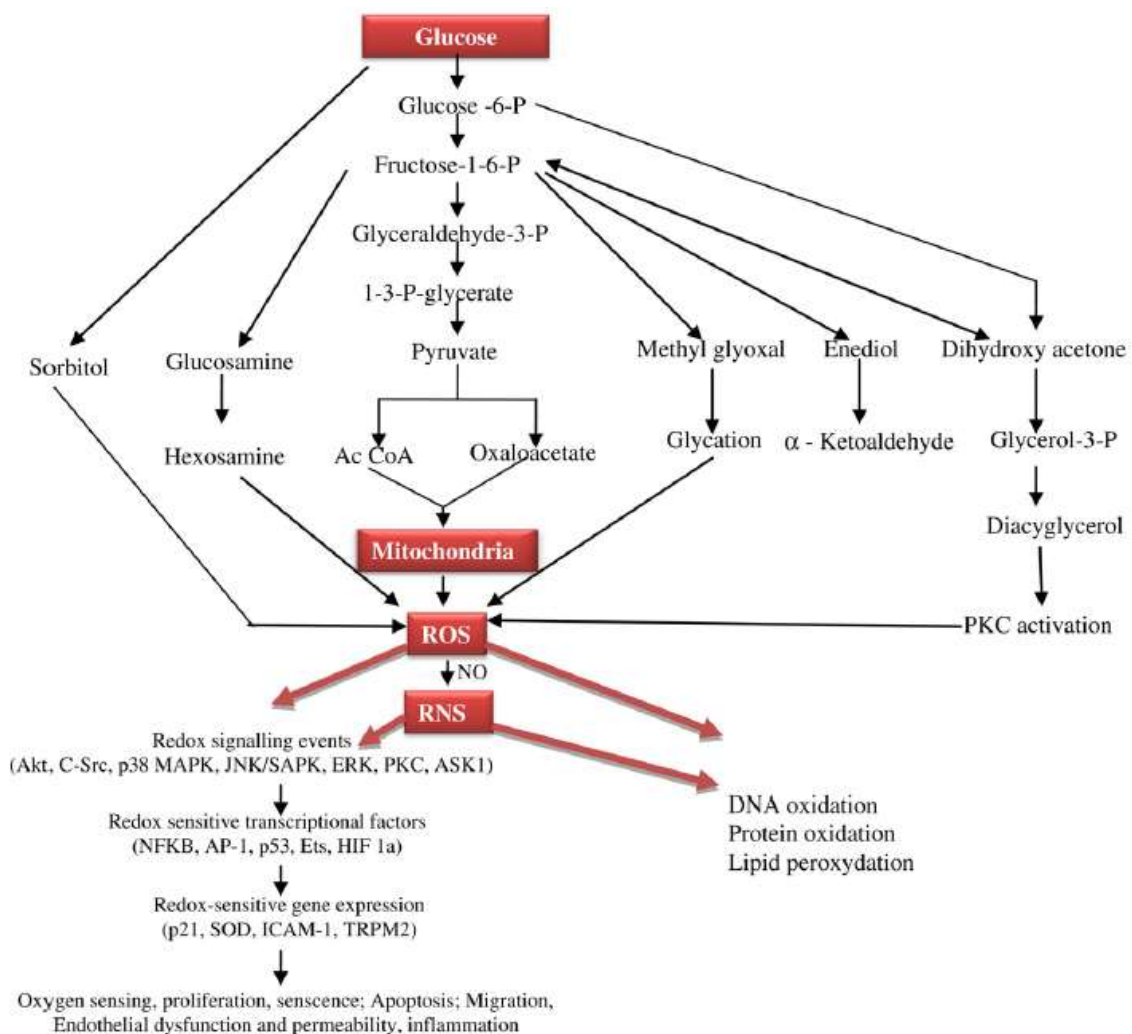


Figure 23 : Voies biochimiques du métabolisme du glucose aboutissant aux ROS.

(Kassab and Piwovar 2012)

Il existe cinq mécanismes majeurs responsables des dommages vasculaires chez les patients diabétiques (**Figure 24**). Nous retrouvons l'augmentation du glucose sanguin par la **voie des polyols**. Cette voie est basée sur la conversion de glucose en sorbitol puis est oxydé en fructose par des aldo-cétoréductases via deux cofacteurs, le NADPH et le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺). Le NADPH est un cofacteur impliqué dans la régénération du glutathion réduit qui participe activement à la neutralisation des ROS. Une déplétion intracellulaire de cette enzyme réduite va induire ou exacerber la production de ROS (Giacco and Brownlee 2010, Kassab and Piwowar 2012). De plus, une étude de Vikramadithyan et al. a démontré que la surexpression de l'aldose réductase humaine augmente le phénomène d'athérosclérose chez des souris diabétiques et réduit l'expression des gènes qui régulent la régénération du glutathion (Vikramadithyan, Hu et al., 2005).

Chez les sujets diabétiques, on note également une augmentation de la formation intracellulaire des **produits de glycation avancés** (AGEs), de leur récepteur RAGE et de leurs ligands. Sachant que le phénomène de glycation s'accompagne généralement d'un stress oxydant, l'ensemble du processus est appelé glycoxydation. Les AGEs sont produits par une glycation non enzymatique ou une glycoxydation issue de l'auto-oxydation du glucose caractérisée par la fixation d'oses sur des groupements aminés des protéines en N-terminal (Babizhayev, Strokov, 2015). En effet, en situation diabétique, les sucres vont se fixer sur les protéines induisant un changement de conformation et une perte de fonction suivie de la formation d'une base de Schiff avec réarrangement moléculaire, puis à la formation de produits d'Amadori. Enfin, des réactions oxydatives engendrent la génération d'intermédiaires réactifs comme le méthylglyoxal (MGO) qui sont des AGEs (réaction de Maillard). Depuis quelques années, le taux de glycation non enzymatique de l'hémoglobine est considéré comme un biomarqueur dans la pathologie diabétique (Vlassara and Uribarri 2014). Un fois glyqués, les AGEs se lient à leurs récepteurs spécifiques des macrophages **RAGE**. Ces derniers sécrètent des messagers chimiques tels que des cytokines ou des facteurs de croissance induisant ainsi une production de ROS et des molécules d'adhésion, une activation de NFκB, une vasoconstriction, des thromboses et une hyperperméabilité vasculaire (Aronson and Rayfield 2002, Aronson and Edelman 2014, Babizhayev, Strokov, 2015, Hudson and Lippman 2018). La peroxydation lipidique est également un biomarqueur étudié dans le cadre du DT2. Elle induit la production de produits de

peroxydation lipidique avancés tel que le 4-hydroxynonanal (4-HNE) (Aikens and Dix 1993).

Les **PKC** représentent une famille d'au moins 12 isoformes de sérine et thréonine kinases qui sont exprimées de manière ubiquitaire dans les cellules et sont impliquées dans la transcription de facteurs de croissance ainsi que dans la transduction du signal en réponse à ses facteurs. Cette enzyme a pour but de phosphoryler diverses protéines via l'utilisation d'ions Ca^{2+} , de la phosphatidylsérine et du DAG. En effet, une forte concentration en glucose induit l'activation de PKC en augmentant la formation de DAG, son principal cofacteur cellulaire endogène. Son activation induit une surexpression de $\text{TGF}\beta$ qui va entraîner un épaissement du capillaire retrouvé au niveau de la MEC, qui est l'une des premières anomalies structurelles détectées dans la plupart des tissus chez un patient diabétique. L'activation excessive des PKC engendre la production de ROS menant également à des lésions tissulaires (Aronson and Rayfield 2002, Giacco and Brownlee 2010, Gero 2018).

L'hyperactivité de la **voie de l'hexosamine** est aussi impliquée dans les dommages vasculaires chez les patients diabétiques. En effet, l'hyperglycémie et l'oxydation marquée des acides gras induite par l'insulinorésistance participent au développement de complications associées à l'augmentation du fructose-6-phosphate. Cette voie engendre des glycosylations de dérivés de glucose pour donner comme produit final, de l'UDP N-acétyl glucosamine (UDP-GlcNac) (Kassab and Piwowar 2012).

Ces cinq mécanismes sont activés par un seul événement en amont qui est la surproduction mitochondriale des ROS (Giacco and Brownlee 2010).

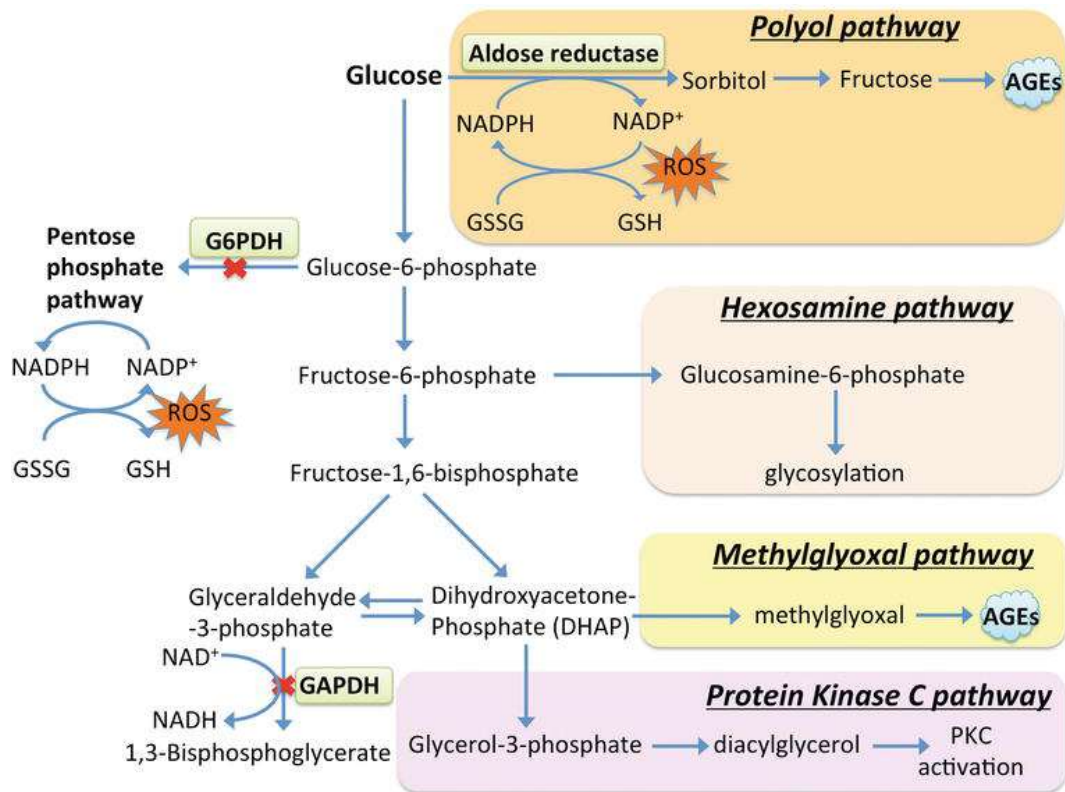


Figure 24 : Voie de la production de ROS induite par une hyperglycémie.

AGEs : advanced glycation end-products ; **G6PDH** : glucose-6-phosphate dehydrogenase ; **GAPDH** : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; **GSH/GSSG** : reduced/oxidized glutathione ; **NAD⁺/NADH** : nicotinamide adenine dinucleotide ; **NADP⁺/NADPH** : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ; **ROS** : reactive oxygen species

(Gero 2018)

2.6.3. L'impact de l'insulinorésistance sur l'endothélium

Une résistance à l'insuline au niveau de l'endothélium se caractérise par une stimulation de la voie PKC via des stimuli physiopathologiques tels que l'Ang-II, les cytokines pro-inflammatoires, l'hyperglycémie, les acides gras induits par le diabète, l'obésité et la résistance à l'insuline (**Figure 25**). Ces agents stimulent les isoformes de PKC et d'autres kinases de stress dans le but de phosphoryler IRS1, IRS2 et PI3K, et d'inhiber uniquement la voie IRS / PI3K / Akt. En revanche, SOS/GRB2 et la voie MAPK ne sont pas affectés ou améliorés par l'insuline. La perte sélective des effets de l'insuline via la voie IRS / PI3K / Akt entraîne la réduction de l'action anti-

athéromateuse de l'insuline. Elle contribue ainsi à l'apparition de pathologies cardiovasculaires associées au diabète et à l'accélération du processus de l'athérosclérose caractérisée par une baisse de la vasodilatation et une production de molécules d'adhésion et de stress oxydatif (King, Park et al., 2016).

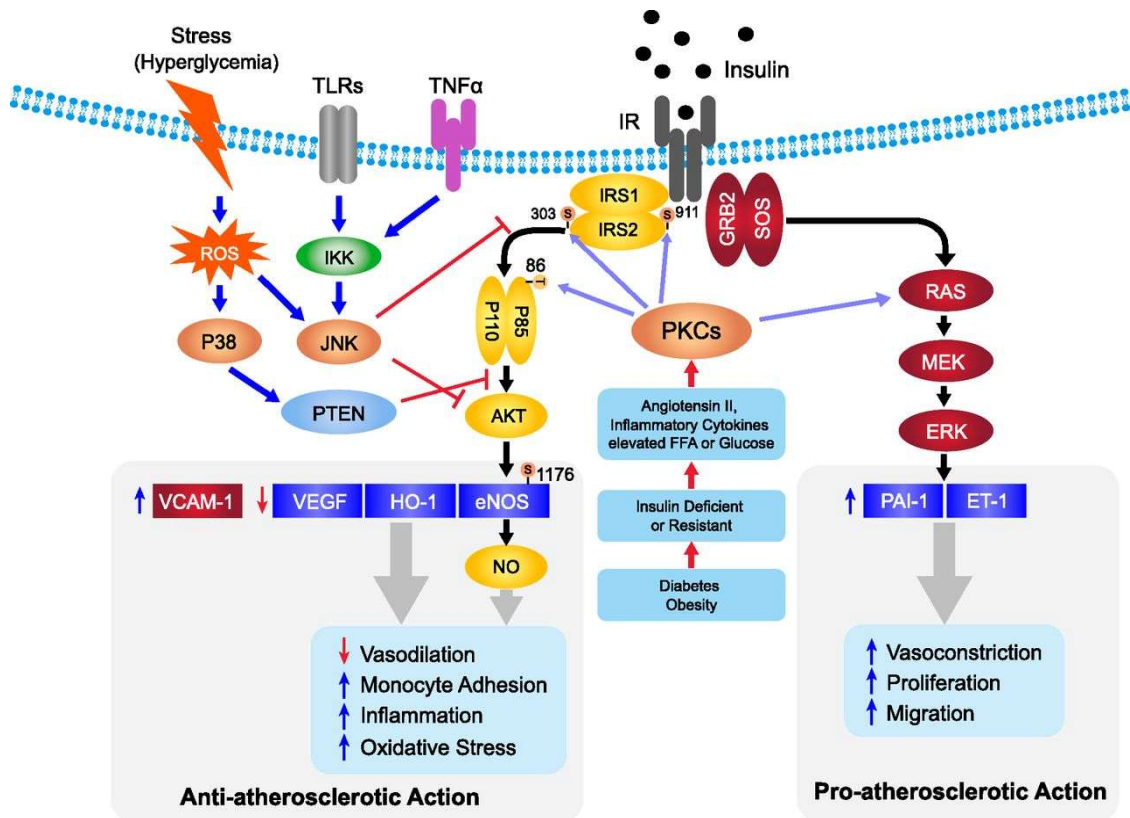


Figure 25 : Représentation schématique de l'effet de l'insulinorésistance sur l'endothélium vasculaire.

eNOS : endothelial nitric oxide synthase ; **ERK** : extracellular signal-regulated kinases ; **ET-1** : endothelin-1 ; **FFA** : free fatty acid ; **HO-1** : heme oxygenase-1 ; **GRB2** : growth factor receptor-bound protein 2 ; **IKK** : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase ; **IR** : insulin receptor ; **IRS1/2** : insulin receptor substrate 1/2 ; **JNK** : c-Jun N-terminal kinase ; **MEK** : mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase ; **NO** : nitric oxide ; **PAI-1** : plasminogen activator inhibitor-1 ; **PKC** : protein kinase C ; **PTEN** : phosphatase and TENsin homolog ; **ROS** : reactive oxygen species ; **SOS** : son of sevenless ; **TLRs** : toll-like receptors ; **TNFα** : tumor necrosis factor alpha ; **VCAM-1** : vascular cell adhesion protein-1 ; **VEGF** : vascular endothelial growth factor

(King, Park, 2016)

3. Le stress oxydatif

3.1. Définition

Pour rappel, le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production d'espèces pro-oxydantes regroupant des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et des dérivés réactifs de l'azote (RNS) et leur taux de dégradation par le système de défense antioxydant endogène. Les ROS sont des atomes, molécules ou des fragments moléculaires qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires non appariés, ce qui les rend chimiquement très réactifs mais aussi très instables (**Figure 26**) (Halliwell 1989). Lorsque les radicaux libres sont produits en faible quantité, ils ont un effet bénéfique pour les cellules. En effet, ils sont des médiateurs de réactions énergétiques ou de défense au niveau cellulaire. Cependant, lorsqu'ils sont surproduits, celles-ci deviennent incapables de réguler le stress oxydatif induit et vont induire des dommages cellulaires conséquents (Harrison, Griendling, 2003, Hazout, Menezo et al., 2008).

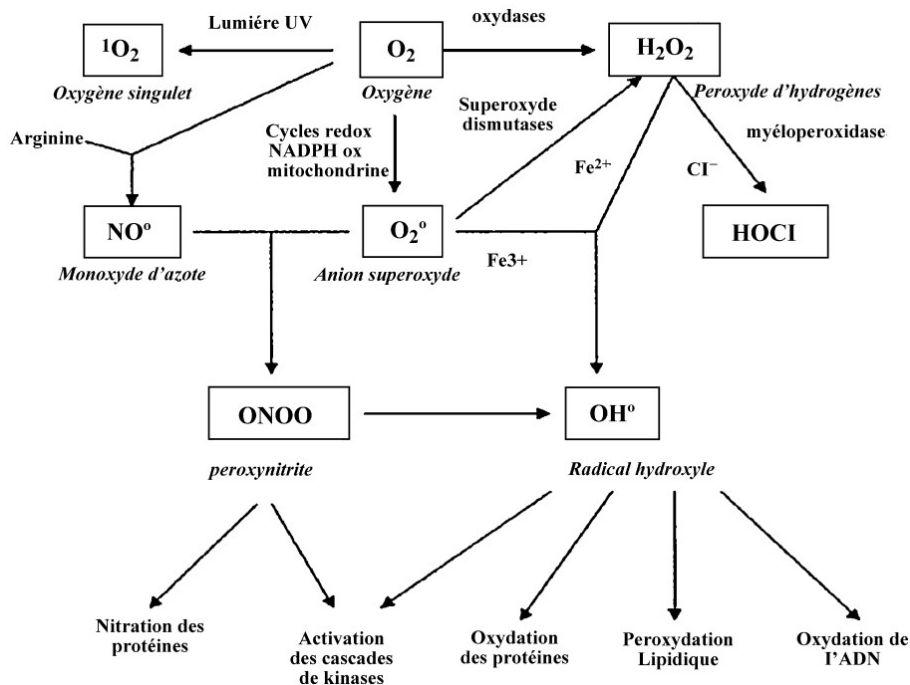
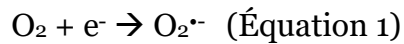


Figure 26 : Étapes de formation des ROS et complications associées.
(Hazout, Menezo, 2008)

3.2. Les principaux radicaux libres

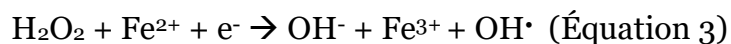
L'**anion superoxyde** $O_2^{\cdot-}$ est principalement généré à partir de la réduction du dioxygène (O_2) par addition d'un électron au niveau mitochondrial (Équation 1). Il n'a pas la capacité de traverser les membranes lipidiques et sa réaction est spontanée et s'effectue principalement en milieu aérobie, proche de la membrane interne mitochondriale de la chaîne respiratoire. Cet anion qualifié comme primaire est à l'origine de la formation d'autres radicaux libres dit secondaires tels que H_2O_2 ou OH^{\cdot} , plus délétères pour l'organisme (Hawkins, Madesh et al., 2007).



Le **peroxyde d'hydrogène** H_2O_2 est produit à partir du $O_2^{\cdot-}$ via une réaction catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) (Équation 2). Le H_2O_2 n'est pas un radical libre mais il est extrêmement réactif, plus stable que les autres ROS et possède un fort pouvoir oxydant. Il est capable de traverser les membranes biologiques et peut agir à une grande distance de son lieu de production.



H_2O_2 induit la formation de molécule d'eau via la réaction catalysée par la catalase ou la glutathion peroxydase (GPx). De plus, le H_2O_2 peut se décomposer en présence d'ions ferreux (Fe^{2+}) en un ion OH^- et un radical hydroxyle (OH^{\cdot}), selon la réaction de Fenton (Équation 3) (Valko, Leibfritz et al., 2007).



Le **radical hydroxyle** OH^{\cdot} est issu de la réaction de Fenton, avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde. Il apparaît comme le radical le plus instable mais est le plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. En effet, OH^{\cdot} peut réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à sa proximité tels que l'ADN, les protéines ou encore les lipides entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires (Cadet, Delatour et al., 1999, Valko, Leibfritz, 2007).

Le **radical hydroperoxyde ROO•** correspond à la forme protonée de l'anion superoxyde. Il est défini comme étant l'acteur responsable de la peroxydation lipidique et participe à la formation du 4-HNE ou encore du malondialdéhyde (MDA) qui sont des agents néfastes (Aikens and Dix 1993).

D'autres types d'espèces réactives ayant des effets délétères importants existent au sein de l'organisme, il s'agit des RNS.

Le **monoxyde d'azote NO•** est un radical libre ayant la capacité de traverser les membranes biologiques et d'aller agir en tant qu'agent protecteur vasodilatateur au niveau de l'endothélium. Malgré ses effets bénéfiques en condition physiologique, il peut s'avérer être néfaste en état de stress oxydatif lorsqu'il interagit avec O₂•⁻ pour former du peroxynitrite ONOO•. En effet, lorsque NO• est produit en excès, cela induit des dérégulations au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et la production croissante d'autres ROS et RNS (Tengan and Moraes 2017).

Le **radical peroxynitrite ONOO-** est produit à partir de la réaction entre O₂•⁻ et NO• (Équation 4). Ce radical est responsable de dommages irréversibles causés au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides via un phénomène d'oxydation ou via la génération de radicaux libres très réactifs (Beaudeau, Peynet et al., 2006).



3.3. Les différentes sources de radicaux libres

3.3.1. La chaîne respiratoire mitochondriale

Les mitochondries sont des petits organites intracellulaires participant activement à la respiration et à la survie de la cellule via la phosphorylation oxydative. Dans ce processus biochimique, il y a une minime production normale d'anions superoxydes qui sont dégradés par la superoxyde dismutase (SOD) puis la catalase dans la mitochondrie ou le cytosol. Les mitochondries sont retrouvées en grande quantité dans les zones cellulaires où la consommation d'ATP est importante, car elles sont

directement impliquées dans la production d'ATP, de cofacteurs métaboliques comme le FADH₂ et le NADH ainsi que dans d'autres processus cellulaires tels que la différenciation, l'apoptose ou le cycle cellulaire (Kayama, Raaz et al., 2015). En condition physiopathologique et notamment dans le cadre du diabète, les ROS mitochondriaux apparaissent comme une cause majeure de stress oxydatif. En effet, une diminution de la production des ROS mitochondriaux est observée lorsque les voies PKC, NFκB, le complexe II et les agents découplants de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale sont inhibés (Nishikawa, Edelstein et al., 2000). Dans la chaîne respiratoire mitochondriale, les électrons se déplacent dans l'ensemble des complexes protéiques en libérant de l'énergie sous forme de H⁺ de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire (**Figure 27**). En effet, le complexe respiratoire I transfère des électrons de NADH au complexe II de FADH₂ au coenzyme Q (CoQ, ubiquinone), étant le substrat du complexe III. Le complexe III transfère les électrons du CoQ réduit au cytochrome C, qui est utilisé par le complexe IV pour réduire l'oxygène moléculaire en eau (Gero 2018). La surexpression de la protéine de découplage 1 ou 2 (UCP1 ou UCP2) engendre la normalisation du potentiel membranaire et réduit la production de ROS (Nishikawa, Edelstein, 2000, Busiello, Savarese et al., 2015). De plus, la quinone oxydoréductase (SQR) inhibe également la génération de superoxyde induite par l'hyperglycémie via l'utilisation des donneurs de sulfure d'hydrogène et du sulfure. Une exposition continue à une concentration élevée de glucose engendre une hyperpolarisation mitochondriale. Les changements de potentiel de la membrane mitochondriale induisent un stress oxydatif avec la production d'O₂⁻ par la chaîne de transport d'électrons. Cela va causer la formation d'autres types de ROS intracellulaires. Ces processus vont déclencher des changements morphologiques des mitochondries ainsi qu'une altération de l'assemblage des complexes respiratoires entraînant des défaillances énergétiques et un dysfonctionnement vasculaire (Gero 2018).

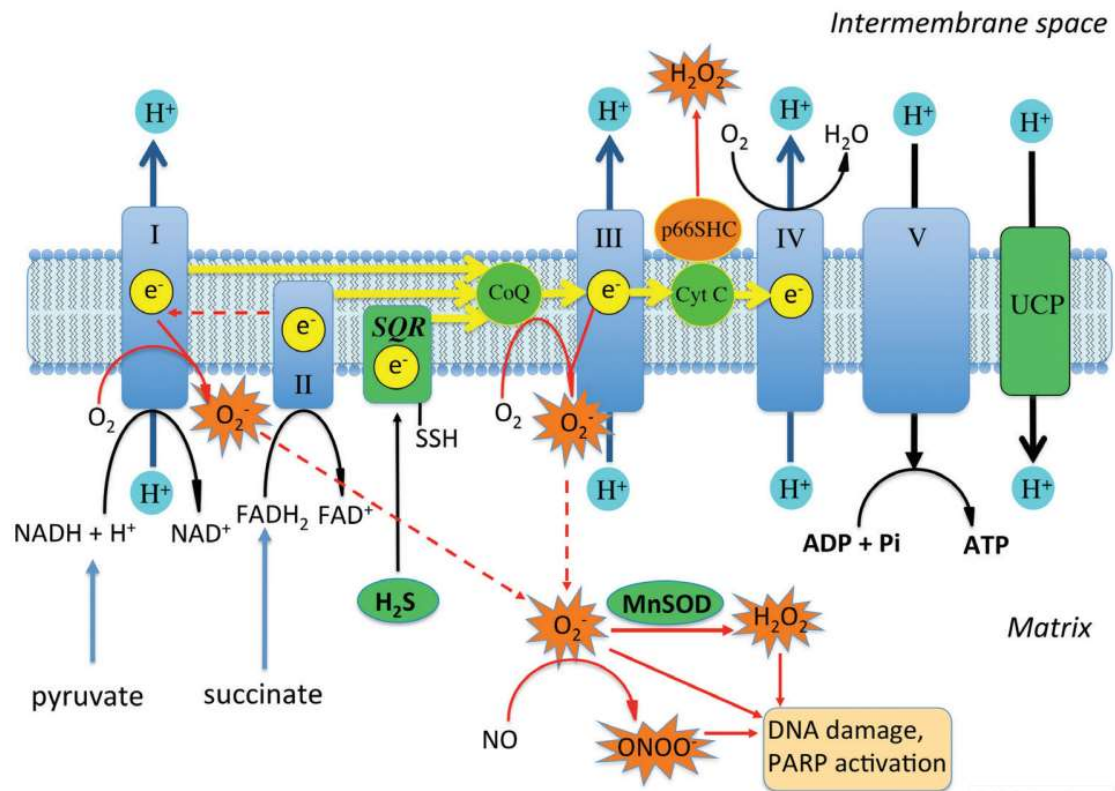


Figure 27 : Production de ROS par la chaîne mitochondriale de transport d'électrons.

CoQ : coenzyme Q ubiquinone ; **Cyt C** : cytochrome C ; **FAD⁺/FADH₂** : flavin adenine dinucleotide ; **H₂O₂** : hydrogen peroxide ; **MnSOD** : manganese-dependent superoxide dismutase ; **NO[•]** : nitric oxide ; **O₂^{•-}** : superoxide ; **ONOO^{•-}** : peroxynitrite ; **PARP** : poly (ADP-ribose) polymerase ; **p66SHC** : 66-kDa Src homology 2 domain-containing protein ; **SQR** : sulfide quinone oxidoreductase ; **UCP** : uncoupling protein (Gero 2018)

3.3.2. Les NADPH oxydases

Les NADPH oxydases (NOXs) représentent la source majeure de production cellulaire de ROS. Elles sont constituées d'un complexe enzymatique ancré dans la membrane plasmique, avec une sous-unité catalytique NOX dépendant des autres sous-unités comprenant deux autres protéines membranaires, la p22^{phox} et la gp91^{phox} (phagocyte oxydase) appelé flavocytochrome b₅₅₈, et des protéines cytosoliques (**Figure 28**). On distingue cinq membres dans la famille des NOXs, les NOX1 à NOX5 qui se différencient au niveau des sites de libération des ROS, des modes d'activation et des

fonctions. Dans l'endothélium vasculaire, on retrouve toutes les formes de NOX excepté la NOX3 (Wingler, Hermans et al., 2011). Cependant, la NOX4 est l'isoforme vasculaire NOX la plus abondante avec une expression élevée dans les cellules endothéliales et les CML (Cheng, Cao et al., 2001). Les NOX sont dépendantes de l'activité de la p22^{phox} sauf la NOX5 qui s'active indépendamment (Wingler, Hermans, 2011). L'activité de ce complexe vasculaire transmembranaire est régulée par des cytokines, des hormones et des forces mécaniques. La stimulation des CML avec de l'Ang-II, de la thrombine, du PDGF, ou du TGF α induit la production de ROS vasculaires et l'activité de la NADPH oxydase (Cai and Harrison 2000). En situation inactive, les sous-unités cytosoliques p67^{phox}, p47^{phox} et p40^{phox} sont situées dans le cytosol par auto-inhibition. En état d'activation, les kinases intracellulaires vont provoquer la phosphorylation des sous-unités cytosoliques. Celles-ci subissent une translocation membranaire avec GTP Rac et se lient au flavocytochrome b₅₅₈ en formant un complexe enzymatique actif. Lorsque la sous-unité p67^{phox} se fixe au flavocytochrome, l'enzyme s'active et induit un transfert électronique et le flavocytochrome sera capable de fixer le NADPH et le FAD tandis que les deux hèmes vont réduire l'oxygène moléculaire. Les électrons dérivés du NADPH sont transférés au substrat générant de l'O₂[•] à partir d'O₂ de l'autre côté de la membrane selon la réaction suivante : $\text{NADPH} + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NADP} + 2 \text{O}_2^{\bullet} + \text{H}^+$ (Zeng, Miralda et al., 2019).

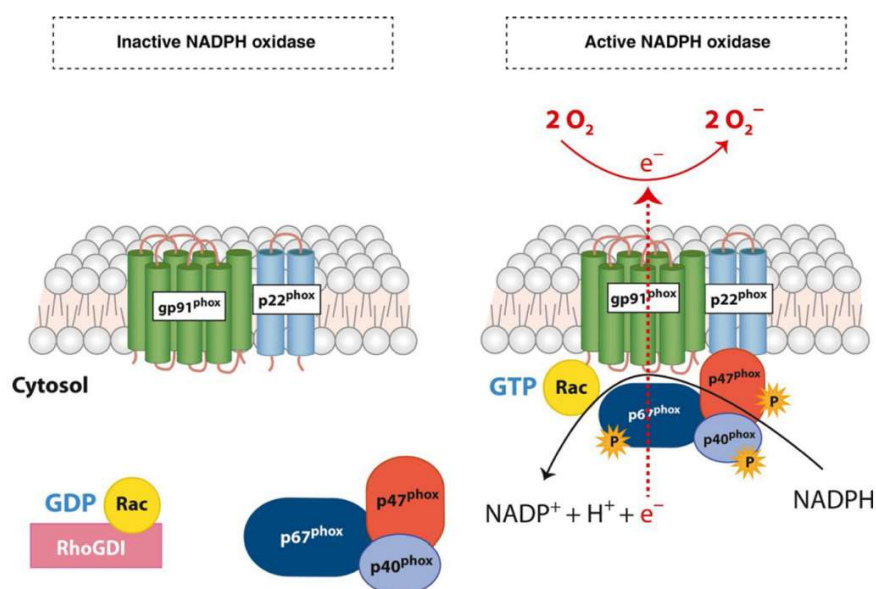


Figure 28 : Structure et réaction de la NADPH oxydase.

(Zeng, Miralda, 2019)

Une étude menée par l'équipe de Chen et al. a démontré que l'activité de NOX et l'apoptose sont augmentées chez des cellules endothéliales cérébrales murines bEnd3 exposées à une hyperglycémie. De manière intéressante, l'élévation de l'activité enzymatique de NOX induite par l'hyperglycémie et la production de ROS sont diminuées lorsqu'un inhibiteur de NOX, l'apocynine, est utilisé, suggérant que l'hyperglycémie induit l'apoptose cellulaire par la production de ROS via les NOXs (Chen, Qian et al., 2013).

3.3.3. *Le réticulum endoplasmique*

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite intracellulaire qui veille à la bonne localisation et au bon repliement des protéines, et qui est impliqué dans l'homéostasie cellulaire en suivant le stockage de Ca^{2+} et dans la réponse au stress. Lorsque l'environnement oxydatif du RE est altéré, le Ca^{2+} intracellulaire induit le stress du RE caractérisé par une production de ROS. Les éléments majeurs impliqués dans la formation de ROS ou dans la réponse UPR pour « unfolded protein response » sont les protéines isomérasés disulfides (PDI), l'oxydoréductase-1 du RE (ERO) et le complexe NOX, particulièrement la NOX4 (**Figure 29**) (Bhandary, Marahatta et al., 2012). À la suite d'un stress de RE provoqué par un déséquilibre de son état oxydatif, un afflux de Ca^{2+} a lieu dans le cytoplasme par l'intermédiaire de canaux liés à la membrane, depuis l'environnement extracellulaire. Cet événement induit également l'entrée du Ca^{2+} dans les noyaux et les mitochondries engendrant une génération de ROS mitochondriaux activant eux-mêmes le cycle de Krebs puis la phosphorylation oxydative. De plus, les ions Ca^{2+} entraînent la libération du cytochrome c, qui va altérer le transfert d'électrons et le potentiel mitochondrial membranaire et augmenter la production de ROS (Bhandary, Marahatta, 2012, Robb, Hall et al., 2018).

Hirosumi et son équipe ont démontré que la présence des UPR entraîne une augmentation de l'expression des gènes pro-inflammatoires tels que l'IL-6 et le « monocyte chemoattractant protein-1 » (MCP-1). De plus, lorsque JNK est activée, la sensibilité à l'insuline est réduite à la suite de la diminution de l'action de son substrat IRS (Hirosumi, Tuncman et al., 2002).

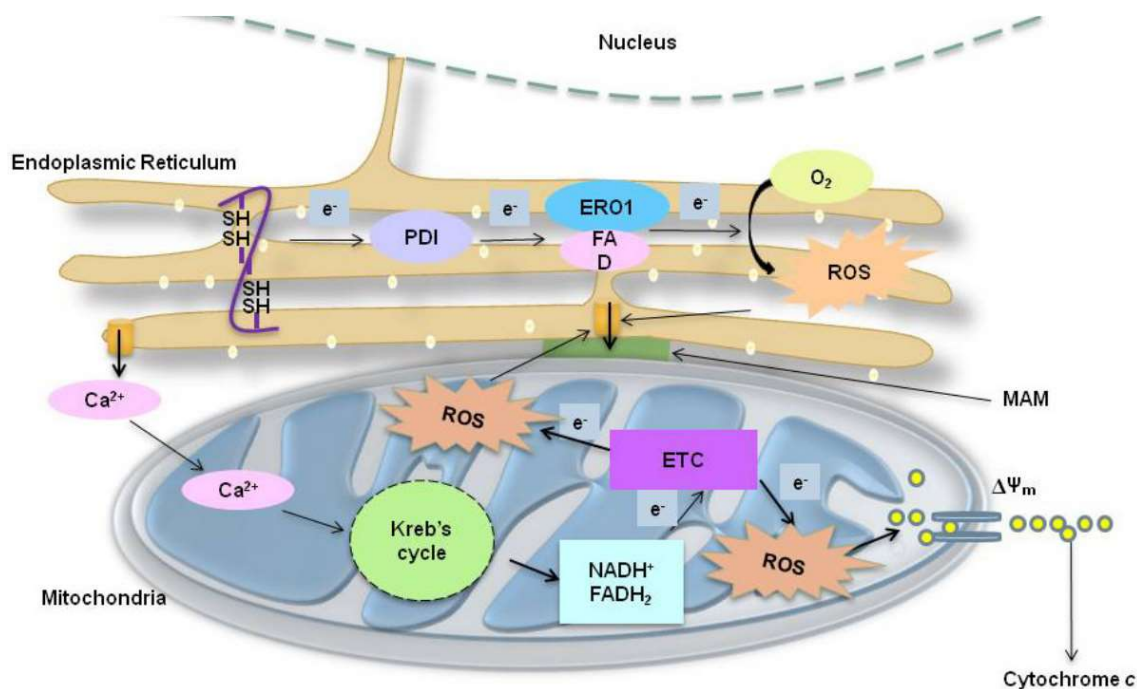


Figure 29 : Stress du RE associé à la production de ROS.

ETC : electron transfer chain ; **ERO-1** : endoplasmic reticulum oxidoreductin ; **FAD** : flavin adenine dinucleotide ; **FADH₂** : flavin adenine dinucleotide reduced ; **PDI** : protein disulfide isomerase ; **ROS** : reactive oxygen species ; **NADH⁺** : nicotinamide adenine dinucleotide reduced

(Bhandary, Marahatta, 2012)

3.3.4. La xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) est une enzyme capable de produire des radicaux libres à partir de la catalyse de l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine dans le processus du métabolisme des purines. Elle est présente sous deux formes : la XO et la xanthine déshydrogénase. La première catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et la transformation de la xanthine en acide urique en produisant des O₂^{•-} et du H₂O₂. Elle catalyse également la transformation d'allopurinol en oxypurinol. La seconde, elle, catalyse les mêmes réactions mais réduit le NAD⁺ en ne générant pas de radicaux libres (Cai and Harrison 2000). Cardillo et ses collaborateurs ont montré que l'administration d'oxypurinol qui inhibe la production d'O₂^{•-} médiée par la XO, a considérablement amélioré la vasodilatation chez des patients atteints d'hypercholestérolémie (Cardillo, Kilcoyne et al., 1997). De plus, il été montré chez un modèle de souris rendues diabétiques par streptozotocine, que l'altération

mitochondriale induisait un stress oxydatif dans les muscles squelettiques, augmentant la production de H₂O₂ et de protéines carbonylées. L'inhibition de l'activité de la XO a induit une réduction du stress oxydatif et une amélioration de la fonction mitochondriale (Bravard, Bonnard et al., 2011).

3.3.5. Les NO synthases

Les NOS sont des enzymes capables de produire des ROS en induisant la formation de RNS dont des ONOO[•] qui vont être très délétères pour l'endothélium vasculaire. Cela contribue au découplage d'eNOS engendrant la formation de H₂O₂ et de O₂^{•-} (Cai and Harrison 2000).

3.3.6. Les COXs

La COX est une enzyme jouant un rôle essentiel dans la cascade signalisation de l'AA. En effet, elle est impliquée dans la conversion d'AA en prostanoïdes et en TXA. Il existe deux isoformes de COX : la COX1 et la COX2. La **COX1** a été découverte en 1976, dans des glandes vésiculaires bovines (Miyamoto, Ogino et al., 1976). Elle est exprimée de manière constitutive dans de nombreux tissus et son activité est essentielle dans les processus physiologiques de production de prostacyclines, de prostaglandines et de TXA impliqués dans la cytoprotection, le maintien du flux sanguin, la vasoconstriction et l'agrégation plaquettaire. La **COX2** a été identifiée en 1989 et partage une homologie de séquence ainsi qu'une activité catalytique proches de celles de COX1 (Simmons, Levy et al., 1989). Contrairement à la COX1, elle n'est pas exprimée de manière constitutive excepté dans le placenta, le rein et le cerveau. La COX2 peut être induite via des stimuli intra- et extracellulaires tels que les lipopolysaccharides bactériens (LPS), IL-1 β ou TNF- α (Coyne, Nickols et al., 1992, Hirst, Teixeira et al., 1995). L'activité des COX peut être inhibée par des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) dans le but de prévenir des phénomènes inflammatoires. En effet, les AINS vont directement bloquer la transformation de l'AA en prostaglandines et en TXA (Gabriel, Jaakkimainen et al., 1991). En condition physiologique, COX2 est l'isoforme dominante dans les îlots pancréatiques et une lignée de cellules β sécrétant de l'insuline. En situation d'hyperglycémie, l'expression du gène codant pour COX2 s'avère être augmentée. De plus, l'hyperglycémie induit la production de la cytokine

pro-inflammatoire IL-1 β qui engendre augmente l'expression du gène codant pour la COX2, démontrant que l'induction de COX2 induite par le glucose dans les îlots pancréatiques serait la voie contribuant au dysfonctionnement des cellules β dans le cadre de la pathologie diabétique (Persaud, Burns et al., 2004). Par ailleurs, des travaux ont démontré l'élévation de la production de O $_2^{\cdot-}$ et la diminution de la formation de NO suite au découplage d'eNOS chez des cellules endothéliales microvasculaires murines exposées à une hyperglycémie durant 3 jours. De manière intéressante, lorsque la COX2 est inhibée, l'ensemble des complications associées à l'hyperglycémie sont abrogées (Aljofan and Ding 2010).

3.3.7. Le tissu adipeux

De nombreuses études ont évalué le lien entre le stress oxydatif dans les cellules adipocytaires et les complications associées à l'obésité. Un apport nutritionnel excessif riche en sucres et en graisses caractérisé par un dépôt ectopique de graisses, associé à un comportement sédentaire favorise la dérégulation du métabolisme du glucose et des lipides, et du système antioxydant (Alemany 2011). Ces perturbations induisent la production de ROS et de cytokines pro-inflammatoires mais également une altération de la fonction mitochondriale et énergétique ainsi que de la sensibilité à l'insuline (**Figure 30**) (Furukawa, Fujita et al., 2004).

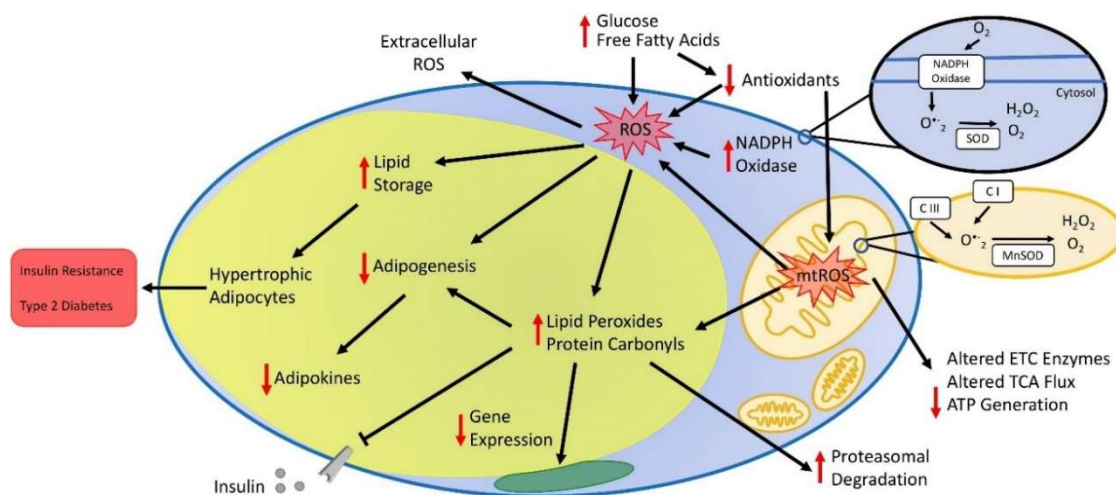


Figure 30 : Impact du stress oxydatif sur la fonction adipocytaire.

ATP : adenosine triphosphate ; **ETC** : electron transport chain ; **H₂O₂** : hydrogen peroxide ; **MnSOD** : manganese superoxide dismutase ; **mtROS** : ROS mitochondriaux ; **O₂^{•-}** : superoxide ; **O₂** : dioxygene ; **ROS** : reactive oxygen species ; **TCA** : tricarboxylic acid cycle (Cycle de Krebs)

(Masschelin, Cox et al., 2020)

3.4. Les mécanismes de défense antioxydante

Lorsque les cellules sont exposées à des quantités importantes et continues de radicaux libres, elles vont entrer dans un système de protection et vont développer un système de défense antioxydant endogène. Un antioxydant est une substance qui est capable d'atténuer ou d'inhiber partiellement ou entièrement l'oxydation causée par les radicaux libres. Le système de défense antioxydant peut être divisé en deux groupes distincts : (i) les antioxydants enzymatiques et (ii) les antioxydants non-enzymatiques, à savoir les vitamines C et E, les caroténoïdes, certains minéraux et les polyphénols végétaux (**Figure 31**).

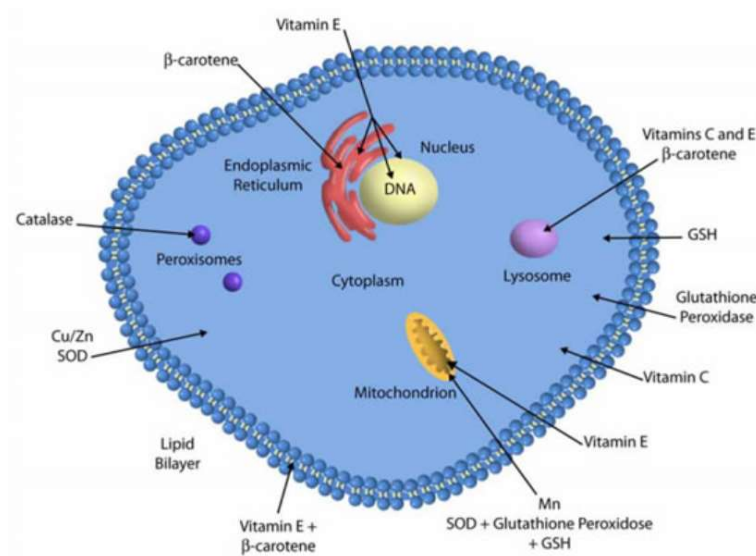


Figure 31 : Les composés réactifs retrouvés dans le système de défense antioxydant.

(Mandal 2020)

3.4.1. Les antioxydants enzymatiques

Les systèmes antioxydants sont responsables du maintien d'un niveau non cytotoxique des ROS. Parmi la première ligne de défense de l'organisme pour lutter contre les ROS, nous retrouvons la SOD, la catalase, la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GR) et l'hème oxygénase-1 (HO-1) (**Figure 32**).

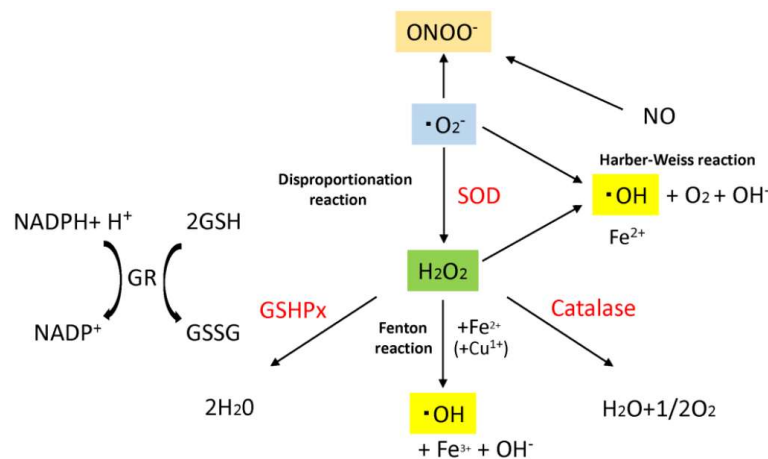
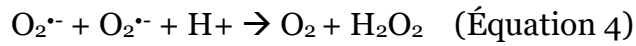


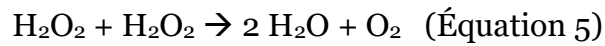
Figure 32 : Voies génératrices et détoxifiantes des ROS.

$O_2^{\cdot-}$: superoxyde anion ; OH^{\cdot} : hydroxyl radical ; $ONOO^{\cdot-}$: peroxynitrite ; **SOD** : superoxyde dismutase ; **GSHPx** : glutathion peroxydase ; **GSH** : glutathion ; **GSSG** : glutathion-S-S-glutathion ; **GR** : glutathion réductase ; H_2O_2 : hydrogène peroxyde ; **NADPH** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; **NO** : nitric oxide (Kayama, Raaz, 2015)

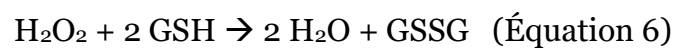
Les SOD sont les enzymes antioxydantes les plus réactives et font partie de la première ligne de défense pour lutter contre les ROS générés en situation de stress oxydatif. Elles agissent sur $O_2^{\cdot-}$ en le convertissant en H_2O_2 et en O_2 , qui peut à son tour être détruit par la suite par la catalase ou la GPx (Équation 4). Ces enzymes sont présentes dans presque toutes les cellules aérobies et dans les fluides extracellulaires. On distingue 3 isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée au cuivre et au zinc (Cu/ZnSOD, ou SOD1), une forme mitochondriale associée au manganèse (MnSOD ou SOD2) et une forme extracellulaire (EcSOD ou SOD3) (Mates 2000, Zelko, Mariani et al., 2002).



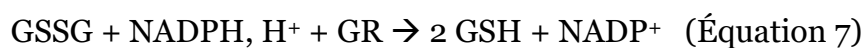
La catalase a été la première enzyme antioxydante à être caractérisée et est l'une des plus efficaces et actives. Elle se compose de quatre sous-unités tétraédriques identiques contenant chacune un groupe d'hème. La catalase agit en catalysant la conversion de H_2O_2 en H_2O et en O_2 , à la suite de la dismutation de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ par la SOD (Équation 5). Elle est largement exprimée dans les peroxysomes mais est également présente dans le cytosol. Malgré le fait que la catalase ne soit pas indispensable pour certains types cellulaires en situation physiologique, elle joue un rôle important dans l'acquisition de la tolérance au stress oxydatif chez la réponse adaptative cellulaire (Hunt, Sim et al., 1998, Sena, Pereira et al., 2013).



Les GPx sont une famille d'enzymes antioxydantes majoritairement présentes dans les mitochondries puis en moins grande quantité dans le cytosol et le milieu extracellulaire (Ghisolfi-Marque, Boyer et al., 1996). Elle se compose de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium sous forme de sélénocystéine. On distingue plusieurs isoformes de GPx dont la forme la plus abondante qui est la GPx-1. La GPx agit comme la catalase pour réduire le H_2O_2 en H_2O par l'intermédiaire du glutathion réduit (GSH) (Équation 6) (Ceriello, dello Russo et al., 1996).



À la suite des réactions catalysées par la GPx, une molécule de glutathion oxydée est formée (GSSG). Pour régénérer la production de glutathion (GSH), la cellule fait appel à la **glutathion réductase** (GR) qui va réduire les ponts disulfures et former ainsi du GSH et du NADP^+ , grâce à son activité d'oxydoréductase dépendante des NADPH exprimées dans les mitochondries et le cytosol (Équation 7). De ce fait, l'action de la GR est indispensable pour le maintien de la quantité de GSH (Mates, Perez-Gomez et al., 1999).



Le GSH est un antioxydant puissant formé à partir de l'association de glycine, de cystéine et de glutamate. Ce tripeptide est exprimé sous deux formes : sa forme oxydée GSSG et sa forme réduite GSH. Comme exposé précédemment, il participe à la réaction catalysée par la GPx (Équation 7) et apparaît comme un antioxydant important dans la régulation du statut redox. Par ailleurs, le ratio GSH/GSSG est utilisé comme marqueur du stress oxydatif dans de nombreuses études. En effet, de manière proportionnelle, plus le flux de H₂O₂ est significatif, plus le GSH est consommé et plus le GSSG augmente (Mates, Perez-Gomez, 1999, Biswas, Chida et al., 2006).

L'HO-1 ou HMOX-1 est une oxydoréductase impliquée dans la dégradation de l'hème libre et de la formation de monoxyde de carbone, de biliverdine et de bilirubine qui sont des composés antioxydants (**Figure 33**). On en distingue deux isoformes : HO-1 et HO-2. HO-2 est constitutive et est retrouvée de manière ubiquitaire dans les cellules endothéliales alors que HO-1 est induite en réponse au stress oxydatif. HO-1 est capable de détoxifier l'hème et inhiber la libération du fer responsable d'une production marquée de ROS. Durant la réaction, la biliverdine est transformée en bilirubine via l'action de la biliverdine réductase. Par ailleurs, le fer libéré est pris en charge par la ferritine. Les composés antioxydants montrent également des propriétés anti-inflammatoires en inhibant l'action de cytokines pro-inflammatoires sécrétées et les dommages associés (Sena, Pereira, 2013, Xueyan, Shupeng et al., 2019).

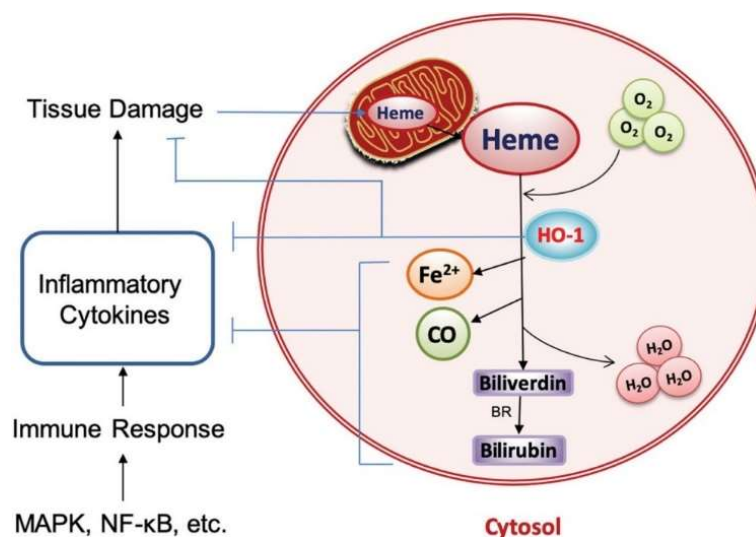


Figure 33 : Activité antioxydante de HO-1.

BR : biliverdine réductase ; **CO** : monoxyde de carbone ; **Fe²⁺** : ions ferreux ; **H₂O** : eau ; **HO-1** : hème oxygenase-1 ; **MAPK** : mitogen-activated protein kinase ; **NFκB** : nuclear factor – κB ; **O₂** : dioxygène
(*Xueyan, Shupeng, 2019*)

La thiorédoxine (Trx) est une petite molécule exprimée dans les CML. Sachant qu'elle a une porte dans son site actif une paire de résidus cystéine, elle piège les ROS et réduit fortement leur pont disulfure. En plus de capter les ROS, la Trx possède une propriété anti-inflammatoire (Sena, Pereira, 2013). Le système des Tx agit parallèlement à celui du glutathion.

3.4.2. Les antioxydants non-enzymatiques

Le système antioxydant non-enzymatique englobe des composés de nature endogène, ou apportés par l'alimentation. Ces molécules exposées ci-dessous jouent un rôle important dans la détoxification des ROS grâce à leur propriété antioxydante.

L'acide α-lipoïque (AAL) est un antioxydant lipo- et hydrosoluble permettant de détoxifier les radicaux libres dans divers compartiments cellulaires. Il a été démontré que l'AAL est capable d'empêcher l'augmentation du cholestérol plasmatique et l'apparition de lésions athéromateuses causées par le diabète. De plus, il participe à la récupération des cellules β pancréatiques productrices d'insuline (Yi and Maeda 2006).

Les vitamines sont des substances organiques apportées par l'alimentation nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme et essentielles dans la neutralisation des ROS. Les vitamines **C** (acide ascorbique) et **E** (α-tocophérol) sont des antioxydants particulièrement actifs. Comme l'organisme n'est pas capable de synthétiser ces vitamines, un apport d'origine alimentaire est requis. Les vitamines sont retrouvées essentiellement dans les fruits et les légumes pour la vitamine C et dans les huiles végétales, les noix et autres céréales pour la vitamine E. La consommation journalière des vitamines C et E est d'environ 90 mg/jour et 12 mg/jour, respectivement (Scalbert and Williamson 2000). De plus, une étude réalisée chez des patients atteints de néphropathie diabétique a démontré la capacité de ces deux vitamines antioxydantes

à réduire considérablement les taux d'excrétion urinaire d'albumine et d'HbA1c (Kuchake and Dr 2011).

Les caroténoïdes sont des tétraterpénoïdes précurseurs de la vitamine A et en particulier du β -carotène. Ce sont des pigments de couleur jaune-orangée présents dans les fruits et les légumes, et leur consommation journalière est estimée à 5 mg/jour (Scalbert and Williamson 2000). Le β -carotène agit grâce à sa longue chaîne carbonée riche en doubles liaisons en piégeant les molécules d'oxygène singulet formées par les radiations solaires (Stahl and Sies 2012). De structure lipophile, ces antioxydants ciblent principalement les lipides oxydés.

Les oligoéléments sont des petits minéraux nécessaires à l'organisme en petite quantité. Les oligoéléments tels que le cuivre (Cu), le zinc (Zn), la manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont les cofacteurs indispensables à l'activité des enzymes antioxydantes endogènes impliquées dans la détoxification des ROS produits lors d'un stress oxydatif (Mates 2000).

Les polyphénols représentent les antioxydants les plus abondants de l'alimentation humaine. Ils sont retrouvés en quantité variable dans les fruits, les légumes et les boissons comme le thé et les infusions. Plusieurs études ont mis en avant les propriétés bénéfiques des composés polyphénoliques sur la fonctionnalité endothéliale par plusieurs mécanismes moléculaires (Croft 2016). Cette partie sera détaillée dans un chapitre ultérieur de ce manuscrit [Paragraphe 6.1 : Les polyphénols].

3.4.3. Le facteur de transcription Nrf2

Nrf2 pour « nuclear factor erythroid-2-related factor 2 » est un facteur de transcription dépendant de la protéine « Kelch-like ECH associated protein-1 » appelée Keap1 qui est une protéine riche en cystéine et sensible à l'équilibre du statut redox. Il se compose de sept domaines fonctionnels indispensables à sa régulation et au maintien de sa fonction. Il s'agit de domaines « Nrf2-enoyl-CoA hydratase (ECH) homology » (Neh1-7). Tandis que les domaines Neh1, 3, 4 et 5 favorisent la transactivation de Nrf2, à l'inverse, les domaines Neh2, 6 et 7 sont impliqués dans son inhibition (Jung, Yoo et al., 2018). En condition physiologique, Nrf2 est associé à Keap1 par ces deux motifs

ETGE et DLG (**Figure 34**). CUL3 entraîne leur ubiquitination puis leur dégradation par le protéasome. En état de stress oxydatif, Nrf2 se dissocie de la protéine Keap1 sous l'action d'espèces pro-oxydantes capables d'oxyder les résidus de Keap1 et de permettre sa libération. A la suite de cet évènement, Nrf2 est transloqué vers le noyau, se fixe sur le promoteur de gènes cibles contenant une séquence appelée ARE (antioxydant response element) et induit leur expression qui aboutit notamment à la production des enzymes antioxydantes. La small musculoaponeurotic fibrosarcoma (sMaf) participe à la régulation de cette étape (Ahmed, Luo et al., 2017). Les enzymes antioxydantes et détoxifiantes principalement régulées par le facteur de transcription Nrf2 sont la SOD, la catalase, , la HO-1, la GPx, la GR, la glutathion S-transférase (GST), la thiorédoxine réductase, l'iNOS, la COX-2, le facteur NFκB, la gamma glutamylcystéine synthase (γ-GCS) et la NADPH déshydrogénase quinone (NQO-1) (Jung, Yoo, 2018).

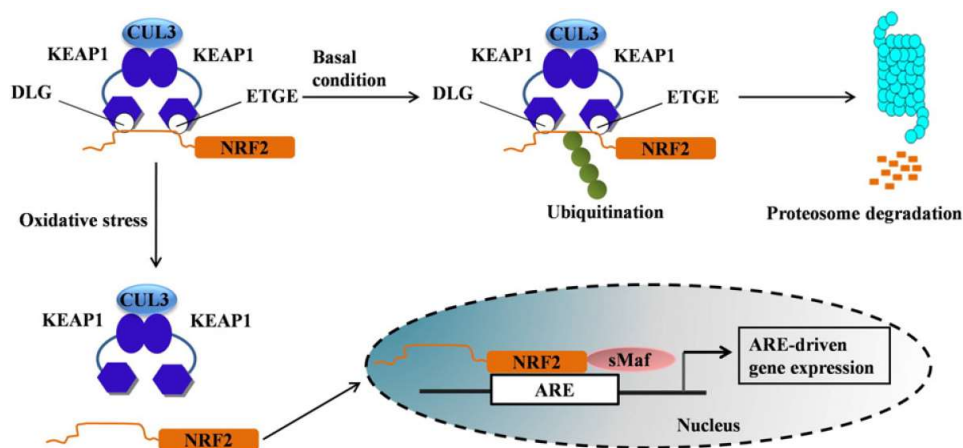


Figure 34 : Régulation du facteur de transcription Nrf2 dépendante de Keap1.

ARE : antioxidant response element ; **KEAP1** : Kelch-like ECH associated protein ;

NRF2 : nuclear factor erythroid-2-related factor 2

(Ahmed, Luo, 2017)

Plusieurs études ont confirmé l'effet protecteur de Nrf2 sur la pathologie diabétique et les complications associées (Priestley, Kautenburg et al., 2016, Sharma, Rizky et al., 2017). En effet, Wang et ses collaborateurs ont démontré que lorsque Nrf2 est inhibé par siRNA chez des cellules endothéliales progénitrices isolées à partir de souris diabétiques, les niveaux de ROS et de MDA sont augmentés alors que l'activité

antioxydante de la SOD est significativement diminuée. A l'inverse, la surexpression de Nrf2 a protégé contre les dommages fonctionnels induits par le stress oxydatif dans les cellules endothéliales progénitrices dérivées de souris diabétiques (Wang, Liu et al., 2018).

3.5. Impact du stress oxydatif sur le développement de l'insulinorésistance

La surcharge nutritionnelle et l'hyperglycémie associées à la pathologie diabétique et à l'obésité sont connues pour induire un stress oxydatif caractérisé par une génération excessive de ROS issus des mitochondries, du RE ou des NOXs et une production accrue de cytokines pro-inflammatoires par différents types cellulaires tels que les cellules immunitaires et les cellules graisseuses. Lorsque le H_2O_2 se diffuse dans le cytoplasme, il va favoriser l'activation des protéines kinases Ser / Thr telles que l'inhibiteur de $NF\kappa B$ ($IKK\beta$), $PKC\theta$ et les MAPK, JNK et p38, qui phosphorylent l'IRS-1/2. Cette phosphorylation inhibe la liaison entre IRS-1/2 et leur récepteur IR, favorisant ainsi la dégradation de l'IRS-1/2 et supprimant le recrutement et l'activation de PI3K (**Figure 35**) (Tiganis 2011). Cet enchaînement d'évènements physiopathologiques conduit sur le long terme à l'installation de l'insulinorésistance.

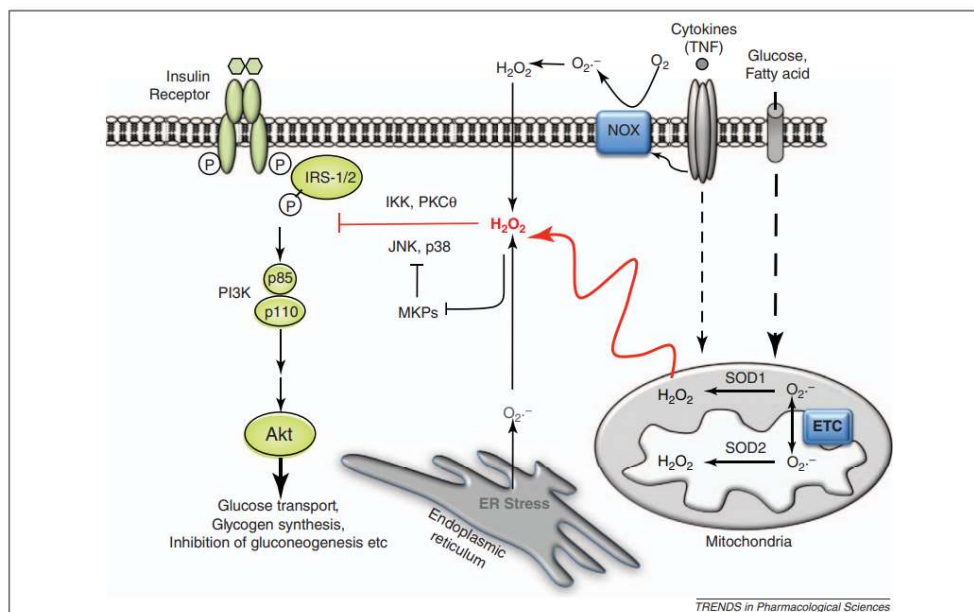


Figure 35 : Impact des ROS sur la voie de signalisation de l'insuline menant à l'insulinorésistance.

ETC : electron transport chain ; **H₂O₂** : hydrogen peroxide ; **IKK** : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase ; **JNK** : c-Jun N-terminal kinase ; **IRS1/2** : insulin receptor substrate 1/2 ; **MKPs** : map kinase phosphatases ; **NOX** : NADPH oxidase ; **O₂⁻** : superoxide anion ; **O₂** : dioxygen ; **PKC θ** : protein kinase C θ ; **PI3K** : phosphoinositide 3-kinase ; **SOD1-2** : superoxide dismutase 1 (Cu/ZnSOD) -2 (MnSOD) ; **TNF** : tumor necrosis factor
(Tiganis 2011)

3.4. Dysfonctionnement endothélial

Le stress oxydatif est largement impliqué dans la pathogenèse des complications diabétiques. En effet, l'hyperglycémie induit une augmentation de la production de radicaux libres et ces derniers apparaissent comme les agents responsables de la dysfonction des cellules endothéliales dans le cadre de la pathologie diabétique. Le stress oxydatif est connu pour induire le découplage d'eNOS, où celle-ci passe d'une enzyme productrice de NO en une enzyme productrice d'O₂⁻ (**Figure 36**). En effet, dans le cas où la production de la L-arginine ou de la BH₄ est altérée voire absente, l'enzyme eNOS va être découplée de la synthèse de NO et les électrons de l'hème vont réduire l'oxygène moléculaire en générant de l'O₂⁻ par les cellules endothéliales. Cet évènement induit un stress oxydatif et une dérégulation des voies de signalisation liées à la sécrétion et à l'action de NO (Thomas, Witting et al., 2008). La dégradation accélérée du NO par les ROS représente la cause majeure de la dégradation de la biodisponibilité de NO chez un patient atteint de maladie cardiovasculaire (Behrendt and Ganz 2002). Chez des patients diabétiques, on constate une élévation des taux de O₂⁻ au niveau vasculaire et ceux-ci interagissent facilement avec le NO pour former du ONOO⁻, associés à une réduction de la biodisponibilité de NO, contribuant ainsi à une altération de la vasodilatation de l'endothélium (Wolin, Gupte et al., 2010).

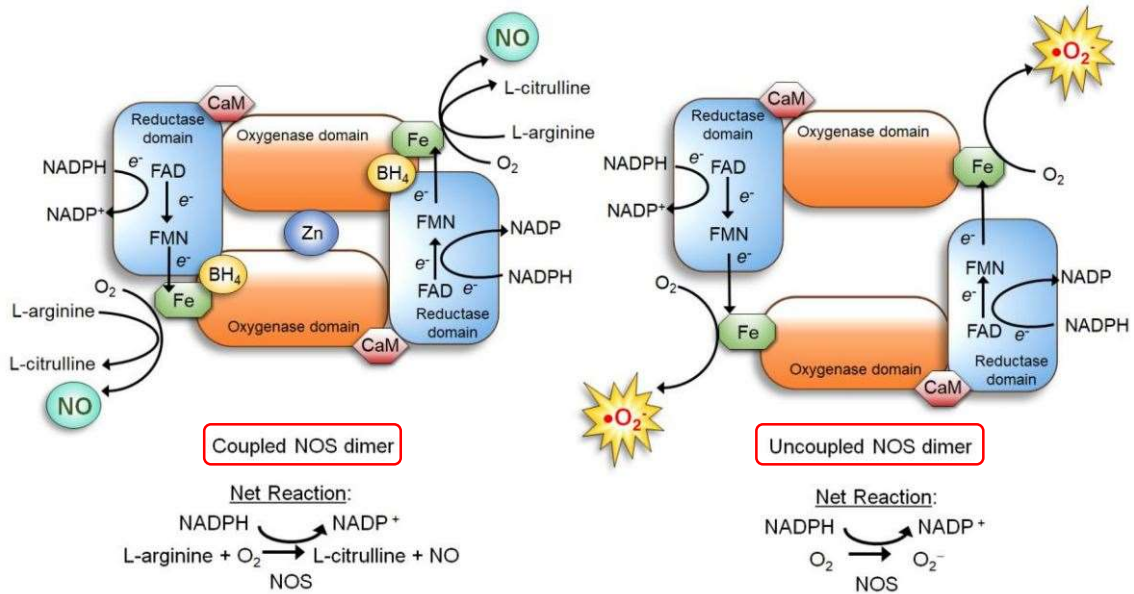


Figure 36 : Découplage du dimère eNOS.

CaM : calmoduline ; **FAD** : flavine adénine dinucléotide ; **FMN** : flavine mononucléotide ; **NADP⁺** : glycérol déshydrogénase ; **NADPH** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; **NO** : nitric oxide ; **NOS** : nitric oxide synthase ; **O₂^{•-}** : superoxide anion ; **O₂** : dioxygène

(Fernando, Zheng et al., 2019)

En situation physiopathologique à la suite de stimuli physiques ou chimiques, Plusieurs évènements caractérisés par une génération excessive de ROS à la suite de l'activation prolongée de complexes enzymatiques producteurs de ROS, induisent un stress oxydatif et une baisse de la biodisponibilité de NO (**Figure 37**). De ce fait, ces dommages oxydatifs induisent une dysfonction de l'endothélium, associée à une vasoconstriction ou encore à un état pro-inflammatoire (Cai and Harrison 2000).

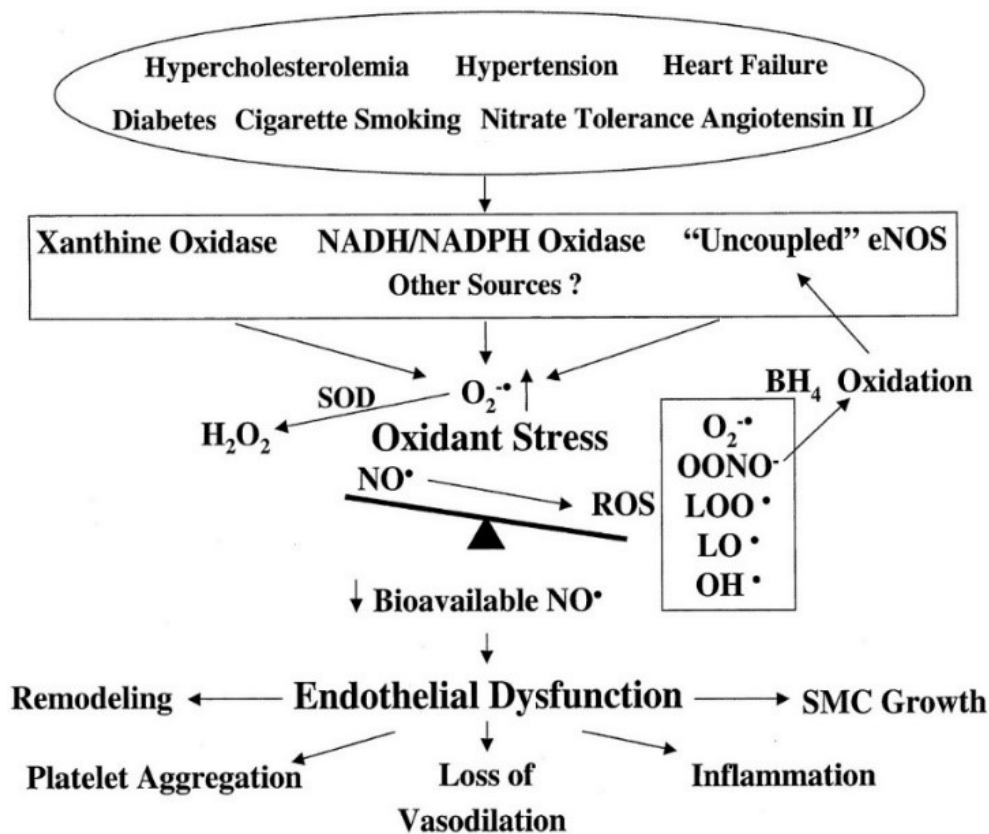


Figure 37 : Mécanisme de la dysfonction endothéliale induite par le stress oxydatif.

(Cai and Harrison 2000)

4. La réponse inflammatoire

La découverte selon laquelle le DT2 et l'obésité sont associés à l'inflammation a été décrite pour la première fois dans une publication phare de Hotamisligil et al., en 1993. En effet, la pathologie diabétique intimement liée à l'obésité va induire ensemble des dommages cellulaires et moléculaires causant sur le long terme une dérégulation du statut inflammatoire (Hotamisligil, Shargill et al., 1993). Il a été démontré que les augmentations des niveaux de TNF- α et de l'IL-6 associés au DT2 et à l'obésité peuvent inhiber la transduction du signal de l'insuline, interférer avec l'action de l'insuline et supprimer l'effet anti-inflammatoire de l'insuline, favorisant l'inflammation. Par conséquent, l'inflammation est un médiateur non seulement du dysfonctionnement endothélial, mais aussi de la résistance à l'insuline et de l'athérosclérose (Dandona, Aljada et al., 2004). L'inflammation est un processus favorisé par des stimuli nocifs tels que des agents pathogènes, des facteurs physiques ou chimiques ou un état

pathologique prononcé (**Figure 38**). On distingue deux types d'inflammation : l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique. La première est limitée par rétrocontrôle et est bénéfique pour l'hôte alors que la seconde est prolongée et est caractéristique de maladies et de complications. L'activation de voies de signalisation pro- et anti-inflammatoires, la production de cytokines pro-inflammatoires et l'infiltration de cellules immunitaires associée à la production de molécules d'adhésion sont les principales caractéristiques observées dans le processus de l'inflammation (Margetic 2012).

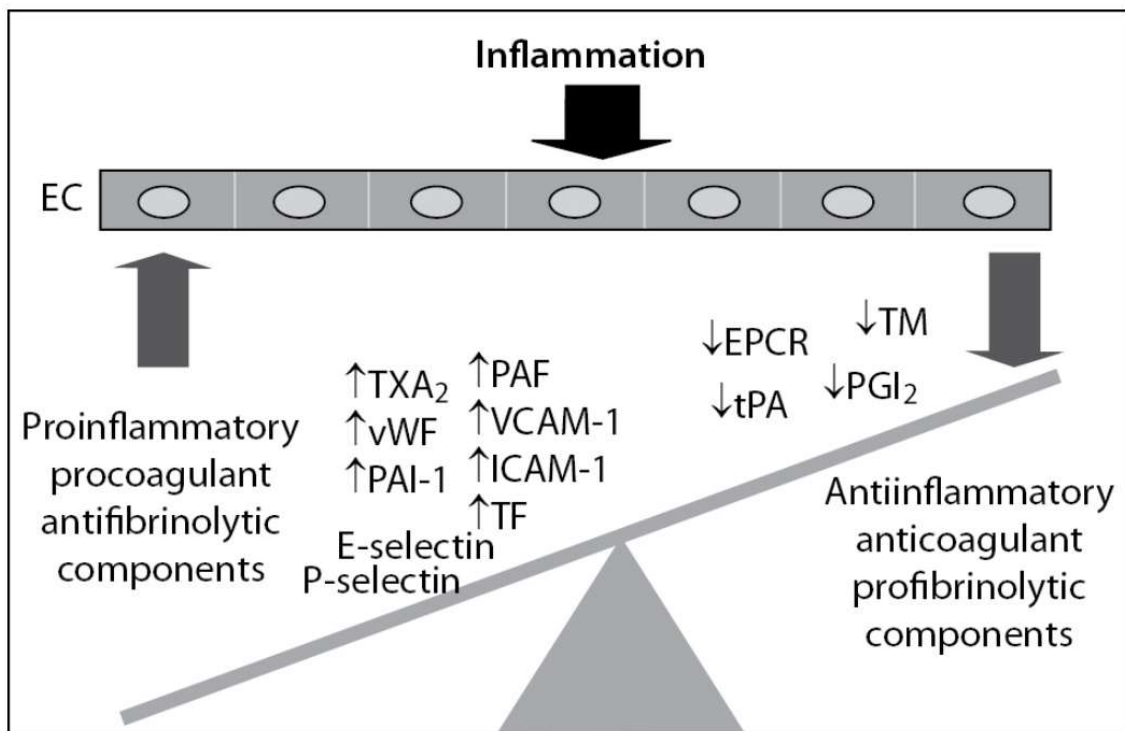


Figure 38 : Dysfonction endothéliale induite par l'inflammation.

EC : endothelial cell ; **EPCR** : endothelial protein C receptor ; **ICAM-1** : intercellular adhesion molecule-1 ; **PAF** : platelet-activating factor ; **PAI-1** : plasminogen activator inhibitor-1 ; **PGI₂** : prostacyclin ; **TF** : tissue factor ; **TM** : thrombomodulin ; **tPA** : tissue plasminogen activator ; **TXA₂** : thromboxane A₂ ; **VCAM-1** : vascular cell adhesion molecule-1 ; **vWF** : von Willebrand factor

(Margetic 2012)

4.1. Voies de signalisation impliquées dans le statut inflammatoire

4.1.1. NFκB

NFκB est un facteur de transcription redox-sensible régulant l'expression de gènes codant pour de nombreuses cytokines, des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion et des enzymes impliquées dans les réponses immunitaires et inflammatoires. Cette voie représente la principale voie pro-inflammatoire de l'organisme (Sun and Oberley 1996). NFκB comprend 5 éléments, à savoir NFκB1 (p105 et p50), NFκB2 (p100 et p52), c-Rel, RelB et RelA (p65). On distingue deux voies de signalisation menant à la translocation nucléaire de NFκB : la voie canonique qui se déclenche en réponse aux microbes, infections et cytokines pro-inflammatoires et la voie alternative induite par certains membres de la famille des cytokines. La voie canonique favorise la translocation de p50 ou p65/RelA et la voie non-canonique celle de p52/RelB (**Figure 39**). Concernant la première voie, elle est constituée d'un complexe IKK composé de deux sous-unités kinases hautement homologues, IKKα et IKKβ et d'une sous-unité régulatrice non enzymatique, IKKγ ou NEMO pour « NFκB essential modulator ». Celle-ci est activée par la phosphorylation de IκBα par le complexe IKK, induisant l'ubiquitination de IKK et sa dégradation par le protéasome 26S, libérant ainsi le complexe dimérique p50/RelA. Une fois libéré, le dimère se transloque vers le noyau, se lie à l'ADN et active la transcription des gènes cibles. Dans la deuxième voie, non-canonique, IKKα est activé par la NFκB-inducing kinase (NIK). Lorsque le complexe NIK/IKKα-p100 est formé, l'unité p100 est ensuite phosphorylée puis dirigée vers le protéasome provoquant ainsi la libération et la translocation nucléaire du dimère p52/RelB avec induction de l'expression d'agents délétères (Galley and Webster 2004, Luo, Kamata et al., 2005) .

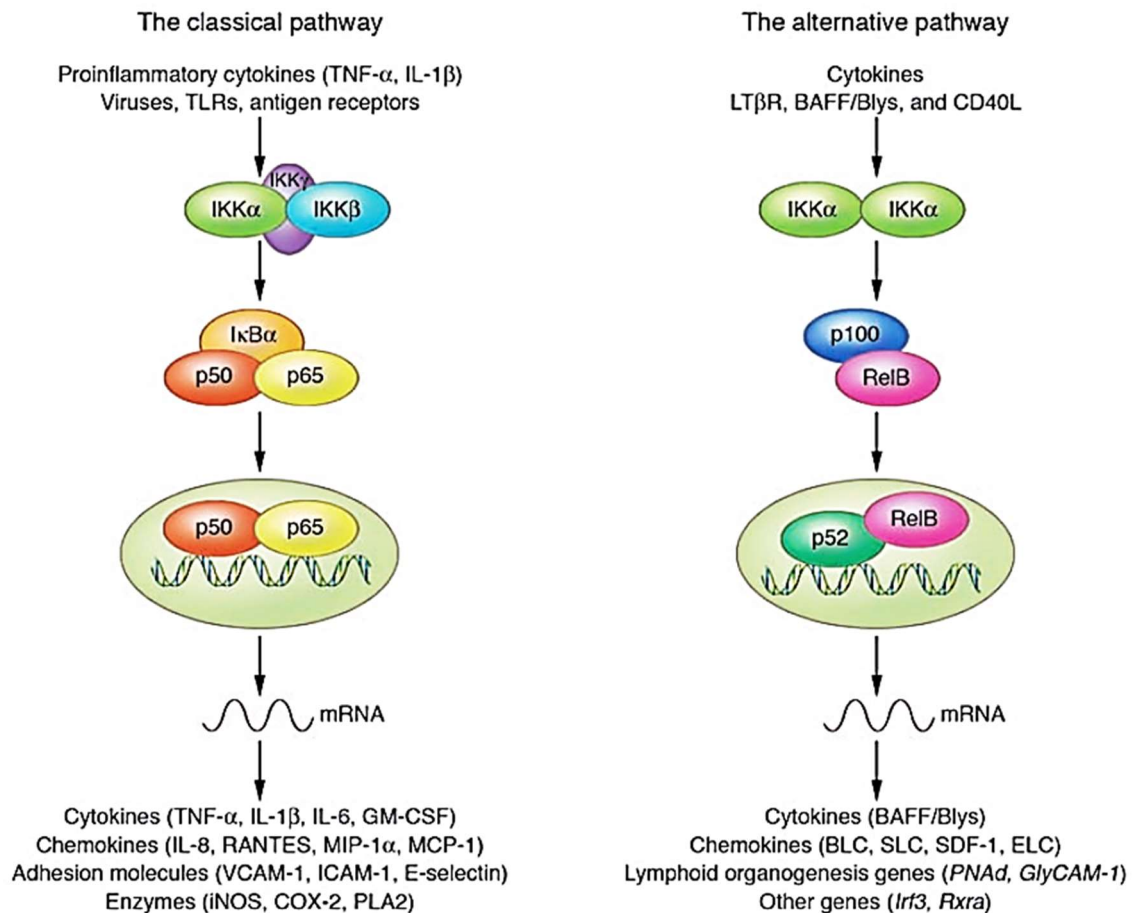


Figure 39 : Voies de signalisation de NF κ B.

BAFF/Blys : B-cell activating factor / B lymphocyte stimulator ; **BLC** : B lymphocyte chemoattractant ; **CD40L** : cluster of differentiation 40 ligand ; **COX-2** : cyclooxygenase-2 ; **ELC** : EBV-induced-molecule-1 ligand chemokine ; **E-selectin** : endothelial adhesion molecule ; **GM-CSF** : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; **ICAM-1** : intercellular adhesion molecule-1 ; **IKK** : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase ; **IL** : interleukin ; **iNOS** : inducible nitric oxide synthase ; **Irf3** : **LT β R** : lymphotoxin beta receptor ; **GlyCAM-1** : glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 ; **MCP-1** : monocyte chemoattractant protein-1 ; **MIP-1 α** : macrophage inflammatory protein-1 alpha ; **mRNA** : messenger ribonucleic acid ; **PLA2** : phospholipase A2 ; **PNAd** : peripheral node addressin ; **RANTES** : regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted ; **Rxra** : retinoid X receptor alpha ; **SDF-1** : stromal cell-derived factor-1 ; **SLC** : secondary lymphoid tissue chemokine ; **TLRs** : toll like receptors ; **TNF- α** : tumor necrosis factor α ; **VCAM-1** : vascular cell adhesion protein-1 (Galley and Webster 2004, Luo, Kamata, 2005)

4.1.2. AMPK

L'AMPK est un régulateur métabolique crucial responsable du maintien de l'homéostasie énergétique et qui peut exercer une activité pouvant moduler l'inflammation. Ce complexe hétérotrimérique est constitué d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 et γ_3) qui favorisent la stabilité du complexe AMPK (Kurth-Kraczek, Hirshman et al., 1999). L'activation de la voie AMPK repose sur la liaison allostérique de l'AMP à la sous-unité γ et la phosphorylation de la thréonine 172 sur la sous-unité α modulée par les kinases « Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase β » (CaMKK β) et la « liver kinase B1 » (LKB1), essentielle pour assurer l'activation de l'AMPK. Enfin, les protéines phosphatases 2A (PP2A) et 2C (PP2C) induisent la déphosphorylation de la thréonine 172, qui peut être inhibée par la liaison de l'AMP à l'AMPK. Une fois activée, AMPK favorise les réactions métaboliques génératrices d'ATP et réduit les voies anaboliques consommatrices d'ATP (**Figure 40**) (Jiang, Tan et al., 2019).

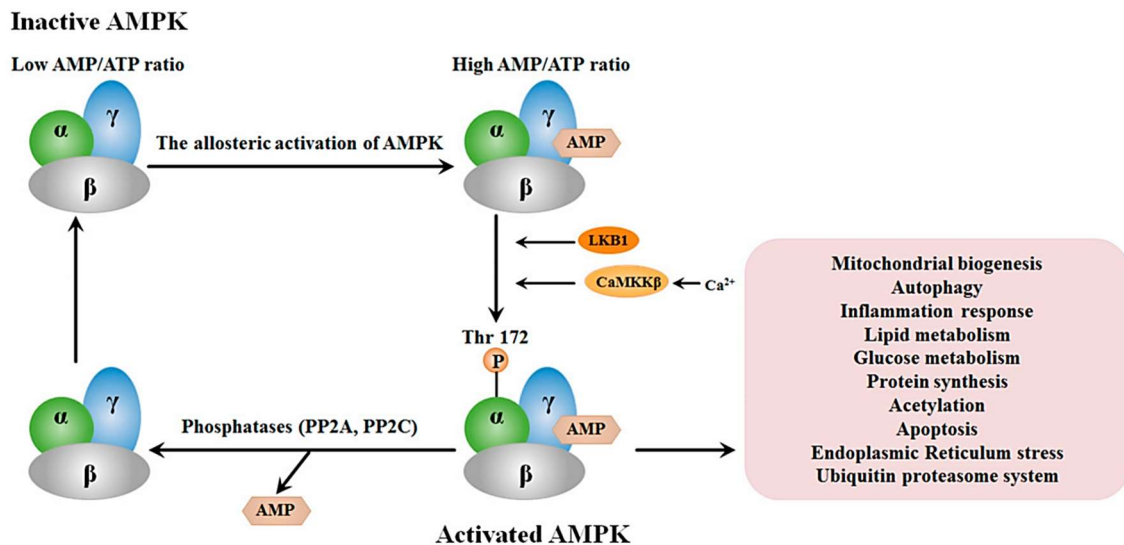


Figure 40 : Mode d'action et principales fonctions de l'AMPK.

AMP : adenosine monophosphate ; **AMPK** : adenosine monophosphate-activated protein kinase ; **ATP** : adenosine triphosphate ; **Ca²⁺** : calcium ion ; **CaMKK β** : Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase β ; **LKB1** ; **PP2A** : protein phosphatase 2A ; **PP2C** : protein phosphatase 2C

(Jiang, Tan, 2019)

Des études ont démontré que l'AMPK joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie du glucose et son activation favorise le transport du glucose de la même manière que l'insuline. En effet, elle stimule l'absorption du glucose par les cellules musculaires squelettiques via la translocation du transporteur GLUT4 (Kurth-Kraczek, Hirshman, 1999). Par ailleurs, l'AMPK apparaît également comme un régulateur essentiel du métabolisme des lipides en induisant l'oxydation des acides gras dans les muscles et le foie via la stimulation d'acétyl-co carboxylase (ACC) et l'inhibition de la carnitine palmitoyltransférase-1 (CPT-1), et en réduisant la synthèse du cholestérol et des triglycérides dans le foie (Schimmack, DeFronzo et al., 2006). Elle diminue aussi la gluconéogenèse hépatique et la synthèse du glycogène dans les muscles squelettiques. De plus, l'AMPK s'avère être un important médiateur des effets métaboliques des hormones libérées par les tissus périphériques, comme l'insuline, la leptine, l'adiponectine et la résistine, qui jouent un rôle crucial dans le métabolisme de la sensibilité à l'insuline (Lage, Diéguez et al., 2008). Enfin, l'activation de l'AMPK participe à la régulation du statut redox en diminuant la production d'espèces pro-oxydantes, en favorisant celle d'espèces détoxifiantes et en modulant diverses complications et dérégulations relevées dans les processus d'athérosclérose et de la dysfonction endothéliale associées au DT2 (**Figure 41**) (Xu and Zou 2009).

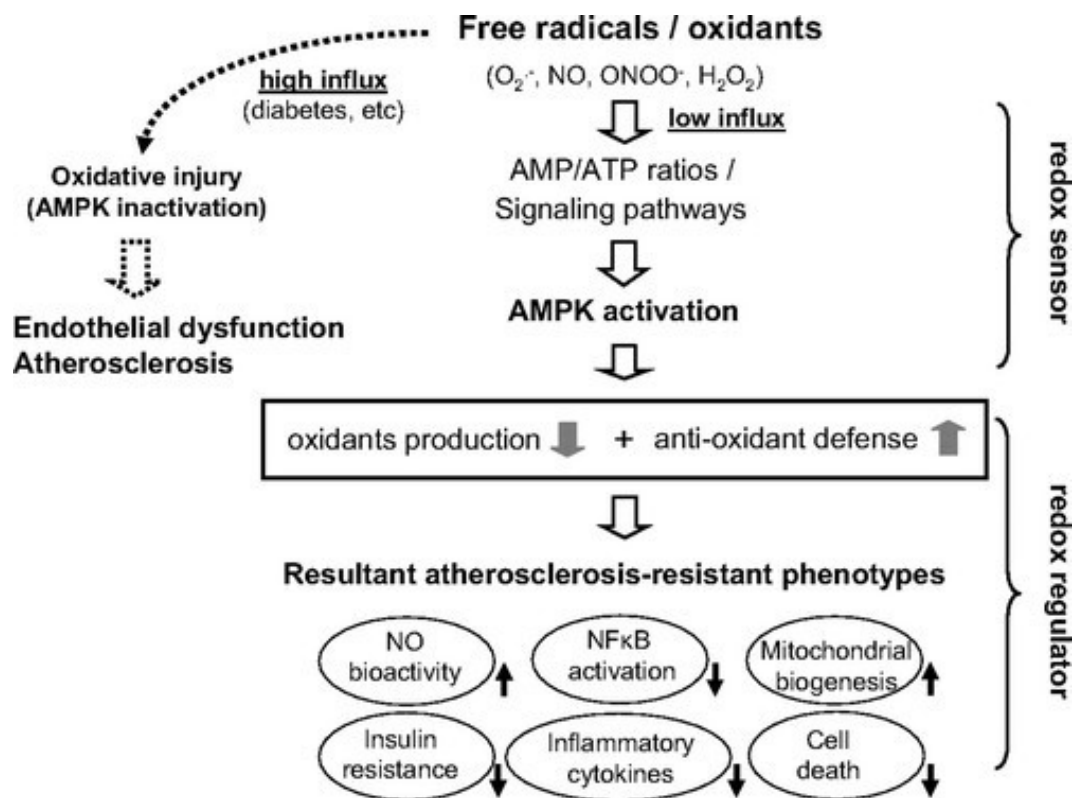


Figure 41 : Représentation schématique des effets de l'AMPK sur l'équilibre vasculaire dans le cadre du diabète.

AMP : adenosine monophosphate ; **AMPK** : adenosine monophosphate-activated protein kinase ; **ATP** : adenosine triphosphate ; **H₂O₂** : hydrogen peroxide ; **NFκB** : nuclear factor kappa B ; **NO** : nitric oxide ; **O₂^{·-}** : superoxide anion ; **ONOO^{·-}** : peroxynitrite

(Xu and Zou 2009)

4.1.3. La famille des PPARs

Les PPARs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux stéroïdiens agissant comme des facteurs de transcription. Ils sont notamment impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique et de la différenciation adipocytaire. Lorsque les PPARs sont activés, ils forment des hétérodimères en se liant sur les récepteurs des rétinoïdes X (RXR) et ils modulent la transcription de gènes cibles après s'être fixés sur des séquences spécifiques PPRE pour « peroxisome proliferator response elements » (Wójtowicz, Strosznajder et al., 2020). Ainsi, l'activation des PPARs peut contrôler l'expression des gènes impliqués dans le

métabolisme des lipides et du glucose, et constitue un puissant moyen de régulation de leur transcription. On distingue trois sous-types de PPARs, à savoir les PPAR α , β/δ et γ , exprimés dans différents types cellulaires. Il existe également deux isoformes de PPAR γ : PPAR γ 1 et PPAR γ 2. PPAR γ 1 est retrouvé dans de nombreux tissus tels que le foie, ou les muscles alors que PPAR γ 2 est préférentiellement exprimé dans le tissu adipeux (Berger and Moller 2002). PPAR γ agit avec l'aide de son coactivateur PGC-1 α pour « peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha » dans le but de jouer un rôle protecteur dans la différenciation cellulaire ainsi que dans la biogénèse des mitochondries, dans la neurodégénérescence et la neuroinflammation (Austin and St-Pierre 2012, Benedetti E 2018).

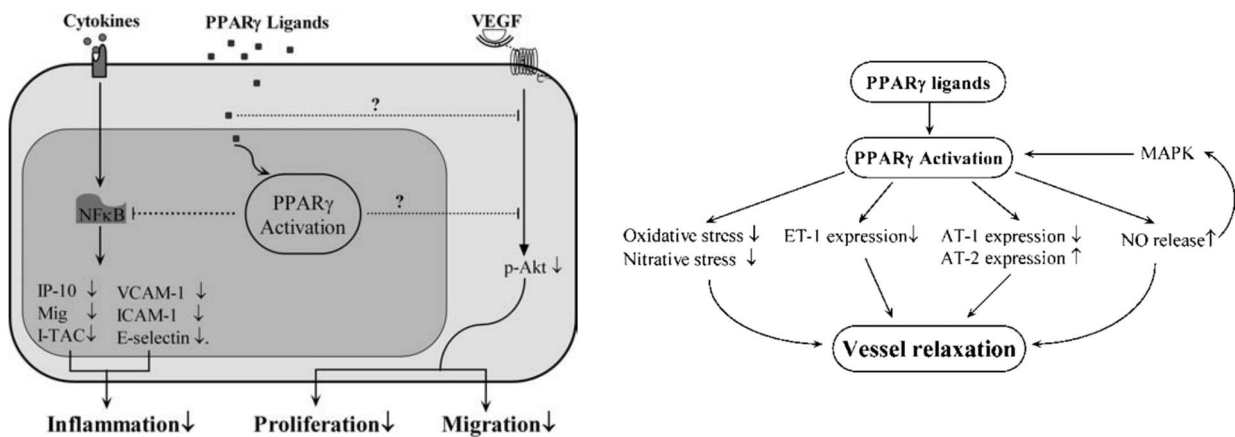


Figure 42 : Représentation schématique de l'activation de PPAR γ sur les cellules endothéliales et sur le tonus vasculaire.

AT-1/-2 : angiotensin II type-1/-2 ; **E-selectin** : endothelial adhesion molecule ; **ET-1** : endothelin-1 ; **ICAM-1** : intercellular adhesion molecule-1 ; **IP-10** : IFN-inducible protein of 10 kDa ; **I-TAC** : IFN-inducible T-cell α -chemoattractant ; **MAPK** : mitogen-activated protein kinase ; **Mig** : monokine induced by IFN- γ ; **NF κ B** : nuclear factor kappa B ; **NO** : nitric oxide ; **PPAR γ** : peroxisome proliferator-activated receptor gamma ; **VCAM-1** : vascular adhesion molecule-1 ; **VEGF** : vascular endothelial growth factor

(Hamblin, Chang et al., 2009)

Une fois activé, PPAR γ joue un rôle anti-inflammatoire en inhibant l'activité de NF κ B et par conséquent la production de molécules impliquées dans l'adhésion monocytaire. De plus, cette activation va diminuer la prolifération et la migration des cellules

endothéliales. Enfin, PPAR γ induit un contrôle positif sur le tonus vasculaire via une augmentation de la libération du vasodilatateur NO par régulation de la MAPK ainsi qu'une réduction du stress oxydatif et de la production d'agents vasoconstricteurs comme ET-1 (**Figure 42**) (Hamblin, Chang, 2009).

4.1.4. La famille des PGC1

La famille des PGC1 représente le coactivateur transcriptionnel jouant un rôle majeur dans la régulation du métabolisme cellulaire et notamment dans la biogenèse mitochondriale. On en distingue trois membres, à savoir PGC1- α , PGC1- β et PGC related coactivator (PRC), qui exercent diverses fonctions. Le membre le plus étudié est PGC1- α et est connu pour sa capacité à exercer une régulation positive sur la biogénèse et la respiration mitochondriales, la thermogénèse adaptative, la gluconéogenèse et d'autres processus métaboliques (Handschin and Spiegelman 2006). Par ailleurs, PGC1- α est également un puissant régulateur de l'élimination des ROS, qui agit en augmentant l'expression génique de nombreuses enzymes antioxydantes détoxifiantes des ROS. De ce fait, grâce à son contrôle du métabolisme mitochondrial et de l'élimination des radicaux libres, PGC1- α augmenterait le métabolisme oxydatif et réduirait l'impact des ROS sur la physiologie cellulaire (Austin and St-Pierre 2012).

4.2. Cytokines et adipokines sécrétées durant l'inflammation

4.2.1. Les cytokines

Les cytokines sont définies comme étant des petites protéines de signalisation cellulaires intervenant dans la régulation de leur activité et de leur fonction pro- ou anti-inflammatoire en réponse à un signal activateur (**Tableau 1**). Il existe des catégories de cytokines telles que les chimiokines correspondant aux cytokines avec des activités chimiotactiques et les interleukines représentant les cytokines fabriquées par un leucocyte et agissant sur d'autres leucocytes. Elles peuvent être produites par de nombreux types cellulaires et agissent sur des cellules cibles en se liant à leurs récepteurs spécifiques (Zhang and An 2007, Kany, Vollrath et al., 2019).

Tableau 1 : Origines et fonctions des principales cytokines.

Cytokines	Principal Source	Primary Activity
GM-CSF	Th cells	Growth and differentiation of monocytes and dendritic cells
IL-1 α	Macrophages and other antigen presenting cells (APCs)	Costimulation of APCs and T cells, inflammation and fever, acute phase response, hematopoiesis
IL-2	Activated Th1 cells, NK cells	Proliferation of B cells and activated T cells, NK functions
IL-3	Activated T cells	Growth of hematopoietic progenitor cells
IL-4	Activated T cells	B cell proliferation, eosinophil and mast cell growth and function, IgE and class II MHC expression on B cells, inhibition of monokine production
IL-5	Th2 and mast cells	Eosinophil growth and function
IL-6	Activated Th2 cells, APCs, other somatic cells	Acute phase response, B cell proliferation, thrombopoiesis, synergistic with IL-1 and TNF on T cells
IL-7	Thymic and marrow stromal cells	T and B lymphopoiesis
IL-8	macrophages, somatic cells	Chemoattractant for neutrophils and T cells
IL-9	T cells	Hematopoietic and thymopoietic effects
IL-10	Activated Th2 cells, CD8+ T and B cells, macrophages	Inhibits cytokine production, promotes B cell proliferation and antibody production, suppresses cellular immunity, mast cell growth
IL-11	Atromal cells	Synergistic hematopoietic and thrombopoietic effects
IL-12	B cells, macrophages	Proliferation of NK cells, IFN production, promotes cell-mediated immune functions
IL-13	Th2 cells	IL-4-like activities
IL-18	Macrophages	potent inducer of interferon- γ by T cells and NK cells
IFN- α	Macrophages, neutrophils and some somatic cells	Antiviral effects, induction of class I MHC on all somatic cells, activation of NK cells and macrophages
IFN- γ	Activated Th1 and NK cells	Induces of class I MHC on all somatic cells, induces class II MHC on APCs and somatic cells, activates macrophages, neutrophils, NK cells, promotes cell-mediated immunity, antiviral effects
MIP-1 α	Macrophages	Chemotaxis
MIP-1 β	Lymphocytes	Chemotaxis
TGF- β	T cells, monocytes	Chemotaxis, IL-1 synthesis, IgA synthesis, inhibit proliferation
TNF- α	macrophages, mast cells, NK cells, sensory neurons	Cell death, inflammation, pain
TNF- β	Th1 and Tc cells	phagocytosis, NO production, cell death

APC : antigen-presenting cell ; **GM-CSF** : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; **IL** : interleukin ; **IFN** : interferon ; **MHC** : major histocompatibility complex ; **MIP** : macrophage inflammatory protein ; **NK** : natural killer ; **TGF- β** : transforming growth factor-beta ; **TNF** : tumor necrosis factor (Zhang and An 2007)

➤ **IL-1 β**

IL-1 β est un médiateur clé de la réponse pro-inflammatoire. En effet, il est essentiel pour la réponse de l'hôte et la résistance aux agents pathogènes et aggrave les dommages lors de maladies chroniques et de lésions tissulaires aiguës. IL-1 β joue un rôle majeur dans l'organisme. En effet, il induit la production de PGE2 par l'induction de la COX2, l'élaboration de NO par élévation des iNOS, l'expression de nombreuses cytokines y compris l'activation de sa propre transcription génique, l'expression accrue des molécules d'adhésion, des leucocytes ainsi que la stimulation des cellules impliquées dans l'immunité innée (Libby 2017).

➤ **IL-6**

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire glycosylée de 22 à 27 kDa, sécrétée par le tissu adipeux (1/3 des taux d'IL-6 circulants), le foie et le muscle squelettique (Ouchi, Parker et al., 2011). C'est une cytokine multifonctionnelle ayant un rôle primordial dans la régulation de l'inflammation, de l'hématopoïèse, dans la réponse immunitaire et les mécanismes de défense de l'hôte. Il est à noter que le tissu adipeux viscéral produit plus d'IL-6 que le tissu adipeux sous-cutané et qu'il existe une corrélation entre l'expression d'IL-6 et la résistance à l'insuline. En effet, IL-6 réduit l'expression de l'adiponectine, de GLUT4 et d'IRS1, induisant une insulino-résistance (McArdle, Finucane et al., 2013). En ce qui concerne la voie de signalisation d'IL-6, elle se lie à son récepteur en entraînant l'activation en aval de la glycoprotéine gp130 et de la Janus Kinase 1 (JAK1) relié au domaine cytoplasmique de gp130. L'autophosphorylation de JAK1 induit une cascade de phosphorylation et l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K en amont, puis à l'activation de la transcription de STAT3 en aval. Le facteur de transcription « Signal transducer and activator of transcription 3 » (STAT3) régule la protéine « Suppressor of cytokine signaling 3 » (SOCS3), induisant ainsi des dérégulations de la phosphorylation d'IRS1 qui vont entraîner l'altération de la voie de signalisation de l'insuline (Schmidt-Arras and Rose-John 2016). Au niveau de l'endothélium, IL-6 favorise une augmentation de la perméabilité endothéliale via la phosphorylation de STAT3 médiée par Janus kinase. En effet, plusieurs heures après une réponse maximale d'IL-6, une perte de localisation jonctionnelle de la VE-cadhérine et de ZO-1 est observée, suggérant ainsi que ces événements sont une conséquence de la signalisation IL-6, mais pas une cause de l'augmentation de la perméabilité (Alsaffar, Martino et al., 2018).

➤ **TNF- α**

TNF- α est une cytokine clé impliquée dans la cascade de signalisation de l'inflammation. Cette cytokine pro-inflammatoire est majoritairement sécrétée par les cellules myéloïdes via l'activation des voies de signalisation AMPK et NF κ B. Sa sécrétion induit la libération d'autres cytokines pro-inflammatoires tels qu'IL-1 β et IL-6 (Chen and Goeddel 2002). Cette cytokine agit de manière autocrine sur le tissu adipeux en induisant la dérégulation de la phosphorylation d'IRS1 bloquant ainsi la voie de

signalisation de l'insuline (Paz, Hemi et al., 1997). Chez les sujets obèses, le tissu adipeux se caractérise par une inflammation chronique induite par une infiltration de macrophages en raison de la sécrétion par les adipocytes de la protéine MCP-1 en réponse au TNF- α (Tataranni and Ortega 2005). De plus, TNF- α est un médiateur important de nombreuses maladies cardiovasculaires telles que les lésions d'ischémie-reperfusion myocardique, l'insuffisance cardiaque chronique et l'athérosclérose. En effet, il peut induire une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium en augmentant le stress oxydatif et en diminuant la libération de NO (Picchi, Gao et al., 2006).

➤ **IL-10**

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire produite par les monocytes, les cellules dendritiques, les cellules T et les cellules B. La voie de signalisation d'IL-10 débute par sa liaison à son récepteur pour activer la voie JAK/STAT dans le but d'exercer des effets immunosuppresseurs via l'inhibition de l'activité I κ K (Schottelius, Mayo et al., 1999) ou en induisant la phosphorylation de la tyrosine de STAT3 (Lumeng, Bodzin et al., 2007). L'IL-10 peut jouer un rôle protecteur dans la dérégulation métabolique et l'insulinorésistance induites par l'obésité.

➤ **MCP-1**

La protéine MCP-1, également appelée CCL2 (Chemokine Ligand 2) appartient à la famille des chimiokines et représente un puissant facteur chimiotactique pour les monocytes. Elle se caractérise par la présence de quatre résidus de cystéine formant des ponts disulfures intramoléculaires nécessaires à la stabilisation du peptide. Elle est produite principalement par les macrophages et les cellules endothéliales (Ylä-Herttuala, Lipton et al., 1991), mais est également produite et sécrétée dans le tissu adipeux par les adipocytes matures. La migration des monocytes de la circulation sanguine à travers l'endothélium vasculaire est nécessaire pour la surveillance immunologique de routine des tissus, ainsi qu'en réponse à l'inflammation. La principale fonction de MCP-1 lors de l'inflammation est de permettre aux monocytes de la circulation de devenir des macrophages tissulaires. Elle permet l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux et stimule les adipocytes à produire des cytokines

inflammatoires tels que TNF- α et IL-6 (Hemmrich, Thomas et al., 2007). MCP-1 fait partie des plus puissantes chimiokines et exerce ses fonctions pro-inflammatoires en se fixant sur son récepteur « chemokine receptor type 2 », exprimé dans plusieurs types cellulaires dont les adipocytes, les cellules musculaires et les macrophages.

Concernant l'ensemble des cytokines, hormones et peptides sécrétés par le tissu adipeux, nous parlons plutôt d'adipocytokines ou d'adipokines. Il est à noter que le tissu adipeux joue un rôle clé dans l'homéostasie et le profil inflammatoire systémique via la libération d'adipokines anti-inflammatoires et pro-inflammatoires. Parmi la longue liste de ces adipokines sécrétées, on distingue deux adipokines majeures ayant des fonctions spécifiques : la leptine et l'adiponectine.

4.2.2. La leptine

La leptine est une hormone de 16 kDa principalement sécrétée par le tissu adipeux et est la première adipokine ayant été découverte en 1994. Cette hormone est codée par le gène *ob*, gène identifié comme étant la cause de l'obésité chez les souris *ob/ob*. Elle représente une hormone clé dans la régulation de l'appétit, de la dépense énergétique, du comportement et du métabolisme du glucose. Il existe une corrélation positive entre la concentration plasmatique de leptine et la masse grasse corporelle. De ce fait, cette hormone régule l'apport alimentaire et la dépense énergétique en favorisant la lipolyse et en inhibant la lipogenèse, dans le but de contrôler le stock de graisses dans l'organisme (Zhang, Proenca et al., 1994, Elias, Aschkenasi et al., 1999). **(Figure 43)**. Chez les sujets obèses, les taux circulants très élevés de leptine circulant corrélerent à une teneur en graisses conséquente et une résistance à la leptine. Par ailleurs, des déficiences au niveau de la leptine et de son récepteur induisent un gain de poids très rapide dans les mois suivants la naissance conduisant alors à une obésité sévère (Friedman and Halaas 1998). Plusieurs études rapportent que l'hyperleptinémie joue un rôle causal dans l'angiogenèse mais également dans les maladies cardiovasculaires associées à l'obésité, y compris l'athérosclérose. En effet, la leptine exerce de nombreux effets potentiellement athérogènes tels que l'induction d'un dysfonctionnement endothélial, la stimulation de la réaction inflammatoire avec la production de cytokines pro-inflammatoires, le stress oxydatif avec l'augmentation des ROS, l'agrégation plaquettaire, la migration, l'hypertrophie et la prolifération des CML. De plus, le taux

de leptine plasmatique corrèle avec des marqueurs de l'athérosclérose subclinique tels que l'épaisseur intima-média de l'artère carotide et les calcifications de l'artère coronaire. De ce fait, l'inhibition de la signalisation de la leptine peut être une stratégie pertinente pour atténuer l'apparition et le développement de l'athérosclérose chez les sujets obèses hyperleptinémiques (Beltowski 2006, Morioka, Emoto et al., 2014).

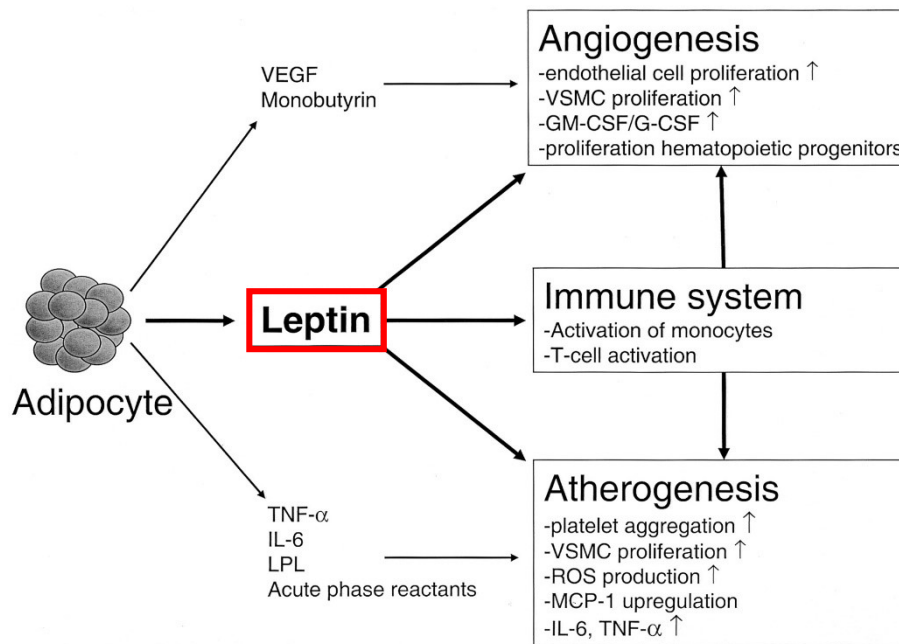


Figure 43 : Représentation schématique des effets de la leptine.

G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor ; **GM-CSF** : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; **IL-6** : interleukin-6 ; **LPL** : lipoprotein lipase ; **MCP-1** : monocyte chemoattractant protein-1 ; **ROS** : reactive oxygen species ; **TNF- α** : tumor necrosis factor alpha ; **VSMC** : vascular smooth muscle cell
(Werner and Nickenig 2004)

4.2.3. L'adiponectine

L'adiponectine est une protéine de 30 kDa qui est majoritairement sécrétée par le tissu adipeux, mais elle peut également être exprimée par les cellules des muscles squelettiques, les cellules myocardiques et les cellules endothéliales. Le taux circulant de cette adipokine anti-athérogène et anti-inflammatoire est situé entre 3 à 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Elle circule sous la forme de trimères, d'hexamères et de multimères de haut poids moléculaire composés de 18 monomères. L'adiponectine se lie à ses récepteurs

spécifiques AdipoR1, AdipoR2 couplés à des protéines G. L'interaction entre l'adiponectine et ses récepteurs induit l'activation de l'AMPK et de molécules de signalisation comme p38 MAPK, PPAR, PGC1- α , Rab5, PI3K/Akt. Par ailleurs, il existe une corrélation négative entre les taux plasmatiques d'adiponectine et la concentration plasmatique du marqueur majeur de l'inflammation, à savoir la CRP chez les patients obèses. Elle inhibe également l'activation de la voie « toll like receptors » (TLRs)/NF κ B dans des macrophages murins (Ouchi, Parker, 2011).

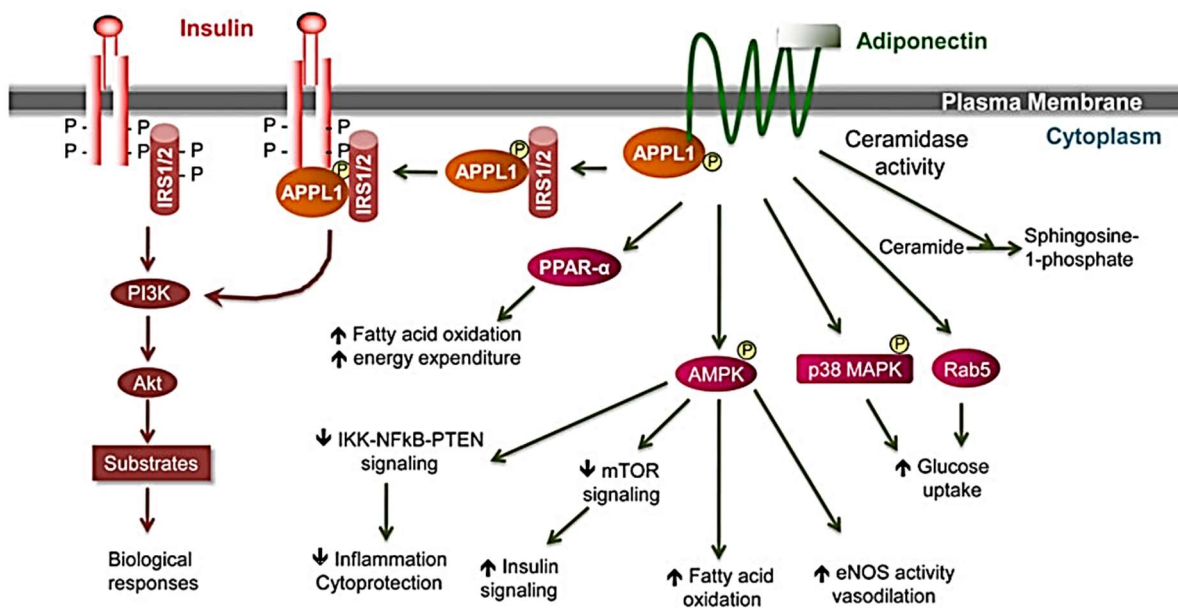


Figure 44 : Représentation schématique de la voie de transduction du signal de l'adiponectine associée à celle de l'insuline.

AMPK : adenosine monophosphate activated protein kinase ; **APPL1** : adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1 ; **eNOS** : endothelial nitric oxide synthase ; **IKK** : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase ; **IRS1/2** : insulin receptor substrate 1/2 ; **MAPK** : mitogen-activated protein kinases ; **mTOR** : mechanistic target of rapamycin ; **NF κ B** : nuclear factor kappa-B ; **PI3K** : phosphoinositide 3-kinase ; **PPAR- α** : peroxisome proliferator activated receptor alpha ; **PTEN** : phosphatase and TENsin homolog
(Ruan and Dong 2016)

L'adiponectine possède des propriétés anti-obésité et anti-diabétique par sa capacité à réduire l'inflammation et la résistance à l'insuline associée, via l'interaction entre la

protéine APPL1 et les récepteurs AdipoR1/2 par divers mécanismes d'action. En effet, l'adiponectine diminue les taux de triglycérides tissulaires en augmentant l'oxydation des acides gras libres par l'activation de PPAR α . Elle active l'AMPK qui va à son tour réduire l'inflammation en diminuant le signal de la voie IKK-NF κ B-PTEN, et stimuler l'oxydation des acides gras, la sensibilité de la voie de l'insuline, la vasodilatation en augmentant l'activité d'eNOS et la captation du glucose via la translocation de GLUT4 vers la membrane (**Figure 44**) (Ruan and Dong 2016). Par ailleurs, l'adiponectine possède également des propriétés anti-athérogènes car durant les premières étapes de l'athérosclérose, elle inhibe l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales de l'aorte et l'expression des molécules d'adhésion. L'adiponectine affecte également la formation de cellules spumeuses en bloquant la captation des LDL oxydées par les macrophages au niveau de la plaque d'athérome (Ouchi, Kihara et al., 2003).

4.3. Le processus de transmigration des monocytes à travers la barrière endothéliale

En situation physiologique, le SNC est dépourvu de cellules immunitaires au niveau du parenchyme. En conditions physiopathologiques et inflammatoires, les agents infectieux ou les tissus lésés vont stimuler le relargage des « pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs) ou de « damage-associated molecular patterns » (DAMPs). Une fois fixés sur leurs récepteurs spécifiques appelés PRR pour « Pattern Recognition Receptor », cela va stimuler la réponse immunitaire innée et induire la libération de cytokines pro-inflammatoires (Vestweber 2015). L'endothélium vasculaire étant fonctionnellement et structurellement modifié, cela va favoriser l'entrée de cellules immunitaires et de neutrophiles au niveau cérébral par voie paracellulaire (Kaya and Ahishali 2020). Le liquide céphalo-rachidien contient près de 3000 leucocytes par millilitre où 80% de ces leucocytes sont des cellules T. Ceux-ci vont s'extravaser à travers les veinules postcapillaires vers les espaces périvasculaires et vont pénétrer dans le tissu cérébral en plusieurs étapes (Zlokovic 2008) (**Figure 45**).

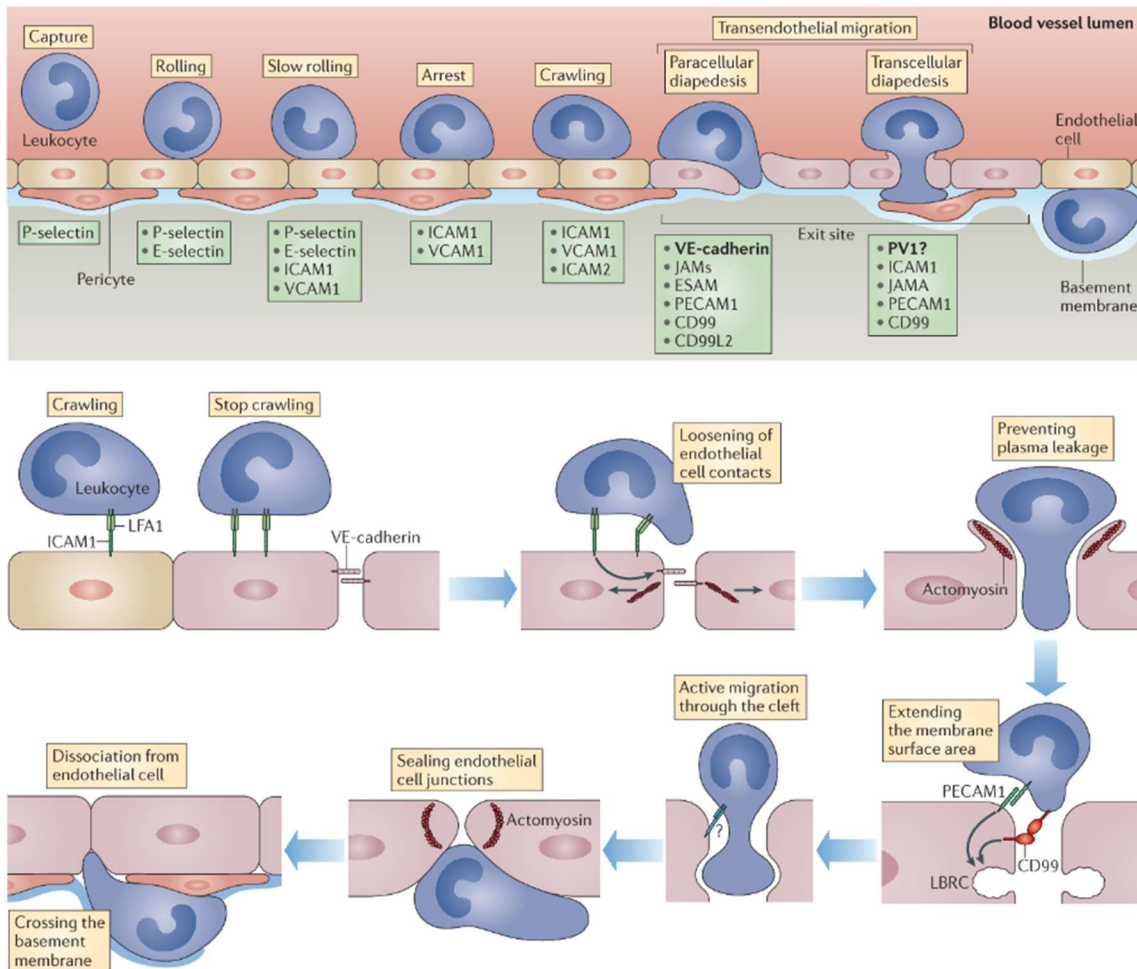


Figure 45 : Étapes de l'adhésion monocytaire et de la transmigration endothéliale.

(Vestweber 2015)

Le processus débute par une étape d'adhérence, de roulement, d'adhésion ferme et enfin d'extravasation ou diapédèse à travers la barrière endothéliale via des forces de cisaillement exercées par le flux sanguin (Cerutti and Ridley 2017). Pour la première étape de fixation initiale, une série de molécules d'adhésion est impliquée au niveau des cellules endothéliales et des plaquettes, à savoir les sélectines, telles que la sélectine endothéliale (E-sélectine) ou la sélectine plaquettaire (P-sélectine). Elles vont interagir avec des L-sélectines ou des ligands « P-selectin glycoprotein ligand-1 » (PSGL-1) exprimés par les leucocytes. Ces molécules d'adhérence intercellulaire (CAM) sont généralement produites à la suite de stimuli pro-inflammatoires et notamment des chimiokines. Puis, vient l'étape de roulement où la vitesse de circulation des leucocytes est ralentie, leur permettant de s'adhérer plus facilement via l'interaction entre des

intégrines leucocytaire telles que la « lymphocyte function-associated antigen 1 » (LFA-1) et la « very late antigen-4 » (VLA-4) activées par les chimiokines MCP-1 et IL-8, et les molécules d'adhésion intercellulaire endothéliale (ICAM-1) et vasculaire (VCAM-1). VLA-4 induit également la production de ROS via les NOXs qui vont à leur tour activer Pyk2.

ICAM-1 joue un rôle crucial dans l'infiltration leucocytaire au niveau du tissu cérébral durant l'inflammation, dans les interactions médiées par l'adhésion des intégrines avec la surface endothéliale, dans la réorganisation cytosquelettique, la phosphorylation des protéines et la régulation de gènes. Cette CAM active également la protéine RhoA, qui va induire le raidissement de l'endothélium et favoriser la transmigration endothéliale (TEM) des leucocytes (Huber, Egleton et al., 2001, Cerutti and Ridley 2017). La dernière étape d'extravasation encore appelée diapédèse relative à la TEM implique PECAM-1, JAM-1 et le cluster de différenciation CD99. Une fois que les leucocytes sont ancrés à l'endothélium, soit la VE-cadhérine est internalisée via des vésicules de clathrine soit elle est phosphorylée au niveau de sa tyrosine 658 et 731 par la kinase Pyk2. Les protéines membranaires comme PECAM-1 vont être dirigées vers un compartiment de recyclage de bordure latérale (LBRC) au niveau du site de TEM. De plus, d'un côté l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire déclenche la contractilité de l'actomyosine par la « myosine light chain kinase » (MLCK) et de l'autre, RhoA intervient dans le remodelage de la F-actine pour former une structure annulaire autour des leucocytes transmigant à travers la barrière endothéliale (Cerutti and Ridley 2017). Les interactions chimiokine-récepteur guident l'extravasation des leucocytes. Ces interactions interviennent dans les changements cytosquelettiques des leucocytes, entraînant un changement de leur forme pour permettre leur transmigration. Les cellules transmigrantes se regroupent dans l'espace périvasculaire avant d'être transférées dans l'espace extracellulaire cérébral via l'action des MMPs (Zlokovic 2008).

4.4. L'impact du stress oxydatif et de l'inflammation associés à l'hyperglycémie sur la fonction endothéliale et la BHE

L'hyperglycémie exerce un impact délétère sur la morphologie et la fonctionnalité des cellules endothéliales de la BHE en modulant les protéines impliquées dans le maintien

et l'intégrité de la BHE mais également les mécanismes moléculaires essentiels pour le bon fonctionnement de l'endothélium.

En effet, lorsque les cellules endothéliales sont exposées à une hyperglycémie chronique, qui induit une surproduction de ROS (Giacco and Brownlee 2010) et entraîne des dommages de l'ADN, des protéines, des lipides. Des niveaux élevés de ROS induisent une dérégulation de la production des agents vasoactifs comme NO et ET-1 en engendrant également le découplage d'eNOS, ce qui va induire une production accrue de radicaux ONOO⁻ (Wolin, Gupte, 2010, Kassab and Piwowar 2012). Cette surproduction de radicaux libres est associée à plusieurs mécanismes moléculaires dont l'altération de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (Rolo and Palmeira 2006), la formation de produits avancés de glycation et l'activation d'enzymes productrices de ROS comme les NOXs (Guzik, Mussa et al., 2002, Takayama, Wada et al., 2004).

Dans des conditions physiologiques basales, le facteur de transcription Nrf2 est ubiquitinylé par Keap1 et dégradé dans le cytosol. En condition d'hyperglycémie, les ROS et l'Ang-II activent la voie NFκB conduisant à la transcription de gènes fibrotiques et inflammatoires tels que TGF-β, MCP-1 et TNF-α qui vont entraîner des complications diabétiques (**Figure 46**). Par ailleurs, le stress oxydatif médié par l'hyperglycémie, stabilise Nrf2 en libérant la liaison de Keap1, permettant à Nrf2 de se déplacer vers le noyau où il active l'expression des gènes ARE-sensibles, tels que HO-1, SOD et la catalase. Ces gènes antioxydants et cytoprotecteurs réduisent les niveaux de ROS, conduisant à une atténuation des complications diabétiques (Tan and de Haan 2014, Liu, Zhang et al., 2015).

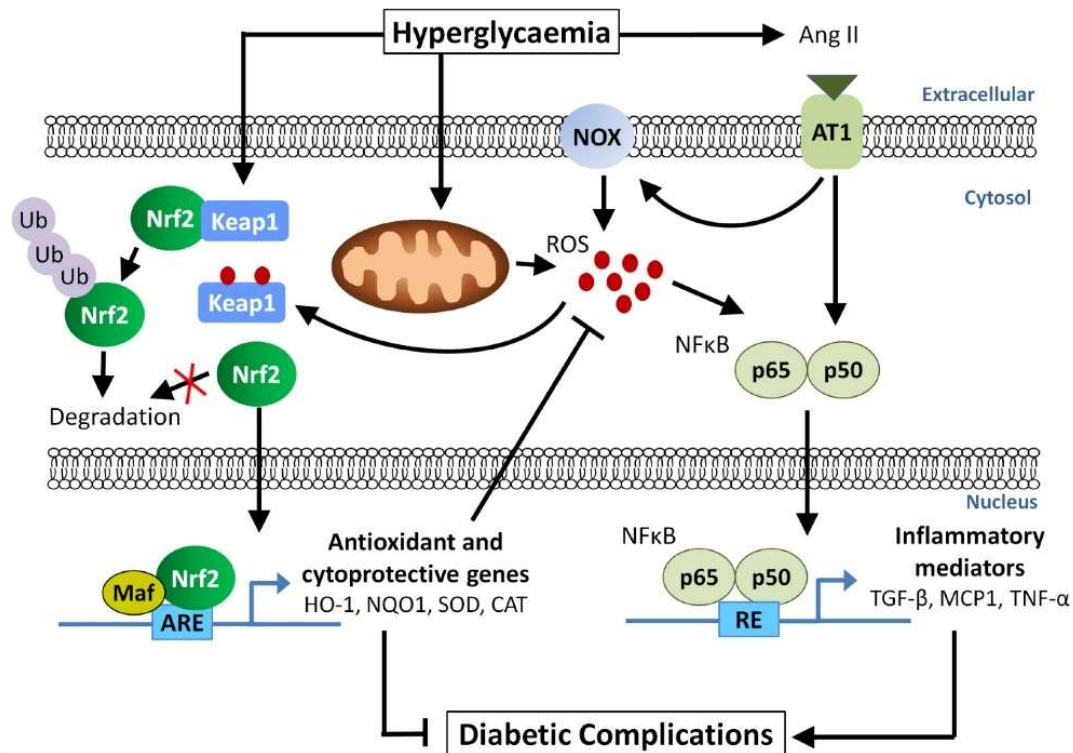


Figure 46 : Mécanisme d'action de Nrf2 en condition hyperglycémique.

(Tan and de Haan 2014)

Le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie, est capable d'induire une réponse pro-inflammatoire via l'activation de NFκB, DAG/PKC, PI3K qui va engendrer la production accrue de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales comme la E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1 (Blankenberg, Barboux et al., 2003). Ces molécules d'adhésion favorisent le recrutement, l'adhésion, la transmigration puis l'infiltration des monocytes à travers la barrière endothéliale (Chi and Melendez 2007). De manière intéressante, Gray et al., ont montré que la délétion de Nox1 chez des souris diabétiques a eu un effet anti-athérosclérotique corrélé à une baisse de la formation de ROS, de l'expression des chimiokines, de l'adhésion vasculaire des leucocytes, de l'infiltration macrophagique et de l'expression de marqueurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques (Gray, Marco et al., 2013).

Par ailleurs, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires entraîne également une réduction de l'expression et de l'activité des transporteurs d'efflux P-gp et BCRP, impliqués dans le maintien de l'homéostasie cérébrale au niveau de la BHE, ce qui va favoriser l'accumulation de substances toxiques ou de pathogènes dans le cerveau (Birk, Jürgen et al., 2010).

Les radicaux libres vont aussi altérer la production des jonctions serrées. Liu et al., ont montré qu'une forte concentration en glucose (25 mM) entraîne une diminution de l'expression des gènes codant pour les protéines des jonctions serrées (occludine, claudine-5, ZO-1) chez des cellules endothéliales microvasculaires humaines. De plus, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, ils ont démontré que l'activation de l'AMPK va atténuer la production de ROS via les NOXs en condition d'hyperglycémie (Liu, Wu et al., 2012). L'AMPK réduit également en condition d'hyperglycémie, la production de ROS par la voie mitochondriale et favorise la biogénèse mitochondriale sur le même type cellulaire (Kukidome, Nishikawa et al., 2006). Concernant les MMPs, en plus de pouvoir dégrader les jonctions serrées (Liu, Jin et al., 2012), elles favorisent l'apparition de fibrose au niveau des îlots de Langerhans du pancréas et contribuent au développement de l'insulinorésistance chez des rats femelles rendues diabétiques par un régime riche en graisses (Zhou, Madjidi et al., 2005).

Face aux désordres métaboliques et moléculaires qu'induit l'hyperglycémie, via le développement d'un stress oxydatif et d'un état pro-inflammatoire, il est primordial de développer des stratégies adaptées pour lutter contre le diabète et ses complications.

5. Les stratégies de lutte contre le diabète et ses complications

L'hyperglycémie chronique associée au diabète engendre sur le long terme des complications vasculaires importantes. Par conséquent, l'identification d'approches thérapeutiques et de nouvelles cibles médicamenteuses est indispensable pour lutter contre ces dérégulations.

5.1. Approche nutritionnelle et sportive

Pour contrecarrer l'augmentation croissante de la prévalence du diabète et de l'obésité souvent associée, des changements de mode de vie et d'alimentation tels que la pratique d'une activité physique adaptée et un rééquilibrage alimentaire s'avèrent être la première stratégie mise en place. En effet, en 2001 a été lancé un programme national nutrition santé (PNNS) en France visant à sensibiliser la population pour lutter contre l'obésité et le diabète à travers la pratique d'un sport et à une alimentation riche en fruits et légumes (PNNS 2001). Ce plan de santé publique a pour but d'améliorer l'état de santé de la population en la sensibilisant notamment avec des

slogans publicitaires comme « manger /bouger », « manger 5 fruits et légumes par jour » et « 30 minutes d'activité physique par jour ». Les objectifs de ce PNNS définis par le Haut Conseil de la Santé Publique s'organisent autour de quatre axes :

- Réduire l'obésité et le surpoids dans la population.
- Augmenter l'activité physique et diminuer la sédentarité à tous les âges.
- Améliorer les pratiques alimentaires et les apports nutritionnels, notamment chez les populations à risque.
- Réduire la prévalence des pathologies nutritionnelles.

Ce programme apporte des conseils nutritionnels d'ordre quantitatif (apport calorique et énergétique recommandé) et qualitatif (consommation de fruits, légumes, fibres, protéines, acides gras polyinsaturés). Il sensibilise également sur la pratique d'exercices physiques d'intensité modérée d'au moins 30 minutes au minimum cinq jours par semaine (Wirth, Vogel et al., 1987, PNNS 2001).

Une étude parue récemment a démontré qu'il y avait une augmentation de 1,7 fois de la graisse totale, de la graisse viscérale et de la graisse sous-cutanée chez des rats juvéniles âgés de 3 semaines nourris pendant 9 semaines avec un régime riche en graisses (« High Fat Diet », HFD) comparé à ceux nourris avec un régime alimentaire normal (« Normal Diet », ND). A l'inverse, le pourcentage de masse musculaire par rapport au poids corporel était significativement plus faible dans le groupe HFD par rapport au groupe ND. De plus, une élévation des taux plasmatiques d'insuline et une réduction de la sensibilité à l'insuline n'ont été observées que dans le groupe HFD. De ce fait, les résultats suggèrent que le régime HFD en période de croissance induit une résistance à l'insuline et une obésité (Maejima, Yokota et al., 2020).

5.2. Approche médicamenteuse

Lorsque la prise en charge du DT2 par une approche nutritionnelle et sportive est inefficace, la glycémie est contrôlée par la prescription d'antidiabétiques pour la plupart oraux. On distingue plusieurs types d'antidiabétiques oraux à savoir les biguanides comme la metformine, les sulfamides hypoglycémiantes ou sulfonylurées, les glinides, les gliptines qui sont des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4) et des analogues de la GLP-1, des inhibiteurs de l' α -glucosidase et enfin des inhibiteurs de la SGLT2. Si les antidiabétiques oraux ne sont pas assez ou plus efficaces, le patient

recevra quotidiennement des injections d'insuline. Par ailleurs, sur le long terme, le passage à l'insuline s'avère être inévitable s'il n'y a pas de changement de mode de vie associé à la prise médicaments.

5.2.1. Les médicaments améliorant la sensibilité à l'insuline

➤ Les biguanides

La metformine est un biguanide qui est le plus souvent indiqué dans le traitement du DT2. Il s'agit d'une molécule capable de réduire la glycémie basale et postprandiale via une diminution de la production hépatique du glucose grâce au blocage de la néoglucogenèse et de la glycolyse par l'activation de l'AMPK (Kim, Park et al., 2008). La metformine stimule également l'absorption du glucose par les muscles squelettiques et l'intestin en augmentant la sensibilité de l'insuline aux récepteurs GLUT et la sécrétion de GLP-1, respectivement. Enfin, celle-ci retarde l'absorption intestinale du glucose (Kim, Park, 2008, Foretz, Guigas et al., 2014). Les principaux effets secondaires en termes de fréquence sont les troubles gastro-intestinaux et les perturbations de l'appareil gustatif.

5.2.2. Les médicaments stimulant la production d'insuline

➤ Les sulfamides

Les sulfamides ayant un effet hypoglycémiant, sont utilisés en combinaison avec la metformine, lorsqu'un diabète n'est pas équilibré par la prise d'un seul médicament. Ils agissent en se fixant sur la protéine « Sulfonylurea receptor 1 » (SUR1), responsable de la régulation des canaux potassiques sensibles à l'ATP retrouvés sur la membrane plasmique des cellules β pancréatiques. En bloquant l'ouverture de ces canaux, ils induisent la dépolarisation membranaire et une entrée massive des ions Ca^{2+} , provoquant une modification du cytosquelette et une stimulation de la translocation des granules sécrétoires contenant de l'insuline vers la membrane plasmique et la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques (MacDonald and Wheeler 2003, Thulé and Umpierrez 2014).

Concernant les effets secondaires de ces médicaments, ils entraînent une prise de poids mais surtout un risque important d'hypoglycémie chez des personnes âgées de plus de 65 ans souffrant d'insuffisance rénale.

➤ Les glinides

Les glinides exercent une activité dite insulinosécrétagogue, similaire à celle des sulfamides en se fixant sur la protéine SUR1 et en induisant la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. Cependant, leur mode d'action est beaucoup plus court que celui des sulfamides en lien avec leur temps de demi-vie plus court (Vetere, Choudhary et al., 2014).

➤ Les incrétines

Les incrétines sont des hormones de la muqueuse intestinale libérées dans la circulation sanguine et impliquées dans la stimulation et la sécrétion d'insuline après le repas. Parmi cette famille, nous retrouvons la GLP-1 ainsi que le peptide insulino-trope glucose-dépendant (GIP) qui ont la capacité de stimuler et d'améliorer la sécrétion d'insuline quand la glycémie est élevée, d'inhiber la sécrétion de glucagon et de réduire l'absorption intestinale du glucose (Stoffers, Kieffer, 2000). Ce dernier s'accompagne d'un ralentissement de l'étape de vidange de l'estomac et d'un jeu sur les récepteurs cérébraux impliqués dans les prises alimentaires. Chez les patients diabétiques, la sécrétion de GLP-1 par l'intestin est significativement réduite même si ses capacités sont conservées. De plus, deux inhibiteurs mimant les effets des incrétines ont été développés, à savoir les inhibiteurs de la DPP-4 qui ralentissent la dégradation de la GLP-1 causée par la dipeptidylpeptidase (DDP) et des analogues du GLP-1 qui exerceraient des effets similaires mais ne seraient pas hydrolysables par la DPP (Lamont and Drucker 2008, Lovshin and Drucker 2009). Par ailleurs, l'Exénatide et le Liraglutide sont des analogues de GLP-1 administrés par voie injectable et les gliptines (Vildagliptine, sitagliptine, saxagliptine et linagliptine) sont des inhibiteurs de la DPP-4 pris par voie orale. De manière importante, ces deux antidiabétiques oraux sont actuellement très surveillés car ils pourraient potentiellement être impliqués dans le développement de pancréatites et de cancers du pancréas (Tahrani, Barnett et al., 2016).

5.2.3. Les médicaments réduisant l'absorption des sucres

➤ Les inhibiteurs des α -glucosidases

Les inhibiteurs des α -glucosidases sont des inhibiteurs compétitifs et réversibles de l' α -amylase pancréatique et des hydrolases α -glucosidases intestinales. Ils empêchent le métabolisme des disaccharides et des oligosaccharides en monosaccharides via un ralentissement de l'absorption intestinale des glucides. Cet événement permet de diminuer les pics hyperglycémiques post-prandiaux (Sugihara, Nagao et al., 2014). Ces inhibiteurs augmentent la sécrétion postprandiale de GLP-1 et réduisent la sécrétion de GIP. L'acarbose et le miglitol qui font partie de la classe des inhibiteurs de l' α -glucosidase, sont des composés anti-hyperglycémiques oraux introduits dans les années 1990 (Tahrani, Barnett, 2016).

5.2.4. Les médicaments favorisant l'élimination des sucres

➤ SGLT-2

Les inhibiteurs de la SGLT2 sont des inhibiteurs de la réabsorption tubulaire du glucose. Ces inhibiteurs sont des gliflozines et regroupent quatre antidiabétiques oraux : le dapagliflozine, le canagliflozine, l'empagliflozine et l'ertugliflozine (Lupsa and Inzucchi 2018). Ils ont pour rôle de bloquer le co-transporteur de réabsorption du glucose et du Na^+ au niveau du tube contourné proximal rénal via SGLT2. De plus, ils vont avoir la capacité de réduire la glycémie à jeun et postprandiale grâce à la baisse de la réabsorption rénale et à l'augmentation de l'excrétion du glucose dans l'urine (Chang, Singh et al., 2018). La capacité de l'inhibition du SGLT2 à réduire la glycémie est indépendante de l'action de l'insuline et n'est donc pas affectée par les taux d'insuline ou la résistance à l'insuline (Tahrani, Barnett, 2016).

➤ L'insuline

Dans le cas où les antidiabétiques oraux ne réguleraient pas correctement la glycémie d'un patient diabétique, l'injection d'insuline s'avère être le seul moyen efficace. L'insuline est injectée progressivement jusqu'à l'obtention d'une glycémie à jeun

proche de 1,10 g/L. Contrairement aux autres médicaments hypoglycémisants, il n'y a pas de dose maximale d'insuline au-delà de laquelle un effet thérapeutique ne se produira pas. Bien que le traitement initial vise à augmenter l'apport basal d'insuline, généralement avec des insulines à action intermédiaire ou longue, les patients peuvent également nécessiter un traitement prandial avec des insulines à action courte ou rapide (Wilcox 2005). De manière intéressante, il s'avère qu'en plus d'être la seule hormone hypoglycémisante endogène de l'organisme, l'insuline est capable d'induire des effets protecteurs importants au sein de différents tissus. En effet, des études ont démontré les propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes de l'insuline sur l'endothélium vasculaire en condition physiopathologique, comme dans un contexte hyperglycémique (Aljada, Saadeh et al., 2000, Harrison, McNally et al., 2006, Arcambal, Tailé et al., 2019).

6. Approche thérapeutique basée sur l'utilisation des molécules naturelles

6.1. Les polyphénols

Les polyphénols végétaux sont définis comme étant des molécules bioactives ayant un potentiel nutritionnel et pharmacologique. Celles-ci sont retrouvées dans les fruits, les légumes, les plantes et les boissons dérivées en proportions variables. Les composés phénoliques sont retrouvés dans les différentes parties végétales à savoir les fleurs, les feuilles, les fruits, les tiges et les écorces. Ces molécules sont impliquées dans le système de défense des plantes contre les rayons ultraviolets et les agressions pathogènes mais également dans le développement et la croissance de la plante (Kähkönen, Hopia et al., 1999). De plus, les polyphénols sont responsables de la couleur, de l'odeur et du goût des plantes tels que l'amertume et l'astringence (Pandey and Rizvi 2009). Nous consommons en moyenne 1 g/jour de polyphénols, 90 mg/jour de vitamine C, 12 mg/jour de vitamine E et 5 mg/jour de caroténoïdes et vitamine A. De ce fait, les polyphénols constituent les antioxydants les plus abondants de notre alimentation (Scalbert and Williamson 2000). Ces composés sont caractérisés par leur structure chimique et notamment par leurs groupements phénoliques capables de capter un électron libre tout en restant stables ; ce qui leur confère des propriétés antioxydantes.

6.1.1. *La structure et les différentes classes chimiques des polyphénols*

Les polyphénols correspondent à des molécules composées d'un ou de plusieurs noyaux aromatiques avec au moins un groupement hydroxyle (OH). Par ailleurs, les groupements OH sont responsables de leur propriété antioxydante. En effet, les polyphénols sont capables de capter les radicaux libres et de détoxifier les ROS et les RNS produites au sein de l'organisme grâce à leur structure phénolique qui leur confère des propriétés réductrices puissantes. L'équipe de Rice-Evans et al. a démontré qu'il y existe une relation entre la structure des polyphénols et leur fonction en tant qu'antioxydants. En effet, les polyphénols qui portent un noyau aromatique avec 2 groupements OH (groupement catéchol) exerceraient des effets plus puissants que ceux ayant un seul groupement OH. De ce fait, grâce à son groupement catéchol et sa double liaison conjuguée à un groupement 4-oxo, la quercétine possède une forte capacité antioxydante (Rice-Evans, Miller et al., 1996).

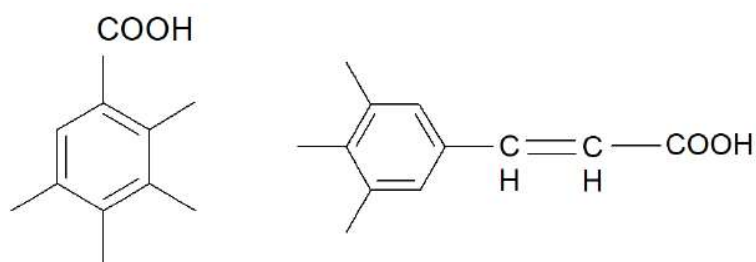
Actuellement, près de 8000 polyphénols ont été identifiés dans le règne végétal. Les polyphénols identifiés ont été classés selon la structure de leur squelette carboné, dans des grandes familles chimiques, à savoir (i) la famille des acides phénoliques comprenant les acides hydroxybenzoïques (dérivés de l'acide benzoïque) et hydroxycinnamiques (dérivés de l'acide cinnamique) ; (ii) la famille des flavonoïdes regroupant les flavones, les isoflavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols, les chalcones/dihydrochalcones, les anthocyanes, et les pro-anthocyanidines. On distingue également (iii) la famille des stilbènes, et (iv) la famille des lignanes (Manach, Scalbert et al., 2004).

Selon Scalbert and Williamson, la consommation journalière de polyphénols est estimée à environ 1 g comprenant 460 mg de proanthocyanidines, 200 mg de catéchines, 180-215 mg d'anthocyanes et 115 mg de flavones et flavonols (Scalbert and Williamson 2000).

➤ **Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques ne possèdent qu'un groupement phénolique et se différencient particulièrement par leur structure chimique associée à une hydroxylation ou une méthylation en différentes positions de leur noyau aromatique. On distingue deux

classes d'acides phénoliques, à savoir les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (**Figure 47**).



Acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique

Figure 47 : Structure des acides phénoliques.

Les **acides hydroxybenzoïques** sont principalement retrouvés sous forme conjuguée, à savoir glycosylée ou estérifiée mais sont également présents sous forme libre, en petites quantités dans les végétaux comestibles. Parmi ces acides, nous retrouvons les acides 4-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, syringique ou encore gallique. Les acides hydroxybenzoïques sont détectés dans les oignons et l'acide gallique en grande quantité (4,5 g/kg) dans les feuilles de thé (Manach, Scalbert, 2004). Par conséquent, la plupart des acides phénoliques présents dans notre alimentation sont les **acides hydroxycinnamiques**, et majoritairement en plus grande quantité dans les parties extérieures des fruits mûrs. Nous y retrouvons principalement l'acide caféique, l'acide chlorogénique ainsi que l'acide férulique. L'acide caféique représente sous sa forme libre ou estérifiée près de 75 à 100% des acides hydroxycinnamiques totaux de la plupart des fruits (D'Archivio, Filesi et al., 2007). L'acide chlorogénique ou « acide 5-caféylquinique » est un ester de l'acide caféique et de l'acide quinique, retrouvé abondamment dans les fruits, les légumes et le café. En effet, on retrouve entre 50 et 150 mg d'acide chlorogénique dans 200 mL de café (Clifford 1999, Gonthier, Verny et al., 2003). L'acide férulique est un dérivé méthylé de l'acide caféique et sert de précurseur pour les molécules aromatiques retrouvées au niveau des parois des cellules végétales. Il est retrouvé de manière conséquente dans les graines de blé avec 0,8 – 2 g/kg de matière sèche (Sosulski, Krygier et al., 1982).

Les **curcuminoïdes** sont formés à partir de deux molécules d'acide férulique. On distingue trois principaux curcuminoïdes qui diffèrent par l'emplacement et le nombre de leurs substituants, à savoir la curcumine, la déméthoxycurcumine et la bisdéméthoxycurcumine (**Figure 48**). Les curcuminoïdes présents dans le rhizome du *Curcuma longa* produit à La Réunion ont montré des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et insulino-sensibilisantes chez des adipocytes exposés à un stress oxydatif mimé par un traitement au H₂O₂ (Septembre-Malaterre, Le Sage et al., 2016).

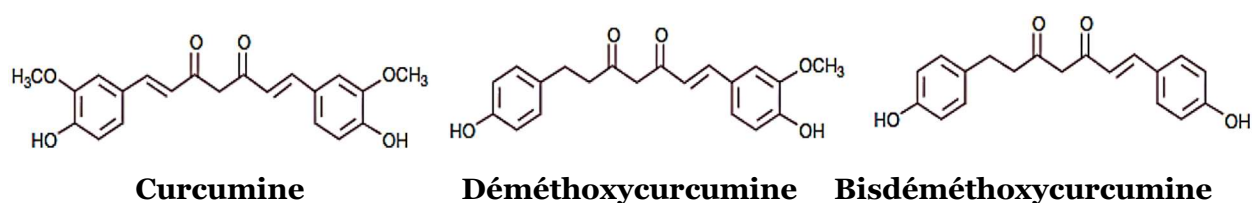


Figure 48 : Structure des curcuminoïdes.

➤ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants de l'alimentation humaine avec plus de 4000 composés identifiés (D'Archivio, Filesi, 2007). Ils sont présents dans les fruits, les légumes, les boissons dérivées de plantes mais également dans l'ensemble des parties végétales des plantes médicinales et aromatiques (Verhoeven, Bovy et al., 2002). Les flavonoïdes possèdent tous une structure de base commune composée de deux noyaux aromatiques (A et B) reliés entre eux par trois atomes de carbone formant un hétérocycle oxygéné France (**Figure 49**) (Wei, Wang et al., 2011).

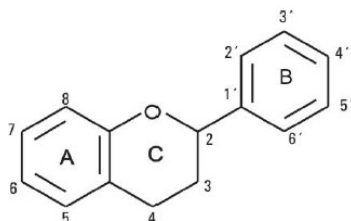


Figure 49 : Structure basique des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont catégorisés en plusieurs sous-classes qui diffèrent par le nombre et la disposition des groupes OH leur conférant une activité antioxydante variée, ainsi

que par les degrés d'alkylation et de glycosylation, à savoir les flavones, les isoflavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols et les anthocyanes (**Figure 50**).

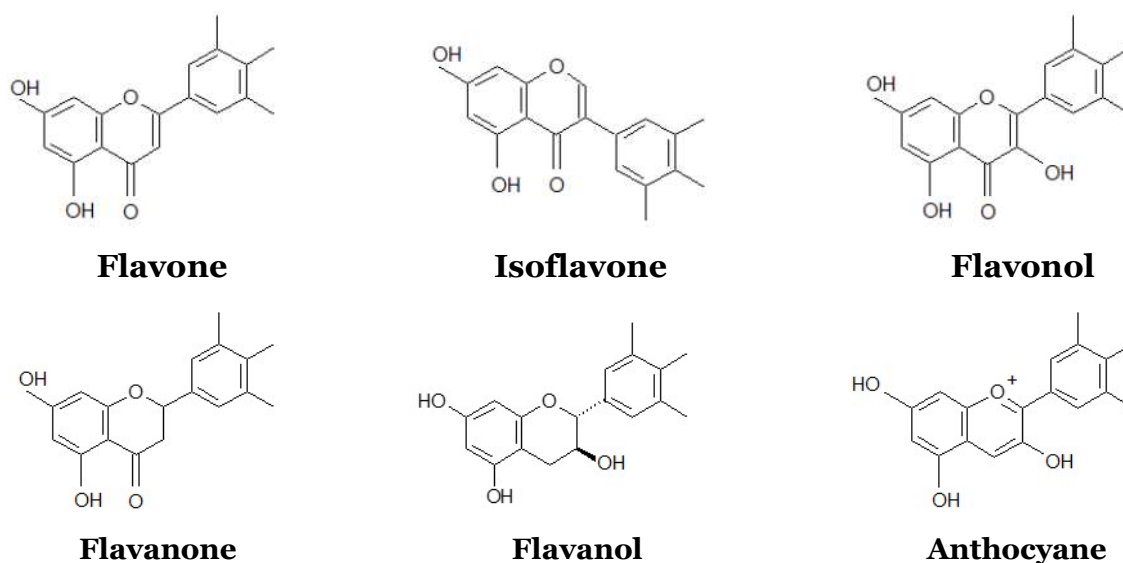


Figure 50 : Structure des flavonoïdes.

Les **flavones** se caractérisent par la présence d'un groupement 4-oxo et d'une double liaison en positions 2-3. Les flavones se composent principalement de glycosides de lutéoline et d'apigénine. Ils sont retrouvés essentiellement dans le persil, le céleri et le poivron rouge (Manach, Scalbert, 2004).

Les **isoflavones** présentent un noyau benzénique B en position 3. Ces composés phénoliques sont également appelés phytoestrogènes, car la présence de groupements OH en C7 et C4' leur donne une structure similaire au 17- β -œstradiol leur permettant de se fixer sur les récepteurs aux œstrogènes (Cassidy, Hanley et al., 2000). On peut les retrouver dans les légumineuses exclusivement sous forme de génistéine et de daidzéine, et particulièrement dans le soja et ses produits dérivés (Manach, Scalbert, 2004).

Les **flavonols** se composent d'un groupement OH en C3 et d'une double liaison en position 2-3 comme les flavones. Ces composés sont souvent présents sous forme glycosylée, avec addition d'un sucre ou d'un rhamnose. Dans cette sous-classe de flavonoïdes, nous retrouvons des composés largement étudiés dans la littérature, à savoir la quercétine, l'isorhamnétine, la myricétine et le kaempférol. Les flavonols sont les polyphénols les plus abondants dans les fruits et les légumes, donc sont les plus

consommés. On note par exemple une teneur en quercétine de 1,2 g/kg dans les oignons, de 30-160 mg/kg de myricétine dans les mytilles et de 211-470 mg/kg de kaempférol dans le chou frisé. Le vin et le thé contiennent également jusqu'à 45 mg/L de flavonols. De plus, il est important de noter que la concentration des flavonols varie en fonction de l'exposition à la lumière du soleil qui stimule leur synthèse. En effet, il peut y avoir des différences de concentration dans les fruits d'une même arbre et notamment dans les parties d'un même fruit (Manach, Scalbert, 2004).

Les **flavanones** se différencient par la saturation du noyau benzénique C. Les composés les plus fréquents sont présents sous forme glycosylée avec le rutinose (6-O- α -L-rhamnosyl-D-glucose) ou le néohespéridose (2-O- α -L-rhamnosyl-D-glucose) lié par un disaccharide en position 7, dans l'alimentation. Pour exemple de source alimentaire, le jus d'orange contient 200-600 mg/L d'hespéridine et 15-86 mg/L de naringinine appelée aussi narirutine (Tomás-Barberán and Clifford 2000).

Les **flavanols** ou « flavan-3-ols » sont les flavonoïdes majeurs de l'alimentation humaine sous forme non-glycosylée. Ils ne possèdent pas de groupement 4-oxo, de saturation de leur cycle C et de groupement OH en position 3. Les flavanols sont présents sous forme de monomères sous le nom de catéchines et de polymères en tant que proanthocyanidines. Dans le règne végétal, les principaux monomères sont la catéchine, l'épicatéchine, la gallocatéchine et l'épigallocatéchine ainsi que leurs dérivés conjugués à l'acide gallique comme l'épigallocatéchine gallate (EGCG). Les catéchines sont abondantes dans le chocolat jusqu'à 600 mg/L et dans le thé vert avec 800 mg/L (D'Archivio, Filesi, 2007, Hara 2011). Les proanthocyanidines ou « tanins condensés » sont formés par polymérisation des monomères de flavanols via l'action de la polyphénoloxydase ou de réaction d'auto-oxydation (Mayer and Harel 1979). Ces molécules complexes sont retrouvées en abondance dans les raisins et le cacao et sont responsables du goût astringent des fruits qui ne sont pas arrivés à maturité (raisins, pêches, kakis, pommes), les boissons (thé, cidre, bière, vin) et du chocolat (Baba, Furuta et al., 1981).

Les **anthocyanes** se différencient entre elles par le nombre et la position des groupements OH et CH₃, le nombre et la nature du sucre à savoir s'il s'agit d'un glucose, galactose, rhamnose ou arabinose, ainsi que sur leur état d'estérification. Les composés les plus fréquents de cette classe sont les mono- et diglycosides de cyanidine ainsi que la delphinidine. Les sources alimentaires majeures d'anthocyanes sont les céréales, les légumes, les tubercules, les fruits rouges et les produits dérivés comme le vin rouge.

Ces molécules sont responsables de la pigmentation des fruits et des fleurs. Par ailleurs, plus un produit est de couleur intense, plus il est riche en anthocyanes. Pour exemple, on retrouve entre 200 et 350 mg d'anthocyanes par litre de vin (Clifford 1999).

➤ Les stilbènes

Les stilbènes se composent de deux noyaux aromatiques liés par un groupe éthylénique (**Figure 51**). Ces polyphénols sont retrouvés en faible quantité dans l'alimentation (Manach, Scalbert, 2004). Parmi la famille des stilbènes, nous retrouvons le resvératrol, qui est un composé largement utilisé pour ses effets protecteurs. En effet, le resvératrol a montré sa capacité à réduire une lésion ischémique cérébrale et à améliorer la fonction neurologique après un AVC chez des rats (Yu, Wang et al., 2016). Il est présent dans les noix et les dattes mais également dans les baies, les raisins ou encore dans le vin en très petite quantité avec 0,3-7 mg aglycones/L et 15 mg glycosides/L (Manach, Scalbert, 2004). De plus, un dérivé du resvératrol, le picéatannol, a été retrouvé en grande quantité dans le fruit de la passion qui est un fruit tropical riche en polyphénols (Septembre-Malaterre, Stanislas et al., 2016).

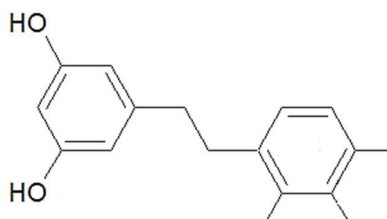


Figure 51 : Structure des stilbènes.

➤ Les lignanes

Les lignanes se composent de deux unités phénylpropanes formées par dimérisation oxydative (**Figure 52**). Parmi cette famille, on retrouve le sécoisolaricirésol qui est une lignane présente dans les graines de lin en quantité très importante, à savoir 3,7 g/kg de masse sèche. Le matairésinol y est également retrouvé mais cette fois-ci en faible quantité (Manach, Scalbert, 2004). Les lignanes sont métabolisées en deux métabolites circulants par le microbiote intestinal que sont l'entérodiol et l'entérolactone, qui sont considérés comme des phytoestrogènes (Heinonen, Nurmi et al., 2001).

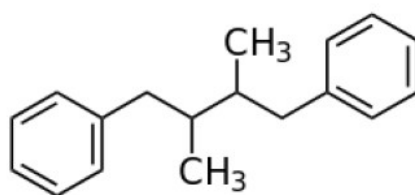


Figure 52 : Structure des lignanes.

6.1.2. La biodisponibilité des polyphénols

Les propriétés biologiques des polyphénols issus de l'alimentation sont fortement dépendantes de leur biodisponibilité. La biodisponibilité des polyphénols ou de leurs métabolites est définie comme leur capacité à atteindre les tissus cibles où sera exercé un effet biologique. Il est à noter que les polyphénols retrouvés dans l'alimentation ne sont pas nécessairement ceux qui conduisent aux métabolites les plus actifs dans les tissus cibles. En effet, la structure chimique, la concentration, la nature des métabolites, la vitesse et le degré de d'absorption sont pris en considération. De ce fait, les propriétés biologiques des polyphénols diffèrent fortement d'un polyphénol à l'autre. Le processus de biodisponibilité d'un polyphénol débute lorsque les polyphénols sont libérés de la matrice alimentaire, absorbés au niveau de la barrière intestinale, puis transportés jusqu'au tissu cible. Tout d'abord, les polyphénols sont déconjugués au niveau du tractus gastro-intestinal et du côlon. Après cela, les composés formés issus du métabolisme microbien sont soumis aux phases I et II du métabolisme hépatique avant d'être véhiculés par le sang vers les différents tissus et organes cibles où ils pourront exercer leurs effets protecteurs ou être excrétés dans l'urine (**Figure 53**). Lorsque les polyphénols ne sont pas absorbés et métabolisés au niveau de l'intestin, ceux-ci rejoignent le côlon et y sont dégradés par les bactéries coliques (Cardona, Andrés-Lacueva et al., 2013). Plusieurs métabolites microbiens des polyphénols ont été identifiés parmi des dérivés d'acides phénylvalériques, phénylpropioniques, phénylacétiques et phénylbenzoïques dont un majoritaire est l'acide hippurique (Gonthier, Cheynier et al., 2003, Gonthier, Donovan et al., 2003, Gonthier, Verny, 2003). Des métabolites microbiens plus spécifiques de certains types de polyphénols ont aussi été rapportés, comme l'équol dérivant du catabolisme microbien des isoflavones du soja (Zheng, Ma et al., 2019) ou encore les urolithines

issues du métabolisme microbien de l'acide ellagique et de ses dérivés ellagitanins abondants dans la grenade par exemple (González-Sarrías, García-Villalba et al., 2017). A ce titre, les auteurs rapportent une notion importante en matière de biodisponibilité des polyphénols, à savoir l'impact crucial du microbiote intestinal qui permet de définir des personnes productrices ou non productrices de tel ou tel type de métabolite microbien («producers/non producers»). Il en ressort la nécessité de mieux considérer dans les études nutritionnelles, l'existence de différents types de métabolisme ou « métabotypes » selon la variabilité interindividuelle en matière d'absorption, de métabolisme et d'effets biologiques des polyphénols (Morand and De Roos 2020).

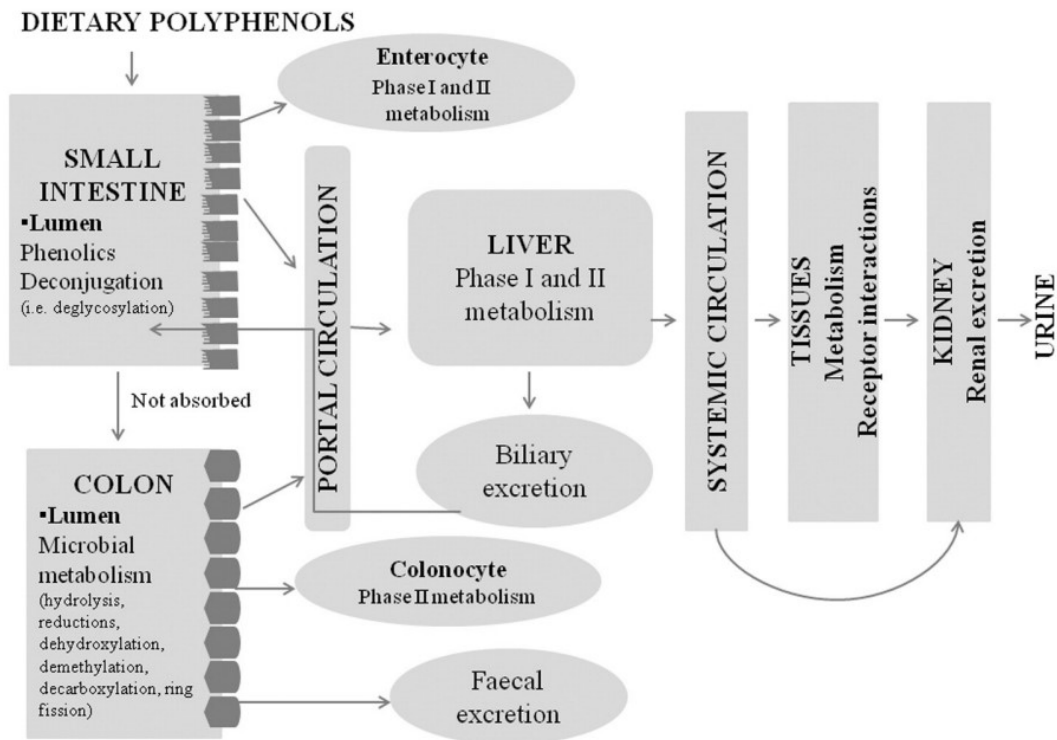


Figure 53 : Devenir métabolique des polyphénols apportés par l'alimentation.

(Cardona, Andrés-Lacueva, 2013)

On distingue trois facteurs majeurs qui impactent sur la biodisponibilité des polyphénols permettant ainsi d'établir la nature et les concentrations des métabolites circulant dans l'organisme et dans les tissus cibles, à savoir :

- leur niveau d'absorption intestinale,

- leur métabolisme au niveau de l'intestin grêle et le foie,
- leur dégradation par le microbiote retrouvé au niveau du côlon.

Sur l'apport total des polyphénols ingérés par l'alimentation sous forme d'esters, de glycosides ou polymères, seulement 5 à 10% peuvent être directement absorbés sous forme d'aglycones au niveau de l'intestin grêle après des réactions de déconjugaison telle que la déglycosylation par des glycosidases et estérases microbiennes, avant d'être véhiculés sous forme moins complexe vers la veine porte (Manach, Scalbert, 2004). On distingue deux enzymes essentielles à l'hydrolyse, la libération et le transport des aglycones à savoir la lactase phloridzine hydrolase et la β -glucosidase cytosolique, retrouvés dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle (Danielsen and Danielsen 2017). Par ailleurs, le transporteur de glucose couplé au sodium SGLT1 participe également à l'absorption intestinale des flavonoïdes glycosylés et en particulier pour les glycosides de quercétine sous leur forme native (de Oliveira, Nabavi et al., 2015). Les métabolites peuvent subir une phase I associée à des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse, puis une phase II de conjugaison caractérisée par des réactions comme des méthylations, des sulfatations et des glucuronidations. La méthylation des polyphénols a lieu dans l'intestin, la sulfatation se passe dans le foie et la glucuronidation se déroule dans le foie et l'intestin (Piskula and Terao 1998). Les réactions de conjugaison dépendent de la nature des substrats et de la dose de polyphénols ingérée. De plus, les propriétés biologiques des polyphénols sembleraient être basées sur les étapes de conjugaison/déconjugaison des polyphénols au niveau hépatique (O'Leary, Day et al., 2003). A leur sortie du foie, une partie des métabolites tissulaires peut être excrétée dans la bile et subir un cycle entérohépatique les acheminant à nouveau vers l'intestin grêle. Les métabolites tissulaires formés sont transportés vers le foie et vont subir des transformations métaboliques comme des clivages des liaisons C-C des hétérocycles, avant de retrouver la circulation sanguine ou d'être définitivement éliminés dans les fèces. Dans le cas où ils ne sont pas utilisés, les métabolites sont éliminés dans la bile ou dans l'urine pour les métabolites de petit poids moléculaire (Gonthier, Verny, 2003, Manach, Scalbert, 2004).

Aujourd'hui, des outils d'analyse robustes comme la spectrométrie de masse permettent de dresser l'empreinte/la signature métabolomique associée à la consommation d'un type de polyphénol ou d'aliment donné. Ainsi, des biomarqueurs

de consommation/d'exposition à des polyphénols sont recherchés en vue de faire une corrélation avec leurs effets biologiques notamment (Ulaszewska, Vázquez-Manjarrez et al., 2018, Ulaszewska, Weinert et al., 2019). La biodisponibilité des polyphénols dans l'organisme est en effet l'élément majeur responsable de leurs effets bénéfiques sur la santé. La biodisponibilité, à son tour, dépend de la structure du polyphénol, de la quantité consommée ainsi que la concentration plasmatique retrouvée (D'Archivio, Filesi, 2007). Le tableau ci-dessous indique les données obtenues pour des polyphénols retrouvés dans l'alimentation, chez l'Homme (**Tableau 2**). Il en ressort que la concentration plasmatique des polyphénols excède rarement 1 µM bien qu'elle puisse atteindre 7-10 µM pour certains polyphénols, selon la variabilité interindividuelle d'absorption et de métabolisme notamment dépendant de la microflore intestinale, le type de molécule, la dose ingérée et la source alimentaire.

Tableau 2 : Concentrations plasmatiques des polyphénols ingérés via l'alimentation chez l'Homme.

Famille	Polyphénol	Origine	Quantité de polyphénols ingérés (mg)	Concentration plasmatique (µM)	Références
Acide hydroxycinnamique	Acide caféique	Vin rouge	1,80	0,06	(Simonetti et al., 2001)
Acide hydroxycinnamique	Acide chlorogénique	Café	96,00	0,50	(Nardini et al., 2002)
Acide hydroxybenzoïque	Acide gallique	Thé noir	50,00	1,80	(Shahrzad et al., 2001)
Flavonol	Quercétine	Oignon	100,00	7,60	(Graefe, Wittig et al. 2001)

6.1.3. Mode d'action connu des polyphénols

Même si les effets protecteurs des polyphénols sont largement étudiés dans la littérature, il existe peu de données sur leurs mécanismes et leurs modes d'actions au sein des différents types cellulaires. Cependant, certains récepteurs et des voies de signalisation ont été identifiés comme des acteurs majeurs impliqués dans la bioactivité des polyphénols.

Parmi les différents récepteurs connus, nous distinguons le **récepteur laminine 67 kDa** (67LR). C'est un récepteur de surface cellulaire ne faisant pas partie de l'intégrine et ayant une forte affinité pour la laminine. Celui-ci est essentiel dans le processus de l'adhésion cellulaire à la membrane basale et participe au développement du cancer. Une étude de Gundimeda et al., a démontré qu'un pré-traitement de deux jours avec des polyphénols du thé vert et de leur polyphénol bioactif l'EGCG, protège les cellules PC12 de phéochromocytome de rat d'une mort cellulaire induite par une privation puis une réoxygénation d'oxygène-glucose, via leur liaison au 67LR, auquel l'EGCG se lie avec une forte affinité (Gundimeda, McNeill et al., 2012). De plus, l'équipe de Ren et al. a observé que l'EGCG (1-25 μ M) a considérablement atténué la migration de macrophages RAW264.7 induite par des lipopolysaccharides bactériens, de manière dose-dépendante via le 67LR. L'EGCG a également provoqué une translocation membranaire marquée de 67LR de la surface de la membrane vers le cytoplasme. Par ailleurs, une analyse de biotinylation de la surface cellulaire a confirmé que l'EGCG induisait une internalisation significative de 67LR de 24 à 68% de manière dose-dépendante (Ren, Guo et al., 2014).

Les **récepteurs à l'œstrogène** (ER) seraient également impliqués dans la signalisation des polyphénols et principalement pour les phyto-estrogènes de type isoflavones qui ont la capacité de se lier aux ER et qui agissent en tant qu'agonistes (Gehm, McAndrews et al., 1997). Klinge et al., ont démontré que le resvératrol retrouvé dans le vin rouge active la voie MAPK et eNOS via la stimulation des ER retrouvés dans des cellules endothéliales d'aortes bovines, de veines ombilicales humaines et microvasculaires humaines exprimant $Er\alpha$ et $Er\beta$. Par ailleurs, l'utilisation d'antagonistes tels que le 4-hydroxytamoxifène inhibe l'activation de la MAPK par le resvératrol, indiquant que l'activation est bien médiée grâce à la liaison du resvératrol aux ER (Klinge, Blankenship et al., 2005).

Quelques études ont aussi mis en avant la capacité des flavonoïdes à franchir la barrière endothéliale par diffusion et à exercer des effets bénéfiques. En effet, l'équipe de Youdim et al., a montré que la naringénine et la quercétine traversent un modèle

cellulaire de co-culture mimant la BHE *in vitro*, en accord avec leur structure lipophile (Youdim, Qaiser et al., 2004). La structure des polyphénols, les interactions avec la membrane et les médiateurs environnants, la dose et le temps d'exposition influent sur la capacité des polyphénols à pouvoir traverser la membrane cytoplasmique des cellules cibles (Saija, Scalese et al., 1995).

Enfin, les **transporteurs d'efflux** tels que la P-gp ou la BCRP, semblent également être impliqués dans le mode d'action des polyphénols. En effet, une étude de Figueira et de ses collaborateurs a confirmé que ces transporteurs contribuent au transport global des métabolites de polyphénols à travers la BHE, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces transporteurs d'intérêt. Les polyphénols seraient capables de moduler ou d'inhiber ces pompes à efflux, d'empêcher leur expulsion à l'extérieur de la cellule et d'exercer leurs propriétés bénéfiques de manière intracellulaire (Figueira, Garcia, 2017).

6.1.4. Les propriétés biologiques des polyphénols

De plus en plus, de nombreux chercheurs voient un intérêt croissant pour l'étude des polyphénols, connus pour exercer des propriétés biologiques bénéfiques. En effet, ces polyphénols sont reconnus comme étant des puissants facteurs antioxydants, anti-inflammatoires et vasoprotecteurs dans des conditions physiopathologiques comme les maladies cardiovasculaires, l'obésité et le diabète. Chez le patient diabétique, la dysfonction endothéliale caractérisée par un stress oxydatif et un état pro-inflammation pourrait être atténuée voir corrigée par des thérapies basées sur l'utilisation de molécules végétales naturelles comme les polyphénols.

➤ Impact sur la fonction endothéliale et capacité antioxydante

Le dysfonctionnement endothélial lié à une hyperglycémie chronique joue un rôle majeur dans le développement de la pathologie diabétique. Plusieurs études montrent le potentiel des polyphénols végétaux à exercer des effets protecteurs dans le but de protéger l'endothélium. Les polyphénols végétaux sont naturellement utilisés pour leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables grâce à leur structure chimique de capter et de piéger les radicaux libres en formant des radicaux moins réactifs et ainsi réguler le statut redox (Rice-Evans, Miller, 1996). La capacité

antioxydante des polyphénols est due à leur capacité à donner des protons ou réaliser un transfert d'électron par transfert de proton à une espèce radicalaire. De plus, les polyphénols possèdent un potentiel de chélation des métaux et la capacité à empêcher l'implication de ces métaux dans des réactions chimiques induisant la production de radicaux libres comme la réaction de Fenton (Rice-Evans, Miller, 1996). Chez des cellules endothéliales humaines HUVECs, le resvératrol entraîne la phosphorylation de eNOS au niveau de sa sérine 1177 et la production de NO. De plus, il favorise la phosphorylation de l'AMPK qui va à son tour réduire la génération de radicaux libres provoquée par le glucose (Xu, Hao et al., 2009). La quercétine a démontré ses capacités à protéger les cellules du stress oxydatif en diminuant la peroxydation lipidique, à prévenir l'épuisement du glutathion et à améliorer les activités antioxydantes de la catalase et de la SOD (Fiorani, De Sanctis et al., 2001, Mahesh and Menon 2004). Le resvératrol améliore les réponses vasculaires chez des rats diabétiques induits par streptozotocine et il restaure les fonctions endothéliales et les réponses vasculaires via l'inhibition de l'activation de TNF- α induite par une NOX, tout en préservant la phosphorylation d'eNOS (Zhang, Zhang et al., 2009). De manière intéressante, l'épicatéchine a montré sa capacité à améliorer la sensibilité à l'insuline chez des souris diabétiques et obèses. Elle inhibe également l'inflammation, le stress oxydatif, le stress du réticulum endoplasmique en inhibant l'expression de NOX, NF κ B et JNK (Fraga, Oteiza et al., 2018, Cremonini, Fraga et al., 2019). Des faibles quantités d'acide caféique inhibent la translocation de NF κ B et l'expression de molécules d'adhésion durant l'hyperglycémie. En effet, l'acide caféique induit une activation du facteur de transcription Nrf2 redox-sensible et une atténuation de la dysfonction endothéliale causée par l'hyperglycémie (Fratantonio and Speciale 2017). Dans un contexte physiopathologique où des souris C5BL/6J sont soumises à une ischémie cérébrale, la quercétine diminue significativement l'élévation des taux de MMP-9 et GSK-3 β (Cho, Kim et al., 2006). De plus, elle réduit l'œdème cérébral et augmente l'expression des protéines des jonctions serrées à savoir ZO-1, claudine-5 et la β -caténine via la voie de signalisation canonique Wnt/ β -caténine, ce qui améliore le dysfonctionnement de la BHE causé par l'hyperglycémie.

➤ Capacité anti-inflammatoire

Les polyphénols possèdent également des propriétés anti-inflammatoires. Ils agissent généralement en atténuant l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires via la modulation des voies NFκB et AMPK impliquées dans les phénomènes d'inflammation (Salminen, Hyttinen et al., 2011).

Montfoulet et al., ont mis en évidence les effets protecteurs de la curcumine en présence de TNF-α. La curcumine protège la fonctionnalité endothéliale et l'intégrité de la barrière endothéliale en diminuant la perméabilité et l'expression des facteurs favorisant la migration transendothéliale de monocytes (Monfoulet, Mercier et al., 2017). Une autre étude de Coban et al., a été réalisée chez des souris ApoE^{-/-} nourries durant 4 mois également avec de la curcumine. Les résultats montrent que la supplémentation en curcumine a réduit l'étendue de la lésion athérosclérotique de 26%, l'adhésion et la transmigration endothéliale de monocytes et par ailleurs une diminution de l'infiltration macrophagique à travers la plaque via la modulation du facteur de transcription NFκB (Coban, Milenkovic et al., 2012).

Les anthocyanes et leurs métabolites ont également montré une capacité à réduire l'adhérence des monocytes et leur transmigration endothéliale par des mécanismes nutriginomiques régulant la perméabilité des cellules endothéliales (Krga, Tamaian et al., 2018).

➤ Capacité antidiabétique

Les polyphénols exercent des effets dits anti-diabétiques en favorisant la sécrétion de GLP-1 et en augmentant sa durée de vie par inhibition de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP4). Ils permettent également la sécrétion d'insuline par les cellules β (Domínguez Avila, Rodrigo García et al., 2017). De plus, certains polyphénols seraient capables d'exercer des effets similaires aux antidiabétiques pharmaceutiques, mais il manque encore des données pour pouvoir le confirmer scientifiquement. Fujii et al. ont démontré *in vivo* chez des souris mâles C57BL6/J ayant reçu un extrait de café riche en polyphénols (0,6 g/kg), que la libération de GLP1 a augmenté (quantifiée après 10 et 30 min après) mais sans avoir d'effet sur la glycémie ou sur la concentration d'insuline. Cependant, l'hyperglycémie postprandiale a diminué, ce qui indique que des taux de GLP-1 plus élevés après l'ingestion de l'extrait de café peuvent améliorer la

sensibilité à l'insuline. De plus, lorsque le café était co-administré avec du glucose, la glycémie diminuait plus rapidement. Cela a permis d'évoquer que les dérivés phénoliques du café comme l'acide caféique et son ester l'acide chlorogénique, peuvent stimuler la sécrétion de GLP1 dans un modèle *in vivo* (Fujii, Osaki et al., 2015).

Une autre équipe a montré que les polyphénols du cacao exercent également une inhibition de la DPP4 et que la fermentation et la torréfaction peuvent améliorer ce résultat (Ryan, Khoo et al., 2017). Les effets d'un extrait aqueux de cannelle riche en polyphénols (10 et 100 µg/mL) ont été évalués sur les entérocytes de rat Wistar. Les traitements ont augmenté les taux d'ARNm des médiateurs IR, IRS-1, IRS-2, PI3K/Akt1 de la voie de signalisation de l'insuline, et à l'inverse, ceux de l'homologue de la tensine (Pten) ont été diminués. Ces observations ont abouti à la conclusion que les polyphénols de la cannelle sont capables d'augmenter la sensibilité à l'insuline des entérocytes (Qin, Dawson et al., 2012).

Ferrare et al., ont mis en avant qu'une supplémentation de 7 jours avec un extrait de chicorée riche en acide chicorique, ou d'un mélange d'acides chicorique et chlorogénique, améliorerait la tolérance au glucose et réduisait l'hyperglycémie basale chez des rats diabétiques, induit par streptozotocine (Ferrare, Bidet et al., 2018).

➤ Capacité cardio-protectrice

Des données de la littérature ont mis en avant le rôle cardio-protecteur des polyphénols et notamment des flavonoïdes et des stilbènes sur les maladies cardiovasculaires (Vita 2005, Bojić, Maleš et al., 2019). En effet, les données montrent que les patients ayant un apport plus élevé en flavonoïdes ont un risque réduit de développer des maladies cardiovasculaires. *In vivo*, une supplémentation de 8 semaines en fructose chez des rats Sprague-Dawley a entraîné une hypertrophie cardiaque et une augmentation de la production de ROS via les NOX. De plus, il a été observé une activation de la voie NFκB-p65 et une réduction de l'activité Sirt-1 au niveau du cœur diabétique. De manière importante, la co-exposition au resvératrol a activé Sirt-1 qui a inhibé l'activité NFκB et a réduit l'hypertrophie cardiaque (Bagul, Deepthi et al., 2015).

A l'échelle humaine, l'étude de Zupthen réalisée en 1985 sur 693 hommes âgés de 65 à 84 ans et ayant reçu un apport moyen de flavonoïdes de 25,9 mg/jour durant 5 ans, à travers la consommation de thé (61%), d'oignons (13%) et de pommes (10%), a retenu l'attention. Entre 1985 et 1990, les auteurs ont démontré que 43 hommes sont décédés

d'une maladie coronarienne et 38 personnes d'un infarctus du myocarde. Enfin, leurs données révèlent que les apports en flavonoïdes sont inversement corrélés à la mortalité due aux maladies coronariennes (Hertog, Feskens et al., 1993). L'étude de Rotterdam, réalisée sur une population néerlandaise, a démontré que sur 5,6 ans, il y a 146 infarctus du myocarde recensés dont 30 mortels sur 4807 sujets sans antécédents. Selon leurs données épidémiologiques, il s'est avéré que le risque d'incidence d'infarctus du myocarde était plus faible chez les consommateurs de thé qui représente une principale source de flavonoïdes dans les populations occidentales. De ce fait, cette étude a validé également que l'apport en flavonoïdes alimentaires tels que la quercétine, le kaempférol et la myricétine, contribue à la prévention de cardiopathies ischémiques (Geleijnse, Launer et al., 2002). Par ailleurs, Bondonno et al., ont permis de mettre en évidence les effets des polyphénols végétaux sur la fonction endothéliale après une ingestion chronique ou aiguë d'extrait de pomme riche en flavonoïdes ou à l'inverse, pauvre en flavonoïdes sur quatre semaines, chez 30 participants. Ils ont pu observer un effet vasodilatateur caractérisé par une augmentation de la dilatation de l'artère brachiale et une augmentation de la concentration plasmatique en métabolites circulants de flavonoïdes après une prise aiguë ou chronique. Toutefois, ils notent que les taux de quercétine quantifiés sont plus importants dans le plasma des personnes ayant consommé l'extrait riche en flavonoïdes de manière aiguë (Bondonno, Bondonno et al., 2018). Enfin, dans une autre étude, des rats ont reçu une injection intrapéritonéale de doxorubicine pour induire une insuffisance cardiaque chronique, puis ont été traité avec un extrait du fruit d'aubépine chinoise. Ce fruit, contenant de l'épicatéchine, exerçait des effets cardioprotecteurs, caractérisés par une inhibition de la réponse inflammatoire dans le tissu cardiaque et de l'expression génique d'IL-1 β et de TNF- α . A l'inverse, ils ont observés une régulation à la hausse de l'expression génique de la GPx-1 et de la catalase (Cheng, Jiang et al., 2020).

➤ Capacité anti-cancer

De nombreux auteurs ont rapporté la présence d'un lien conséquent entre la consommation de polyphénols végétaux et le risque de cancer (Niedzwiecki, Roomi et al., 2016). En effet, une étude de Wu et al. a mis en évidence la capacité de la quercétine à supprimé la croissance d'un carcinome hépatocellulaire *in vivo* et *in vitro*. La

quercétine va inhiber la prolifération, la migration et l'invasion des cellules LM3, menant à terme à leur apoptose ou leur autophagie. Par ailleurs, ils ont montré que la quercétine inhiberait les métastases des cellules LM3 en régulant l'expression de la E-cadhérine, de la vimentine et de la MMP9 ainsi qu'en atténuant partiellement l'activation de la voie JAK2/STAT3 (Wu, Li et al., 2019). Les effets anti-cancer de la quercétine seraient également dus à une diminution significative du stress oxydatif et une augmentation des activités antioxydantes (Seufi, Ibrahim et al., 2009). Par ailleurs, les polyphénols végétaux peuvent inhiber des voies de signalisations des kinases telles que MAPK, MEK1 et ERK (Athar, Back et al., 2007, García-Lafuente, Guillamón et al., 2009) ou en activant les voies de mort cellulaires par apoptose comme Akt/PKB et la phosphorylation de la Bcl-2 (B cell lymphoma-2).

➤ Capacité antimicrobienne et anti-bactérienne

Les prébiotiques sont définis comme des substrats métabolisés de manière sélective par les microorganismes présents au niveau de l'intestin, responsables des avantages pour la santé. Des données récentes suggèrent que les polyphénols pourraient moduler la composition des populations bactériennes du microbiote intestinal, notamment en luttant contre la croissance des bactéries intestinales pathogènes. La consommation de polyphénols, en particulier de catéchines, d'anthocyanes et de proanthocyanidines, augmente l'abondance de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia*, *Roseburia* et *Faecalibacterium* spp (Alves-Santos, Sugizaki et al., 2020).

Jusqu'à présent, peu d'études ont rapporté les effets négatifs des polyphénols sur la santé. Le peu d'effets délétères relevés sur les polyphénols concerne un risque d'anémie liée à une surconsommation de polyphénols du thé. En effet, chez des personnes à risque anémique, la carence en fer peut être aggravée du fait de la capacité des polyphénols à piéger le fer au niveau de l'intestin. Pour résoudre ce problème, il est recommandé de distancer la prise de thé des périodes post-prandiales (Yang and Landau 2000, Chen, Milacic et al., 2008).

Compte tenu de la variété des effets protecteurs des polyphénols végétaux, il serait pertinent de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur ces molécules dotées de multiples propriétés bénéfiques. Il est important de noter qu'il existe des

facteurs qui sont responsables de la variation des effets entre les sujets, en réponse à la consommation de polyphénols alimentaires. De plus, il est d'un intérêt croissant d'évaluer la variabilité interindividuelle en réponse à l'apport d'aliments végétaux bioactifs. L'identification de ces principaux facteurs impliqués permettra le développement et la production de produits alimentaires végétaux, satisfaisant ainsi les besoins nutritionnels et conférant des avantages aux différentes populations (Milenkovic, Morand et al., 2017, Morand and Tomás-Barberán 2019).

6.2. Les plantes médicinales issues de la biodiversité réunionnaise

6.2.1. *La biodiversité végétale de La Réunion*

En premier lieu, il est important de relever que plus de 80% de la biodiversité végétale de la France se situent dans ses régions ultrapériphériques dites outre-mer. La Réunion, d'une superficie de 2 512 km², est un département d'outre-mer français. C'est une île volcanique située dans l'Océan Indien dans l'hémisphère sud. Du fait de sa situation géographique et de sa constitution géologique, elle constitue l'Archipel des Mascareignes, avec les îles Maurice et Rodrigues. La Réunion possède une faune et une flore très variées avec de nombreuses plantes à parfum, aromatiques et médicinales présentant pour plusieurs d'entre elles un caractère endémique. En effet, la flore tropicale de La Réunion est caractérisée par une grande diversité d'espèces qui se démarquent en fonction des différents milieux, que ce soit sur le littoral ou dans les hautes montagnes. On peut distinguer divers types d'espèces de plantes : les espèces exotiques, indigènes et endémiques. Une espèce est dite exotique lorsqu'elle est introduite dans une région différente de son aire naturelle. Une espèce indigène est une espèce naturellement présente sans l'intervention de l'Homme. Enfin, une espèce endémique est une espèce naturellement présente dans une région donnée. Il faut savoir que La Réunion représente un des vingt-cinq hotspots de la biodiversité végétale mondiale avec un fort taux d'endémisme. En effet, l'île compte près de 1000 espèces de plantes avec 856 espèces indigènes (49%) dont 232 espèces endémiques de La Réunion (28%) et 156 espèces endémiques des Mascareignes (18%), 834 espèces exotiques (48%) et 54 espèces cryptogènes (3%).

6.2.2. Plantes médicinales réunionnaises utilisées en Pharmacopée traditionnelle

A ce jour, parmi les multiples espèces végétales retrouvées à La Réunion, on compte 200 plantes médicinales. L'utilisation des plantes médicinales reste très ancrée dans les pratiques traditionnelles, la culture et les mœurs des réunionnais, et cela malgré la modernisation de l'île. Depuis des années jusqu'à encore aujourd'hui, les plantes médicinales sont largement utilisées en tant que remèdes contre certaines maladies comme le diabète et l'obésité. Selon l'ouvrage du Dr Roger Lavergne paru en 2001 basé sur de l'ethnopharmacologie, les plantes médicinales étaient utilisées en Pharmacopée traditionnelle pour leurs propriétés curatives dans le but de soigner les individus. En effet, l'utilisation des plantes contre des affections de la peau, des troubles digestifs et de l'hypertension artérielle était très appliquée par les réunionnais. Cependant, les connaissances assimilées sur ces plantes sont souvent empiriques et méritent d'être confirmées par des données scientifiques (Lavergne 2016, Smadja 2016). Aujourd'hui, de nombreux tisaneurs proposent des associations de plantes dans le but de soigner contre de multiples pathologies et notamment contre le diabète, en parlant de plantes médicinales à vertus anti-diabétiques. De plus, de nombreuses personnes préfèrent actuellement se soigner par une méthode naturelle avec l'utilisation de plantes que par une méthode chimique avec l'usage des médicaments (Welz, Emberger-Klein et al., 2018). Ces plantes médicinales sont souvent préparées sous forme de tisanes. Il existe différents modes de préparation de tisanes : l'infusion, la décoction et la macération. Le mode de préparation est important pour assimiler le maximum de principes actifs présents dans la plante. De ce fait, l'infusion apparaît comme la méthode d'extraction la plus communément utilisée et permettant d'extraire par de l'eau chaude les principes actifs, en conservant les propriétés thérapeutiques et en préservant les arômes des plantes. La décoction est utilisée pour extraire les principes actifs des racines, des tiges ou de l'écorce des plantes. Enfin, la macération repose sur un principe d'extraction similaire à celui de l'infusion, mais avec un temps d'incubation de la plante plus long dans un liquide.

6.2.3. Plantes médicinales réunionnaises inscrites à la Pharmacopée Française

Depuis 2013, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) référence les plantes médicinales et les inscrit à la Pharmacopée Française. La Pharmacopée est un ouvrage dédié aux personnels de santé recensant les substances d'origine animale, végétale, minérale ou encore chimique utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques. Parmi les 200 plantes médicinales retrouvées à La Réunion, 27 d'entre elles sont inscrites à la Pharmacopée Française. En 2019, la liste constituée de 22 plantes a été rallongée avec 5 nouvelles plantes. L'Association pour la Protection des Plantes Aromatiques et Médicinales de l'Outre-Mer – Réunion (APLAMEDOM), l'Association pour le Développement, la défense et la Promotion des Plantes à Parfums Aromatiques et Médicinales de La Réunion (ADPAPAM) et l'Unité de Recherche UR2212 CHEMBIOPRO de l'Université de La Réunion ont participé à l'élaboration de cette liste de 27 plantes inscrites à la Pharmacopée Française (**Figure 54**). Les plantes sont référencées dans deux listes, la liste A et la liste B. La liste A concerne les plantes médicinales utilisées traditionnellement et la liste B concerne les plantes médicinales utilisées traditionnellement en l'état ou sous forme de préparation dont les effets indésirables potentiels sont supérieurs au bénéfice thérapeutique attendu. L'ensemble des plantes référencées sont inscrites en liste A sauf Bois jaune, Bois de quivi et l'Arbre du voyageur qui sont sur la liste B. Parmi ces plantes, Bois jaune, Liane d'olive et Patte poule sont considérés comme vulnérables et Bois jaune est également inscrite comme étant une espèce protégée.



Figure 54 : Plantes médicinales inscrites à la Pharmacopée Française.

ER : Endémique de la Réunion ; **ERM** : Endémique de la Réunion et Maurice ; **EM** : Endémique de Madagascar ; **EX** : Exotique ; **EX** : Exotique et envahissante ; **IN** : Indigène ; **IN** : Indigène avec une endémicité macro-régionale de Madagascar et Mascareignes ; **IN** : Indigène avec une endémicité macro-régionale des Comores et Mascareignes ; **Z** : Amphinaturalisé.

(APLAMEDOM)

Parmi ces plantes médicinales référencées à la Pharmacopée Française, une dizaine d'entre elles seraient utilisées pour des vertus anti-diabétiques selon des connaissances ethnopharmacologiques. Dans ce travail de thèse, nous avons sélectionné quatre plantes traditionnellement utilisées pour leurs propriétés anti-diabétiques que nous détaillerons ci-dessous :

➤ *Antirhea borbonica* ou bois d'osto

Antirhea borbonica, communément appelée bois d'osto est une plante endémique de l'île de La Réunion et de l'île Maurice, appartenant à la famille des Rubiacées (**Figure 55**). Elle est inscrite à la Pharmacopée Française pour des propriétés thérapeutiques antifongiques et antimicrobiennes, diurétiques et hypertensives, cicatrisantes et astringentes. Cependant, en Pharmacopée traditionnelle, elle est utilisée pour une action antidiabétique et hypocholestérolémiante (APLAMEDOM).

De plus, les capacités anti-inflammatoires et antioxydantes d'extraits riches en polyphénols de cette plante ont été démontrées dans notre laboratoire sur des modèles d'adipocytes murins (Marimoutou, Le Sage et al., 2015, Le Sage, Meilhac et al., 2017a), de globules rouges humains (Delveaux, Turpin et al., 2020) et de poissons zèbres chez lesquels des études de toxicité dose-dépendante ont aussi été menées (Ghaddar, Veeren et al., 2020, Veeren, Ghaddar et al., 2020).



Figure 55 : Bois d'osto.

➤ *Ayapana triplinervis* ou ayapana

Ayapana triplinervis est une plante exotique appartenant à la famille des Astéracées (**Figure 56**). Cette plante inscrite à la Pharmacopée Française, plus connue sous le nom d'Ayapana, est retrouvée dans plusieurs autres régions du monde et est utilisée comme cicatrisant pour ses propriétés à la fois antimicrobiennes, antibactériennes, anti-parasitaires, antifongiques, et contre les troubles de la digestion. Cependant, selon les recherches de Benoist en 1980, les premières enquêtes ethnobotaniques impliquant des guérisseurs à La Réunion ont recensé l'utilisation de l'ayapana pour lutter contre le diabète (APLAMEDOM).



Figure 56 : Ayapana.

➤ *Terminalia bentzoe* ou faux benjoin

Le faux benjoin est le nom vernaculaire de *Terminalia bentzoe* (**Figure 57**). Cette plante endémique est largement utilisée en Pharmacopée traditionnelle en association avec d'autres plantes de la biodiversité végétale réunionnaise pour ses propriétés antidiabétiques. Elle appartient à la famille des Combrétacées. Le faux benjoin est connu pour également avoir des propriétés thérapeutiques antifongiques, anti-diarrhéiques, anti-plasmodiques et antimicrobiennes (APLAMEDOM). De plus, lors d'une étude réalisée sur un panel de 64 plantes endémiques des îles Mascareignes, le faux benjoin a démontré des puissants effets antioxydants (Ledoux, Cao et al., 2018). Selon une seconde étude, l'extrait *T. bentzoe* était l'extrait antioxydant le plus puissant

parmi 7 plantes avec une capacité à stopper la croissance des cellules de carcinome hépatique humain (Rummun, Rondeau et al., 2020).



Figure 57 : Faux benjoin.

➤ *Dodonaea viscosa* ou bois de reinette

Le bois de reinette dont le nom latin est *Dodonaea viscosa*, est une plante indigène appartenant aux Sapindacées (**Figure 58**). Ce nom lui a été attribué pour son odeur spécifique et caractéristique de la pomme de reinette. Elle est inscrite à la Pharmacopée Française et est utilisée pour ses vertus thérapeutiques analgésiques et fébrifuges, vulnérinaires et astringentes, diurétiques et hypotensives, antibactériennes et antivirales mais également antidiabétiques (APLAMEDOM). De plus, Veerapur et al., ont réalisé une étude *in vivo* visant à évaluer l'effet d'un extrait de *D. viscosa* dans un régime alimentaire riche en fructose qui induit une résistance à l'insuline chez des rats Wistar. Les résultats obtenus ont fourni des preuves pharmacologiques pour l'action protectrice de *D. viscosa* dans le traitement des conditions prédiabétiques. Selon les auteurs, ses effets pourraient être médiés par l'interaction avec plusieurs cibles impliquées dans le diabète sucré (Veerapur, Prabhakar et al., 2010).



Figure 58 : Bois de reinette.

6.2.4. Le protocole de Nagoya

Il est important de relever que l'utilisation des plantes médicinales à des fins de recherche et développement requiert d'une part leur identification botanique avec attribution d'un numéro de voucher et enregistrement dans un Herbarium par un botaniste agréé, et d'autre part leur déclaration au protocole de Nagoya. Le protocole de Nagoya a été adopté en 2010 lors d'une réunion de la Conférence sur la diversité biologique, à Nagoya, au Japon, avant d'entrer en vigueur le 12 Octobre 2014 en concertation avec de nombreux pays dont la France. Il vise à autoriser et à réglementer l'accès aux ressources génétiques c'est-à-dire un matériel d'origine végétale, animale, microbienne ou autre contenant des unités fonctionnelles de l'hérédité, ayant une valeur effective ou potentielle ainsi que le partage juste et équitable des avantages et des connaissances traditionnelles découlant de leurs utilisations. Il contribue à stimuler la conservation de la diversité biologique, à accroître leur participation au développement durable et à lutter contre l'appropriation illégitime des ressources génétiques et des connaissances traditionnelles autochtones.

Ce protocole a un impact important sur le monde de la recherche, et notamment pour les étudiants dont les travaux sont en lien direct avec la biodiversité, que ce soit au niveau de l'accès aux ressources et aux connaissances traditionnelles ou aux relations avec les partenaires de recherche, ou encore dans le cadre de la valorisation scientifique et économique. Les États signataires ont élaboré des législations qui varient en fonction des situations et des pays et les utilisateurs doivent se conformer à ces réglementations. Dans le cas où le protocole ne serait pas respecté, les utilisateurs s'exposent à des risques juridiques (amendes, emprisonnement), financiers (perte de subventions), au

niveau de la valorisation des données (non-publication et non exploitation des résultats) et de la notoriété (perte d'attractivité et de partenariat) (Nagoya 2014).

Dans le cadre de mon travail de thèse, l'identification botanique des quatre plantes médicinales étudiées avec attribution d'un numéro de voucher et enregistrement dans l'Herbier de l'Université de La Réunion, ainsi que leur déclaration au Protocole de Nagoya ont été réalisées.

III. Objectif du travail de thèse

Le DT2 est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique. Au niveau cérébral, le diabète entraîne des complications neurovasculaires et aggrave les désordres hémorragiques associés à l'AVC. Les cellules endothéliales cérébrales qui constituent la BHE représentent les principales cibles de l'hyperglycémie. En effet, celle-ci engendre d'importantes dérégulations de marqueurs redox, inflammatoires, vasoactifs et de la perméabilité endothéliale qui vont mener à une dysfonction de l'endothélium. La recherche des mécanismes moléculaires et cellulaires menant aux complications vasculaires cérébrales chez le patient diabétique, constitue donc un enjeu scientifique, médical et sociétal majeur. De plus, nous devons nous interroger sur la mise en place de stratégies thérapeutiques et/ou nutritionnelles innovantes. De manière intéressante, les polyphénols végétaux représentent les antioxydants les plus abondants de notre alimentation et exercent de multiples effets biologiques bénéfiques comme des actions anti-inflammatoires. De plus, La Réunion représente un *hot spot* de la biodiversité végétale mondiale avec 27 plantes médicinales réunionnaises inscrites à la Pharmacopée Française. Parmi ces plantes, certaines sont largement utilisées pour des propriétés anti-diabétiques et anti-inflammatoires. Les données de la littérature démontrent que les polyphénols végétaux peuvent améliorer les dérégulations de cellules endothéliales périphériques causées par une hyperglycémie. Néanmoins, il manque encore des données concernant les effets protecteurs des polyphénols végétaux sur des cellules endothéliales cérébrales microvasculaires en condition d'hyperglycémie.

L'objectif de mon travail de thèse était d'évaluer les effets protecteurs des polyphénols de plantes médicinales contre les dérégulations fonctionnelles des cellules endothéliales cérébrales en condition hyperglycémique liée au diabète. Pour répondre à cette problématique, nous avons sélectionné quatre plantes médicinales réunionnaises que sont *Antirhea borbonica*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa* et *Terminalia bentzoe* traditionnellement utilisées pour des vertus anti-diabétiques, ainsi que quatre composés phénoliques que nous avons détectés comme majoritaires dans ces plantes, à savoir l'acide caféique, l'acide chlorogénique, l'acide gallique et la quercétine.

Pour atteindre cet objectif, le travail de thèse a été divisé en trois principales actions :

- La première action visait à caractériser et quantifier les polyphénols extraits des quatre plantes médicinales sélectionnées et à déterminer leurs capacités antioxydantes *in vitro*. Cette action avait aussi pour but d'évaluer les effets des extraits végétaux riches en polyphénols et de leurs quatre composés phénoliques majoritaires sur des marqueurs redox (ROS, enzymes pro- et antioxydantes, Nrf2) et vasoactifs (ET-1, eNOS, NO) dans un modèle de culture *in vitro* de cellules endothéliales cérébrales murines bEnd.3 exposées à une forte concentration en glucose mimant l'hyperglycémie. L'exploration des voies de signalisation clés pouvant être impliquées dans la dysfonction endothéliale a été réalisée (NFκB, AMPK).
- La deuxième action concernait l'étude des effets des extraits végétaux riches en polyphénols et de leurs composés majoritaires sur des marqueurs de l'état inflammatoire (NFκB, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, COX-2, iNOS) et de la perméabilité endothéliale (test FITC-Dextran) de cellules endothéliales cérébrales bEnd3 en condition d'hyperglycémie. La production de molécules impliquées dans le chimiotactisme et l'adhésion des monocytes (MCP-1, E-sélectine) et leur transmigration endothéliale ont été évaluées. L'impact de l'hyperglycémie et des polyphénols sur des marqueurs d'intégrité de la barrière endothéliale a été déterminé par l'analyse de la production des protéines des jonctions serrées (occludine, claudin-5, ZO1, ZO-2). De plus, une évaluation de l'implication mécanistique du facteur PPARγ a été menée. De manière innovante, la captation des polyphénols par les cellules endothéliales cérébrales a été mesurée pour mieux comprendre leur degré d'accessibilité cellulaire et leurs effets biologiques relevés, via l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ciblant les deux principaux transporteurs d'efflux P-gp et BCRP.
- La troisième action avait pour objectif de déterminer en condition *in vivo* les effets protecteurs de l'extrait riche en polyphénols d'*Antirhea borbonica* et de l'acide caféique chez (i) un modèle de souris exposées à une hyperglycémie aiguë

et (ii) un modèle de souris rendues obèses et diabétiques par un régime riche en graisses induisant une insulino-résistance et une hyperglycémie chronique. Puis, ces modèles animaux ont été exposés à une ischémie cérébrale-reperfusion par occlusion de l'artère cérébrale moyenne visant à mimer un AVC expérimental. Des marqueurs du profil métabolique (adiposité, glycémie, insuliniémie, lipidémie), du statut redox (SOD, catalase, GPx, Nrf2, PPAR γ) et de l'état inflammatoire (CRP, IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α , leptine, adiponectine) ont été évalués aux niveaux systémique et tissulaire. Le volume de l'infarctus cérébral, la transformation hémorragique (taux cérébral d'hémoglobine) ainsi que des marqueurs de l'altération de la BHE et de la neuroinflammation ont été explorés (cytokines, S100 β , VE-cadhérine, ZO-1, GFAP, MPO). De manière importante, une évaluation des taux cérébraux et plasmatiques de polyphénols et de métabolites associés a été réalisée.

IV. Approche expérimentale

1. Méthodologie globale

Pour répondre à l'objectif du travail de thèse, notre approche méthodologique incluait trois étapes.

La première étape a été de sélectionner quatre plantes médicinales réunionnaises largement utilisées pour des propriétés anti-diabétiques, à savoir *Antirhea borbonica*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa* et *Terminalia bentzoe*. Ces plantes ont été collectées à La Réunion sur des sites géolocalisés par GPS à la saison adaptée pour leur cueillette, par des botanistes de l'Université de La Réunion qui ont également assuré l'identification botanique des espèces avec attribution d'un numéro de voucher et enregistrement à l'Herbier de l'Université de La Réunion. Une déclaration au Protocole de Nagoya a été réalisée auprès du Ministère de la Transition Ecologique (ABSCH-IRCC-FR-252879-1). Des extractions hydro-acétoniques (70% acétone/eau, v/v) ont ensuite été réalisées à partir de broyats de feuilles séchées de ces plantes. Les quatre extraits végétaux obtenus ont été analysés par UPLC-MS-MS dans le but d'identifier les polyphénols présents dans chaque extrait. Un test Folin-Ciocalteu a été effectué afin de déterminer la teneur en polyphénols totaux des extraits de plantes en g équivalent acide gallique (GAE)/100 g de poudre végétale. A partir de cette analyse UPLC-MS-MS, nous avons sélectionné quatre polyphénols standards de référence incluant l'acide caféique, l'acide chlorogénique, l'acide gallique et la quercétine, détectés comme polyphénols majoritaires de ces plantes. Finalement, les effets des quatre extraits de plantes médicinales et des quatre polyphénols de référence ont été évalués *in vitro*. Le **Tableau 3** suivant résume les principales informations concernant les plantes médicinales et les composés phénoliques de référence sélectionnés dans cette étude. Leurs propriétés antioxydantes *in vitro* ont été explorées par un test biochimique de routine appelé test DPPH visant à mesurer leurs activités anti-radicalaires et réductrices vis-à-vis du radical DDPH.

La deuxième étape a été d'explorer les effets des polyphénols extraits des plantes médicinales (10 μ M GAE) et des polyphénols de référence (10 μ M) sur des cellules endothéliales cérébrales murines bEnd3 exposées à une forte concentration en glucose mimant une condition d'hyperglycémie (33 mM de glucose soit 6 g/L) (**Figure 59**).

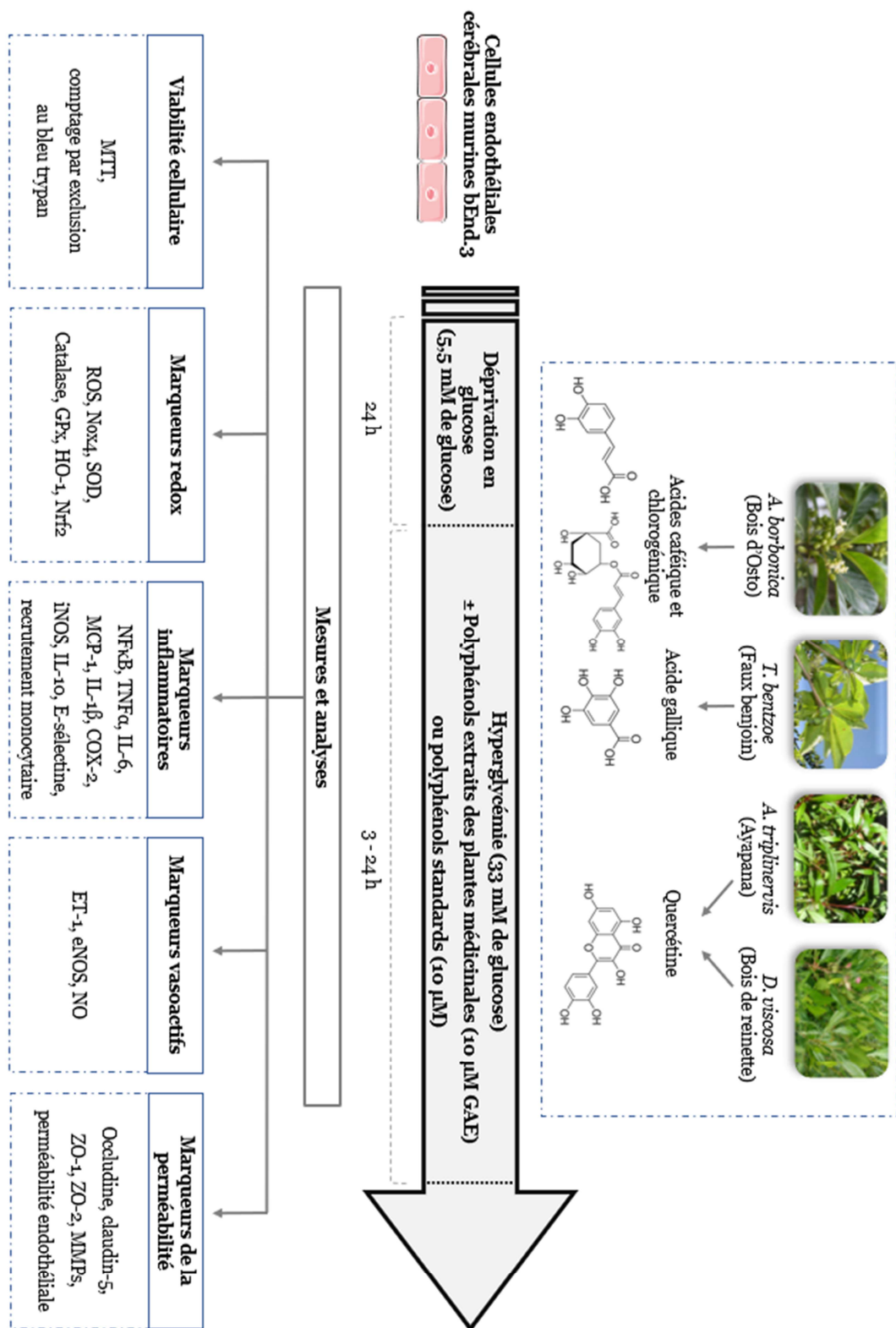


Figure 59 : Approche expérimentale globale réalisée *in vitro* sur les cellules endothéliales cérébrales bEnd3 en condition d'hyperglycémie.

Cette étape visait à évaluer l'impact de l'hyperglycémie en présence ou non de polyphénol, sur :

- la viabilité cellulaire : par les tests MTT et d'exclusion du Bleu Trypan ;
- des marqueurs redox : avec la mesure des niveaux intracellulaires de ROS (test DCFH-DA), l'évaluation de l'expression des gènes codant pour des enzymes redox (Nox4, Cu/ZnSOD, catalase, GPx, HO-1, Nrf2 par RT-qPCR), le suivi de l'activité enzymatique de la SOD (Cu/ZnSOD, MnSOD, TotalSOD par méthode colorimétrique) et l'étude des voies de signalisation impliquées dans la réponse métabolique et inflammatoire (NFκB et AMPK) ;
- des marqueurs de la réponse inflammatoire : à travers l'étude de l'activité transcriptionnelle de NFκB (modèle de cellules transfectées bEnd3-blue et mesure de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline sécrétée dont le gène rapporteur est sous contrôle de NFκB), de médiateurs inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNFα, MCP-1, COX2, iNOS, IL-10 par RT-qPCR et ELISA), des molécules d'adhésion (E-sélectine par RT-qPCR), de l'adhésion des monocytes (THP-1) et de leur transmigration endothéliale ;
- des marqueurs de la fonctionnalité endothéliale : via la mesure des niveaux intracellulaires de NO (test DAF-FM) et des protéines impliquées dans la vasodilatation et la vasoconstriction (eNOS, ET-1 par RT-qPCR) ;
- des marqueurs de la perméabilité endothéliale : avec l'étude des jonctions serrées (occludine, claudine-5, ZO-1, ZO-2 par RT-qPCR) et de la perméabilité endothéliale (test FITC-Dextran).

La dernière étape visait à compléter les expérimentations réalisées *in vitro* sur les cellules endothéliales cérébrales murines bEnd3 par une étude *in vivo* sur des modèles de souris exposées soit à une hyperglycémie aiguë (**Figure 60**) soit à une hyperglycémie chronique (**Figure 61**) liée à une obésité et insulino-résistance, et soumis à un AVC expérimental.

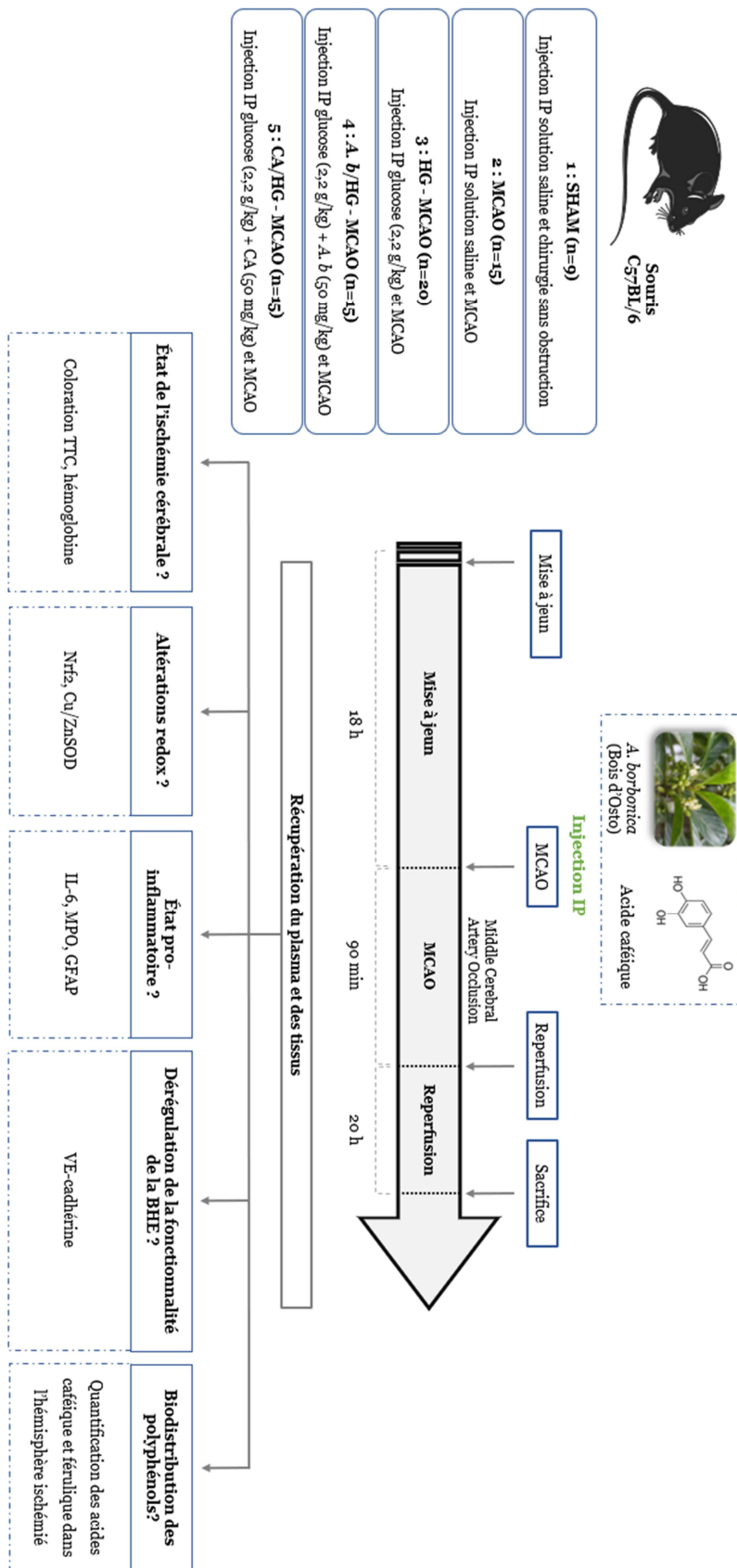


Figure 60 : Approche expérimentale globale réalisée *in vivo* sur un modèle d'ischémie-reperfusion de souris en condition d'hyperglycémie aiguë.

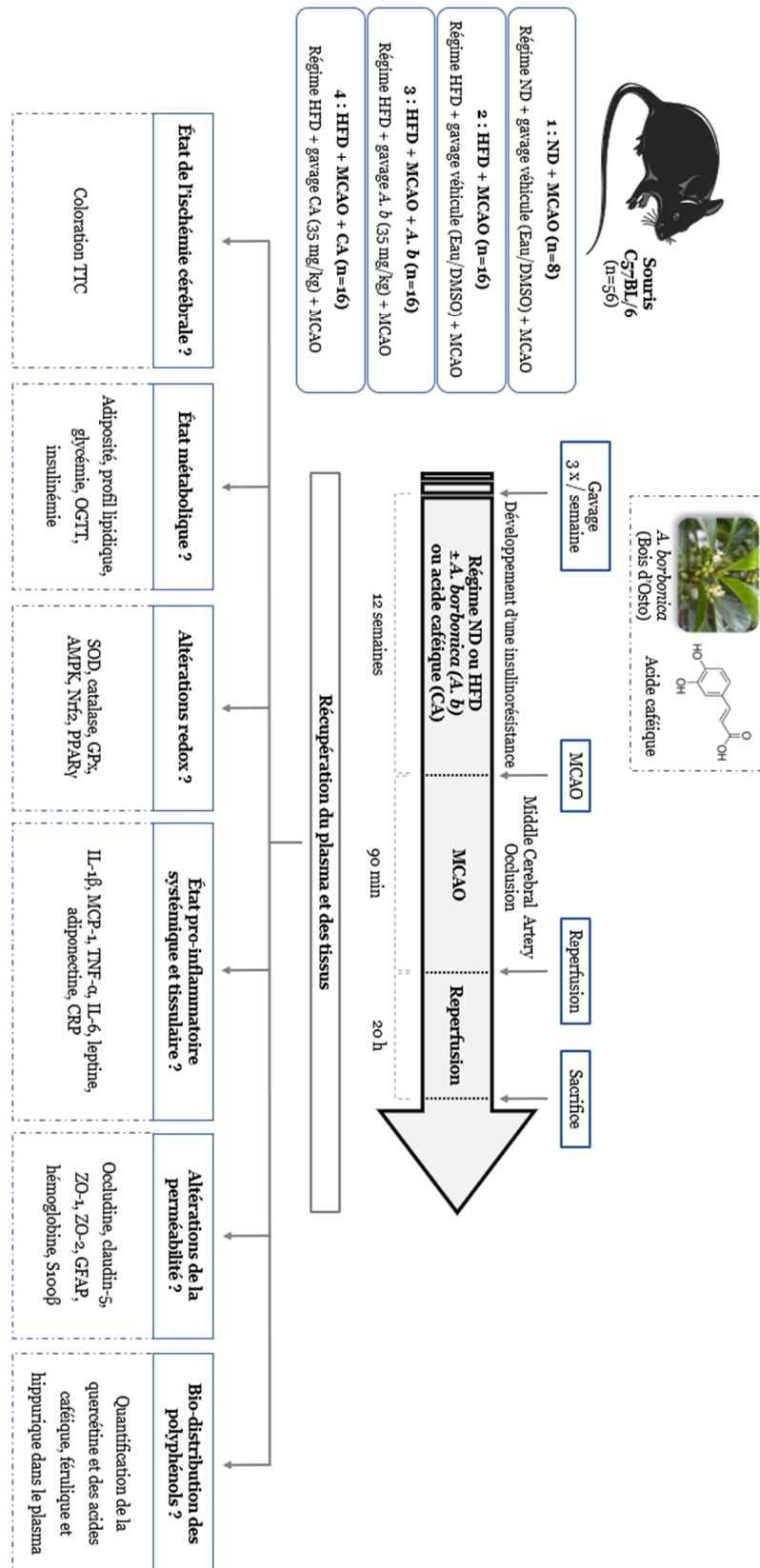




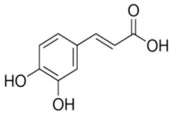
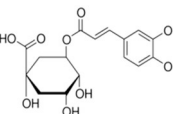
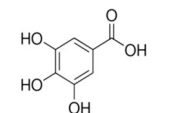
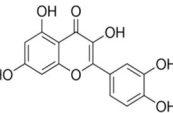


Figure 61 : Approche expérimentale globale réalisée *in vivo* sur un modèle d'ischémie-reperfusion de souris en condition d'hyperglycémie chronique.

En effet, nous avons évalué d'une part l'effet d'une hyperglycémie aiguë en présence ou non de polyphénols sur les complications cérébrovasculaires d'un AVC expérimental induit par occlusion de l'artère cérébrale moyenne, via la technique du MCAO. Cette technique consiste à provoquer une occlusion de l'artère cérébrale moyenne durant 90 min avant une étape de reperfusion de 20 h, exécutée selon la méthode de Couret et al., (Couret, Bourane et al., 2018) développée au laboratoire. Ici, les polyphénols extraits de la plante *A. borbonica* ou l'acide caféique utilisé comme composé phénolique de référence (50 mg/kg) ont été coadministrés avec le glucose (2,2 g/kg) par voie intrapéritonéale, 15 minutes avant l'induction de l'AVC. D'autre part, nous avons déterminé l'impact d'une hyperglycémie chronique associée à une insulino-résistance et une obésité induite lors par un régime riche en graisses (45% de graisses), en présence ou non de polyphénols. Ici, les polyphénols extraits de la plante *A. borbonica* ou l'acide caféique ont été administrés par gavage (35 mg/kg) 3 fois par semaine (lundi, mardi et mercredi) chez des souris C57BL/6 recevant le régime riche en graisses (5 g/j/souris) pendant 12 semaines. A la fin de ces 12 semaines, un AVC expérimental a été induit par la technique MCAO. Nous avons évalué l'impact de l'hyperglycémie et des polyphénols sur le volume de l'infarctus cérébral (coloration TTC), le score neurologique, la transformation hémorragique (taux cérébral d'hémoglobine, ELISA), des marqueurs métaboliques (adiposité par mesure du poids total et des tissus adipeux ; glycémie, insulinoémie, lipidémie par test colorimétrique), des marqueurs du statut redox (SOD, catalase, GPx, Nrf2, PPAR γ par western-blot, test enzymatique) et inflammatoire (CRP, IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α , leptine, adiponectine par ELISA), des marqueurs de l'altération de la BHE et de la neuroinflammation (S100 β , VE-cadhérine, claudin-5, ZO-1, GFAP, Iba-1, MPO par ELISA, immunohistochimie). Enfin, la biodisponibilité des polyphénols à l'échelle cérébrale et plasmatique a été déterminée par analyse UPLC-MS-MS.

Tableau 3 : Description des extraits de plantes médicinales et des polyphénols de référence étudiés.

Plantes	Nom	Famille	Lieu de récolte	Numéro voucher
	<i>Antirhea borbonica</i> (Bois d'osto)	Rubiaceae	Mare Longue	RUN052-F
	<i>Ayapana triplinervis</i> (Ayapana)	Astéracée	Plaine des Palmistes	TCN-P061
	<i>Terminalia bentzoe</i> (Faux benjoin)	Combrétacée	Mare Longue	TCN-P009
	<i>Dodonaea viscosa</i> (Bois de reinette ou bois d'arnette)	Sapindacée	Langevin	TCN-P028

Polyphénols de référence	Nom	Famille	Sous-famille
	Acide caféique	Acides phénoliques	Acides hydroxycinnamiques
	Acide chlorogénique	Acides phénoliques	Acides hydroxycinnamiques
	Acide gallique	Acides phénoliques	Acides hydroxybenzoïques
	Quercétine	Flavonoïdes	Flavonols

2. Modèles d'étude

2.1. La lignée cellulaire bEnd3

Les cellules bEnd3 sont des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales murines adhérentes. Ces cellules ont été obtenues de l'ATCC (American Type Culture Collections) (**Figure 62**).

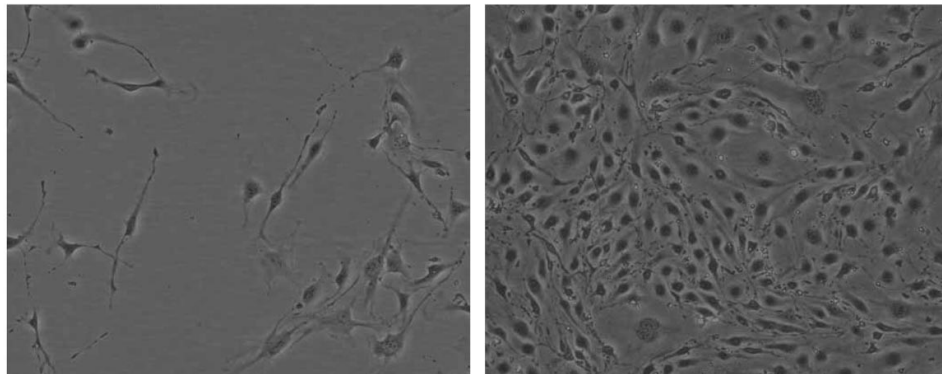


Figure 62 : Photographie de cellules bEnd3 à faible et forte densités observées au microscope électronique.

(ATCC)

Elles sont issues d'un angiome isolé de l'endothélium vasculaire sanguin prélevé au niveau du cortex cérébral de souris BALB/c de 6 semaines. Une fois isolées, les cellules ont été immortalisées et transformées par transfection du rétrovirus NTKm, un vecteur exprimant l'antigène T moyen du polyomavirus. La nature endothéliale de ces cellules a ensuite été confirmée par l'étude de l'expression du facteur endothélial von Willebrand et la mesure d'absorption de lipoprotéines de basses densité marquées par fluorescence. Les cellules bEnd3 sont des cellules simples et pratiques à utiliser. En effet, il est recommandé de changer le milieu de culture tous les 2 à 3 jours et de passer les cellules jusqu'au passage 30 maximum. Selon l'ATCC, ces cellules sont idéales pour étudier les molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1) et les sélectines (E-sélectine). Les bEnd3 possèdent une forme proche de celles du fibroblaste et prolifèrent en formant plusieurs amas de cellules reliés entre eux par de longs embranchements. Elles se doublent toutes les 21 heures environ jusqu'à atteindre la phase de confluence

caractérisée par un tapis cellulaire en monocouche formant une barrière endothéliale étanche. Cette lignée cellulaire possède de nombreux avantages, et notamment son coût en termes de matériels utilisés en routine pour les entretenir. En effet, le « coating » de flasques ou de plaques n'est pas nécessaire pour la prolifération des bEnd3, et elles poussent dans du milieu DMEM standard complet. Il est important de notifier qu'une fois la monocouche cellulaire formée à l'étape de confluence, les cellules vont avoir tendance à se détacher à l'étape de post-confluence et non de former plusieurs couches, ce qui permet de mimer une barrière endothéliale. De plus, les études de cytotoxicité réalisées sur un modèle cellulaire murin peuvent être nécessaires voir primordiales avant le lancement d'une expérience sur un modèle animal murin, comme dans notre approche expérimentale. A l'inverse, cette lignée cellulaire possède quelques limites. Tout d'abord le fait que ce soit un modèle *in vitro* simplifié ne nous permet pas de mimer la complexité vasculaire d'un organisme vivant. De plus, il s'agit d'une lignée cellulaire non humaine. Mais il est intéressant de relever qu'une étude fondamentale et mécanistique chez le modèle cellulaire murin peut ensuite être associée à des travaux sur un modèle *in vivo* de souris. Ces cellules permettent également de mimer une barrière endothéliale même s'il reste difficile de garantir leur confluence maximale rendant alors cette monocouche étanche. De plus, il est important de noter que lorsque les cellules atteignent le stade de post-confluence, elles ont tendance à se détacher. De ce fait, il est difficile de réaliser des temps de stimulation trop longs, généralement supérieurs à 72 heures.

2.2. La lignée cellulaire bEnd3-blue

Les cellules bEnd3-blue sont des cellules endothéliales cérébrales bEnd3 transfectées avec un plasmide pNiFty sécrétant de la phosphatase alcaline (SEAP), via l'utilisation de lipofectamine et une sélection par de la zéocine durant trois semaines. Le plasmide transfecté se compose de trois éléments principaux : un promoteur proximal du gène de la molécule d'adhésion entre cellule endothéliale et leucocyte (ELAM-1, E-sélectine), cinq sites de liaison spécifique répétés du facteur de transcription NFκB et le gène rapporteur de la SEAP. Les cellules bEnd3-blue sont cultivées dans du milieu DMEM complet contenant 200 µg/mL de zéocine dans le but de conserver la sélection des cellules transfectées. La SEAP est un rapporteur largement utilisé pour étudier l'activité ou l'expression génique du promoteur. L'activité de la SEAP peut être mesurée

rapidement et facilement dans les milieux de culture des cellules transfectées, par méthode colorimétrique. Dans le cadre de notre étude, nous avons essentiellement utilisé ce modèle cellulaire pour l'étude de l'activité transcriptionnelle de NFκB.

2.3. La lignée cellulaire THP-1

Les cellules THP-1 sont des cellules monocytaires humaines en suspension (**Figure 63**).

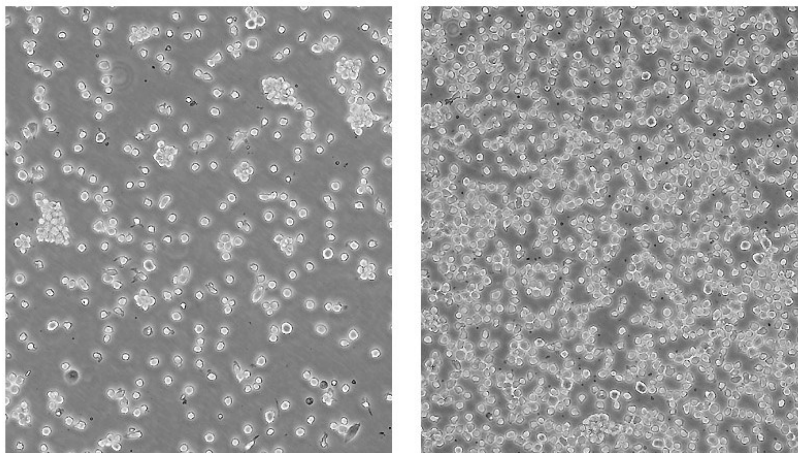


Figure 63 : Photographie de cellules THP-1 à faible et forte densité observées au microscope électronique

(ATCC)

Cette lignée cellulaire est issue d'une leucémie monocyttaire aiguë isolée à partir du sang d'un enfant d'un an. Ces cellules sont capables de phagocyter des érythrocytes sensibilisés et manquent d'immunoglobulines G de surface et cytoplasmiques. La différenciation en macrophages peut être induite avec l'ester de phorbol 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA). Ce sont des cellules de forme ronde et ovoïde et de couleur translucide. Étant donné que ce sont des cellules qui poussent grâce au contact entre elles, il est nécessaire d'ensemencer une densité importante de cellules. Il est recommandé de changer le milieu de culture tous les 2 à 3 jours, sachant qu'elles se doublent toutes les 26 à 28 heures. De plus, le coating des flasques et plaques n'est pas nécessaire pour leur prolifération car ce sont des cellules en suspension. Ce sont donc des cellules faciles d'utilisation et peu coûteuses en termes de matériels. Les THP-1 sont largement utilisées pour l'étude de la fonction des monocytes et des

macrophages dans l'inflammation, avec notamment la mesure de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 et l'évaluation de la production de molécules d'adhésion indispensables pour l'adhésion monocyttaire. La limite de ce modèle reste principalement le fait que ce soit une lignée de cellules immortalisées (*in vitro*), sensiblement différentes d'une lignée primaire de monocytes prélevés directement au niveau du sang périphérique humain (*ex vivo*) (Bosshart et al., 2016). De plus, étant des cellules en suspension, le changement de milieu dans la flasque engendre une perte de la moitié des cellules, d'où l'intérêt d'ensemencer une densité cellulaire importante.

2.4. Le modèle d'ischémie cérébrale chez la souris en condition hyperglycémique

Dans cette étude, nous avons eu recours à une technique précise d'ischémie cérébrale, le modèle MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion). Ce modèle consiste à induire une ischémie cérébrale expérimentale via une occlusion de l'artère cérébrale moyenne de la souris à l'aide d'un monofilament d'une taille précise. Il existe deux principaux types de MCAO qui peuvent être réalisés chez le modèle souris, la méthode Longa et la méthode Koizumi, exposées ci-dessous (**Figure 64**).

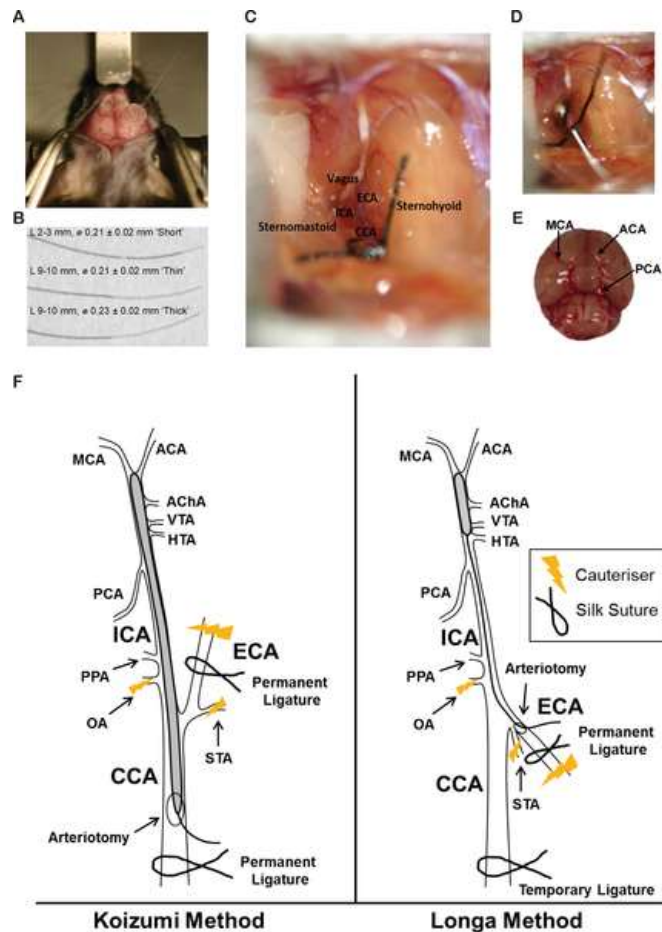


Figure 64 : Différentes méthodes de réalisation d'une occlusion de l'artère cérébrale moyenne.

- V. Placement of laser-Doppler probe at Antero-Posterior (AP) \sim -1.0 and Medio-Lateral (Najmanova, Pourova et al.,) \sim 3.0 from bregma, to measure blood flow in the territory supplied by the right MCA. **B.** Three different silicone coated filaments, coated for different lengths (L) and with different diameters of coating (\varnothing), used throughout this study. For simplicity, we have titled these 'Short', 'Thin' and 'Thick'. **C.** Surgical site during intraluminal filament MCAO identifying the External Carotid Artery (ECA), Internal Carotid Artery (ICA), Central Carotid Artery (CCA). **D.** Underside of mouse brain, identifying the Middle Cerebral Artery (Gehm, McAndrews,), Anterior Carotid Artery (ACA) and Posterior Cerebral Artery (PCA). **F.** Koizumi's method (left) and Longa's method (Morris, Wright et al.,) of the intraluminal filament MCAO (not to scale). Anterior choroidal artery (Ghoshal and Bhattacharyya), HTA, hypothalamic artery (Ahmad, Najmi et al.,), pterygopalatine artery (PPA), occipital artery (OA), superior thyroid artery (STA), ventral thalamic artery (VTA).

(Morris, Wright, 2016)

La principale différence entre ces deux méthodes est le cheminement du monofilament au niveau de l'artère de la souris comme démontré ci-dessus. Dans notre étude, le MCAO a été effectué selon la méthode Koizumi. Cette technique débute par une incision cutanée du côté droit de la base du cou pour pouvoir atteindre l'artère carotide commune, externe et interne. Un monofilament (siliconé 7.0 diamètre 0,22 mm pour souris 30-35 g) servant à l'obstruction, est introduit au niveau de la carotide commune et est poussé jusqu'à l'artère cérébrale moyenne au niveau de la boîte crânienne. Un nœud coulant est ensuite réalisé autour du monofilament afin de le maintenir en place, et l'ouverture chirurgicale sera refermée par suture cutanée. Après 90 minutes d'occlusion, le monofilament est retiré et la carotide commune est ligaturée. La durée de 90 min a été choisie selon les travaux de Couret et al., mais également dans le but d'avoir une zone ischémisée de taille suffisante et des lésions cérébrales importantes. La souris entre enfin dans la phase de reperfusion durant 20 h (Couret, Bourane, 2018). La recirculation au niveau du Polygone de Willis permettra alors une reperfusion du cerveau malgré la ligature de la carotide. C'est une méthode largement utilisée dans la littérature mais également pratiquée dans notre laboratoire (Couret, Bourane, 2018). La présence du Polygone de Willis chez la souris qui est également retrouvé chez l'homme ajoute du poids à l'utilisation de cette méthode.

De plus, elle permet d'effectuer soit une occlusion permanente, soit une occlusion transitoire, offrant alors la possibilité d'effectuer une reperfusion. Enfin, ce modèle permet de tester des thérapies de façon *in situ* via une injection directement au niveau l'artère carotide interne au moment de la reperfusion. Malgré l'efficacité de ce modèle à mimer un AVC chez la souris similaire à celui observé chez l'homme, certaines limites doivent tout de même être soulignées. Tout d'abord, la principale limite de cette technique réside dans la répétabilité de l'obstruction et de l'ischémie associée d'une souris à une autre. Dans notre étude, le poids variable des souris en fonction des régimes alimentaires et des traitements appliqués, demande une attention particulière sur la taille du monofilament à utiliser pour réaliser une parfaite obstruction et des gestes chirurgicaux minutieux effectués afin de ne pas perforer l'artère cérébrale.

2.5. Modèle d'hyperglycémie aiguë

Dans ce premier modèle, l'hyperglycémie est dite aiguë car elle est induite par une unique injection de glucose 30% pour une dose finale de 2,2 mg/kg chez la souris. Dans

l'étude de Arcambal *et al.*, l'injection de glucose s'est faite par voie intra-péritonéale afin d'induire une glycémie plasmatique de 300-400 mg/dL à la phase aiguë de l'AVC expérimental induit par la méthode MCAO (Arcambal, Taïlé et al., 2020). En effet, il est établi qu'une glycémie élevée au moment d'une ischémie cérébrale augmente de manière significative le risque de transformation hémorragique et ainsi d'aggraver les lésions cérébrales et l'état neurologique. Cependant, il est important de noter que les patients diabétiques et non diabétiques victimes d'un AVC sont affectés de la même façon par l'hyperglycémie aiguë. De ce fait, afin de mimer les dérégulations causées par une combinaison entre l'AVC et l'hyperglycémie chronique retrouvée chez un individu diabétique, il est préférable d'utiliser un modèle d'hyperglycémie chronique.

2.6. Modèle d'hyperglycémie chronique

Dans ce deuxième modèle, le but est d'évaluer les conséquences d'une hyperglycémie chronique. Il existe plusieurs modèles d'hyperglycémie chronique *in vivo* chez la souris. L'un des modèles consiste à induire un DT1 via une injection de streptozotocine qui va exercer une action cytotoxique spécifique sur les cellules bêta des îlots de Langerhans pancréatiques impliqués dans la production d'insuline. Un autre modèle est basé sur l'utilisation d'une lignée de souris *db/db* génétiquement modifiée où le récepteur hypothalamique de la leptine est modifié induisant ainsi une abolition de l'état de satiété et donc une hyperphagie. Cela va entraîner une obésité, une hyperglycémie et une hyperplasie compensatoire des cellules bêta des îlots de Langerhans rendant alors la souris obèse et caractérisée par un DT2. Il existe également des souris *ob/ob* présentant une mutation autosomique sur le gène codant pour la leptine (Zhang, Proenca, 1994). Enfin, un dernier modèle vise à induire un DT2 chez la souris via un régime HFD (High Fat Diet) correspondant à un régime riche en graisses. Il est établi qu'un régime riche en graisses (45-60% de l'apport calorique total) sur une période de 8 à 12 semaines induit une prise de poids importante et un état d'obésité associé à une hyperglycémie due à une insulino-résistance.

Dans notre étude, nous avons choisi d'induire un DT2 chez des souris C57BL/6 grâce à un régime riche en graisses (HFD). Le régime HFD utilisé dans cette étude est composé de 45% de graisses contre 10% de graisses pour le régime ND. Chez les souris nourries pendant 12 semaines par un régime HFD, il y a une obésité et une insulino-résistance qui sont significativement observées et qui ne sont pas notables chez

les souris soumises au régime ND. Cette étude avait deux principaux objectifs. Le premier objectif visait à mettre en avant l'effet du régime HFD riche en graisses et des polyphénols sur l'état métabolique des souris. Le deuxième objectif consistait à évaluer l'impact du régime obésogène et de la supplémentation en polyphénols sur les désordres causés par l'AVC expérimental. Du côté réglementaire, les projets d'étude et les protocoles expérimentaux associés ont été validés par le Comité éthique du CYROI n°114 de La Réunion, agréé par le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation en France. L'avantage de ce modèle réside principalement dans la possibilité de suivre la mise en place de l'insulinorésistance caractérisant l'état diabétique des souris à travers les mesures de glycémie et les tests oraux de tolérance au glucose. La pesée hebdomadaire des souris met également en évidence l'état d'obésité chez les souris nourries par un régime riche en graisses, via leur prise de poids quasiment doublée (50 g) par rapport à des souris nourries avec un régime ND (25 g). Ce modèle permet donc de mimer les dérégulations métaboliques associées à l'obésité. A l'inverse, le principal dommage de ce modèle est l'induction de complications ostéoarticulaires chez les souris soumises à un régime riche en graisses qui impactent sur leur état inflammatoire, mais qui miment en parallèle les mêmes complications observées chez le patient en situation d'obésité. De plus, son coût est élevé sur une durée d'expérimentation d'au moins 3 mois (coûts animalerie, régimes alimentaires, personnel qualifié pour gavage, test de tolérance au glucose notamment).

V. Résultats

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse peuvent être regroupés en quatre principales parties :

- 1) Évaluation des effets protecteurs des polyphénols sur des marqueurs redox, inflammatoires et vasoactifs des cellules endothéliales cérébrales en condition d'hyperglycémie. **(Résultat 1)**

- 2) Évaluation des effets protecteurs des polyphénols sur la réponse inflammatoire, l'adhésion monocyttaire et la transmigration endothéliale et sur la perméabilité des cellules endothéliales cérébrales en condition d'hyperglycémie. **(Résultat 2)**

- 3) Évaluation des effets protecteurs des polyphénols contre les complications cérébrovasculaires chez un modèle de souris en situation d'ischémie cérébrale-reperfusion en condition hyperglycémie aiguë. **(Résultat 3)**

- 4) Évaluation des effets protecteurs des polyphénols contre les complications cérébrovasculaires chez un modèle de souris en situation d'ischémie cérébrale-reperfusion en condition hyperglycémie chronique. **(Résultat 4)**

V.1. Résultat 1 : “Medicinal plant polyphenols attenuate oxidative stress and improve inflammatory and vasoactive markers in cerebral endothelial cells during hyperglycemic condition.”

(**Taïlé J.**, Arcambal A., Clerc P., Gauvin-Bialecki A., Gonthier M-P., *Antioxidants*, Vol. 9 (7), 573 ; 2020).

L’hyperglycémie associée au diabète de type 2 induit de nombreuses complications vasculaires, et notamment des désordres cérébrovasculaires comme l’AVC. En effet, l’hyperglycémie, qui est une conséquence d’un diabète non contrôlé, altère la fonctionnalité de la BHE en dérégulant l’homéostasie cérébrale et plus particulièrement les cellules endothéliales cérébrales qui constituent cette barrière. L’hyperglycémie jouerait un rôle important dans l’altération de la fonctionnalité des cellules endothéliales, en induisant un stress oxydatif, un état pro-inflammatoire et une perturbation de la sécrétion de molécules vasoactives. De manière intéressante, les polyphénols végétaux suscitent un intérêt croissant dans le traitement des complications vasculaires associées à la pathologie diabétique. Cependant, il n’existe que très peu de données sur l’impact de l’hyperglycémie et des polyphénols végétaux sur des cellules endothéliales cérébrales microvasculaires.

Notre première étude visait à évaluer les effets protecteurs des polyphénols sur des marqueurs redox, inflammatoires et vasoactifs des cellules endothéliales cérébrales murines bEnd3 en condition d’hyperglycémie.

Pour ce faire, les polyphénols ont été extraits des 4 plantes médicinales sélectionnées. La teneur en polyphénols totaux des extraits végétaux (test Folin-Ciocalteu) ainsi que leur pouvoir antioxydant (test DPPH), visant à mesurer la capacité des polyphénols à capter puis réduire le radical DPPH, ont été mesurés. Ensuite, les cellules endothéliales cérébrales murines bEnd3 ont été exposées à une forte concentration de glucose (33 mM ou 6 g/L) mimant une hyperglycémie, en présence ou non d’extraits riches en polyphénols ou de composés de référence (10 µM) pendant 3 à 24 h. Les polyphénols purs testés étaient la quercétine et les acides caféique, chlorogénique et gallique que nous avons détectés comme composés majoritaires des extraits végétaux par spectrométrie de masse. Puis, la viabilité cellulaire (comptage par exclusion au bleu

trypan, MTT), des marqueurs redox (niveau intracellulaire de ROS en présence ou non d'inhibiteurs d'AMPK et de NFκB, production et activité d'enzymes antioxydantes, production du facteur de transcription redox-dépendant Nrf2), inflammatoires (production de NFκB, sécrétion d'IL-6) et vasoactifs (niveau intracellulaire de NO, production de eNOS et ET-1) ont été évalués. Pour compléter ces données, nous avons considéré l'impact de la biodisponibilité et du métabolisme des polyphénols sur leur devenir et leurs effets biologiques au sein de l'organisme. De ce fait, nous avons également évalué l'effet de 6 métabolites circulants des polyphénols (10 μM) sur différents marqueurs clés testés (viabilité cellulaire, production de ROS, activation de NFκB, sécrétion d'IL-6, production de NO) sur des cellules endothéliales cérébrales bEnd3 en condition hyperglycémique.

Les résultats obtenus ont indiqué que les 4 extraits végétaux sont riches en polyphénols (0,6-8,1 g/100g). Les extraits de plantes et les composés phénoliques testés exercent des propriétés antioxydantes variables selon la nature de la plante et la structure chimique du polyphénol considéré. La viabilité cellulaire n'a pas été affectée dans nos conditions expérimentales, à la dose de 10 μM après 24 h de traitement. L'hyperglycémie a induit une élévation des niveaux intracellulaires de ROS, associée à une augmentation de l'expression des gènes codant pour l'enzyme Nox4 productrice de ROS. A l'inverse, l'hyperglycémie a diminué l'expression des gènes codant pour des enzymes antioxydantes incluant Cu/ZnSOD, MnSOD, catalase, HO-1 et le facteur de transcription Nrf2, alors que la GPx a été augmentée. De plus, nous avons noté une corrélation entre la surproduction de ROS médiée par l'hyperglycémie et l'activation de l'activité enzymatique de la Cu/ZnSOD. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques a mis en avant le rôle causal de la voie NFκB et le rôle protecteur de la voie AMPK dans la production de ROS. Par ailleurs, l'hyperglycémie a induit une réponse pro-inflammatoire des cellules endothéliales cérébrales, caractérisée par une élévation de l'expression génique de NFκB, l'induction de l'activité transcriptionnelle de NFκB et une exacerbation de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-6. Concernant l'évaluation de la fonctionnalité endothéliale, nous avons observé une réduction de l'expression du gène codant pour eNOS et de la production du facteur vasodilatateur NO, ainsi qu'une augmentation de l'expression du gène codant pour ET-1 connue pour exercer un effet vasoconstricteur. De manière intéressante, nos résultats ont montré que les polyphénols extraits des plantes médicinales, les polyphénols de référence ainsi

que les métabolites circulants de polyphénols exerçaient des effets protecteurs contre les altérations redox, inflammatoires et vasoactives causées par l'hyperglycémie dans les cellules endothéliales cérébrales.

En conclusion, cette étude a démontré l'impact délétère de l'hyperglycémie sur les marqueurs redox, inflammatoires et vasoactifs dans des cellules endothéliales cérébrales. Cette étude a également mis en avant les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des polyphénols qui sont capables d'atténuer les altérations médiées par l'hyperglycémie.



Article

Medicinal Plant Polyphenols Attenuate Oxidative Stress and Improve Inflammatory and Vasoactive Markers in Cerebral Endothelial Cells during Hyperglycemic Condition

Janice Taïlé¹, Angélique Arcambal¹, Patricia Clerc², Anne Gauvin-Bialecki² and Marie-Paule Gonthier^{1,*}

¹ Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien, INSERM, UMR 1188, Université de La Réunion, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, La Réunion, France; janice.taile@univ-reunion.fr (J.T.); angeliquearcambal@hotmail.fr (A.A.)

² Laboratoire de Chimie et de Biotechnologie des Produits Naturels, Université de La Réunion, UR 2212, 15 Avenue René Cassin CS 92003, 97744 Saint-Denis CEDEX 9, La Réunion, France; patricia.clerc@univ-reunion.fr (P.C.); anne.bialecki@univ-reunion.fr (A.G.-B.)

* Correspondence: marie-paule.gonthier@univ-reunion.fr; Tel.: +262-693-92-08-55

Received: 29 May 2020; Accepted: 30 June 2020; Published: 2 July 2020



Abstract: Blood-brain barrier endothelial cells are the main targets of diabetes-related hyperglycemia that alters endothelial functions and brain homeostasis. Hyperglycemia-mediated oxidative stress may play a causal role. This study evaluated the protective effects of characterized polyphenol-rich medicinal plant extracts on redox, inflammatory and vasoactive markers on murine bEnd3 cerebral endothelial cells exposed to high glucose concentration. The results show that hyperglycemic condition promoted oxidative stress through increased reactive oxygen species (ROS) levels, deregulated antioxidant superoxide dismutase (SOD) activity, and altered expression of genes encoding Cu/ZnSOD, MnSOD, catalase, glutathione peroxidase (GPx), heme oxygenase-1 (HO-1), NADPH oxidase 4 (Nox4), and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) redox factors. Cell preconditioning with inhibitors of signaling pathways highlights a causal role of nuclear factor kappa B (NFκB), while a protective action of AMP-activated protein kinase (AMPK) on redox changes. The hyperglycemic condition induced a pro-inflammatory response by elevating NFκB gene expression and interleukin-6 (IL-6) secretion, and deregulated the production of endothelin-1 (ET-1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and nitric oxide (NO) vasoactive markers. Importantly, polyphenolic extracts from *Antirhea borbonica*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa*, and *Terminalia bentzoe* French medicinal plants, counteracted high glucose deleterious effects by exhibiting antioxidant and anti-inflammatory properties. In an innovative way, quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids identified as predominant plant polyphenols, and six related circulating metabolites were found to exert similar benefits. Collectively, these findings demonstrate polyphenol protective action on cerebral endothelial cells during hyperglycemic condition.

Keywords: cerebral endothelial cells; hyperglycemia; oxidative stress; inflammation; antioxidant plant polyphenols

1. Introduction

The blood-brain barrier (BBB) is composed of microvascular endothelial cells that correspond to a monolayer of flat cells lining the interior surface of blood vessels. These endothelial cells exert important physiological functions in order to maintain the cerebral microenvironment and

participate in brain protection [1,2]. More particularly, endothelial cells produce a wide range of factors comprising vasodilators, like nitric oxide (NO) produced by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and vasoconstrictors, including endothelin-1 (ET-1) [3,4]. Such molecules are essential to regulate the blood pressure and to prevent the formation of aggregates in microvessels which promote stroke [5,6].

During type 2 diabetes, hyperglycemia may alter the endothelial functions, participating to BBB disruption and brain homeostasis loss [7–9]. Of note, oxidative stress plays a causal role in the deleterious effects of hyperglycemia on cerebral endothelial cells [6,10,11]. Oxidative stress is defined as an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the rate of their degradation by the endogenous antioxidant defense system, which is composed of various enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), and heme oxygenase-1 (HO-1) [12]. ROS overproduction has been associated with several molecular mechanisms, including an alteration of the mitochondrial electron transport chain, the formation of advanced glycation end products, and the activation of specific ROS-producing enzymes such as NADPH oxidase 4 (Nox4), known as the most abundant endothelial Nox isoform [13–16]. During hyperglycemia-mediated oxidative stress, high levels of ROS lead to endothelial dysfunctions by damaging DNA, proteins, lipids, and by deregulating NO production and the redox sensitive transcription factor, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), which regulates the expression of genes encoding redox enzymes [10,17–21]. Furthermore, high glucose-induced oxidative stress activates the nuclear translocation of the nuclear factor kappa B (NFκB) transcriptional factor that induces the production of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6) [22]. Conversely, hyperglycemia-caused redox changes may inhibit AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway, which exerts anti-inflammatory effects and acts as a key regulator of the endothelial function through induction of eNOS activity and NO vasodilator production [23,24].

There is still a lack of pharmacological strategies that aim to counteract oxidative stress and inflammation on cerebral endothelial cells during hyperglycemia. Interestingly, polyphenols constitute the most abundant antioxidants provided by the human diet through various fruits, vegetables, and medicinal plants [25–28]. More than 8000 molecules have been identified and classified in main chemical families, including flavonoids, phenolic acids, stilbenes, and lignans [27]. Polyphenols are characterized by the presence of one or several phenolic rings that contribute to their free radical-scavenging and reducing capacities [29,30] and their ability to improve oxidative stress-caused endothelial dysfunction during metabolic disorders, such as type 2 diabetes [31]. Noteworthy, the biological effects of polyphenols depend on their bioavailability as polyphenols are known to be poorly absorbed and extensively catabolized by the gut microflora. Polyphenol circulating metabolites may consist on microbial metabolites, like derivatives of phenylpropionic, phenylacetic, and benzoic acids, and compounds that are produced by both the microbial and tissular metabolism, such as ferulic acid originating from the catabolism of the phenolic acids chlorogenic and caffeic acids [32,33]. From 2012 to 2017, 22 medicinal plants from Réunion Island have been referred in the French Pharmacopeia. Antidiabetic properties were attributed to eight of them, despite the molecular mechanisms involved needing to be elucidated [34]. These medicinal plants include endemic species from the Indian Ocean area, such as *Antirhea borbonica*, *Dodonaea viscosa*, and *Terminalia bentzoe*, as well as exotic species, like *Ayapana triplinervis*. Even if some authors reported anti-inflammatory and antioxidant activities for plants of the same species and genus [35,36], few data exist regarding their possible benefits to reduce diabetes-related metabolic and vascular complications. Our previous studies demonstrated that polyphenolic extracts from medicinal plants, like *Antirhea borbonica* or *Curcuma longa* turmeric from Réunion Island, exert protective effects on adipose cells exposed to metabolic or bacterial stimuli inducing redox and inflammatory damages that are associated with insulin resistance markers [37–39]. Recently, we found that *Antirhea borbonica* polyphenols protect against hyperglycemia-mediated alterations in a mouse stroke model by reducing brain infarct volume and hemorrhagic transformation aggravated by hyperglycemia [40].

The present study aimed to evaluate the protective effects of characterized polyphenol-rich extracts from medicinal plants on redox, inflammatory, and vasoactive markers of cerebral endothelial cells that were exposed to hyperglycemic condition. For the first time, four medicinal plants from Réunion Island were selected in the same study for a comparative analysis of their effects on cerebral endothelial cells, based on their antidiabetic properties referenced in the French Pharmacopeia and their economic interest for innovative pharmacological developments, namely *Antirhea borbonica*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa*, and *Terminalia bentzoe*. Furthermore, we determined the impact of pure quercetin, caffeic, chlorogenic, and gallic acids detected as major medicinal plant polyphenols, and six polyphenols related circulating metabolites (ferulic, 3,4-dihydroxyphenylpropionic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, 3-hydroxyphenylacetic, 3-hydroxybenzoic, and hippuric acids) on cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition.

2. Materials and Methods

2.1. Extraction and Identification of Polyphenols from Medicinal Plant Extracts

A. borbonica, *A. triplinervis*, *D. viscosa*, and *T. bentzoe* medicinal plants were collected in Réunion Island (France). The botanical identification associated with voucher number of *A. borbonica* (Rubiaceae, RUN052-F), *A. triplinervis* (Asteraceae, TCN-P061), *D. viscosa* (Sapindaceae, TCN-P028), and *T. bentzoe* (Combretaceae, TCN-P009) plants was performed at the University of Réunion Island. After airflow drying at 45 °C, leaves were reduced to powder. A dissolution of each plant powder (2 g) in 10 mL of an aqueous acetic solution (70%, v/v, Sigma–Aldrich, St-Louis, MO, USA) was achieved. Subsequently, the mixture was incubated at 4 °C for 90 min, centrifuged at 1400× g at 4 °C for 20 min, and the supernatants containing polyphenols were stored at –80 °C until analysis. Ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis (UPLC-ESI-MS-MS, Agilent Technologies, Les Ulis, France) was performed to detect phytochemicals, in accordance with the previously published method [38]. The identification of compounds was based on their retention time, and the *m/z* ratio of their parent ions and fragments in negative or positive mode at 280 nm. The total polyphenol contents were determined by Folin–Ciocalteu assay, as we previously described [41]. Briefly, 25 µL of each plant extract were added to 125 µL of Folin–Ciocalteu’s reagent (Sigma–Aldrich, St-Louis, MO, USA) and 100 µL of sodium carbonate (Sigma–Aldrich, St-Louis, MO, USA) in a 96-well plate. Absorbance was measured at 760 nm (FLUOstar Optima, Bmg Labtech, Cambridge, UK) after an incubation for 5 min. at 54 °C, and then during 5 min. at 4 °C. A standard solution of gallic acid (Sigma–Aldrich, St-Louis, MO, USA) was used for calibration. The total polyphenol contents were expressed as g gallic acid equivalent (GAE)/100 g medicinal plant powder.

2.2. Evaluation of Free Radical-Scavenging and Reducing Capacities of Medicinal Plant Extracts

The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay was performed to assess the ability of polyphenol-rich plant extracts to exert free radical-scavenging and reducing capacities, according to the method previously described [41]. Briefly, 40 µL of each plant extract or a pure polyphenol (100 µM), namely quercetin, caffeic, chlorogenic, or gallic acids (Sigma–Aldrich, St-Louis, MO, USA), or vitamin C used as a positive control (100 µM) were placed in a 96-well plate. Subsequently, 200 µL of 0.25 mM DPPH diluted in methanol (Sigma–Aldrich, St-Louis, MO, USA) were added to each well. After an incubation at 25 °C for 25 min., the absorbance was measured at 517 nm (FLUOstar Optima, Bmg Labtech, Cambridge, UK). Reduced DPPH percentage was used in order to calculate the antioxidant capacity, by the following formula:

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

2.3. Endothelial Cell Culture

Murine bEnd3 cerebral endothelial cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC® CRL-2299™, Manassas, VA, USA) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 25 mM glucose, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 5 mM L-glutamine, 50 µU/mL penicillin, and 2 µg/mL streptomycin (Pan Biotech, Dutscher, Brumath, France). For the bEnd3-Blue cell line model, the bEnd3 cells were transfected with the plasmid pNiFty-secreted alkaline phosphatase (pNiFty2-SEAP, Invivogen, Toulouse, France) using lipofectamine 3000 (ThermoFischer Scientific, Les Ulis, France) and selection with Zeocin™ at 200 µg/mL (Invivogen, Toulouse, France) during three weeks, according to the previously published method [40]. pNiFty2-SEAP plasmid contains five specific NFκB repeated transcription factor binding sites, an endothelial cell-leukocyte adhesion molecule proximal promoter and a SEAP reporter gene. bEnd3-Blue cells were cultured in complete DMEM containing 200 µg/mL of Zeocin™. Cells were maintained in a humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C.

2.4. Evaluation of Cell Viability and Mitochondrial Metabolic Activity

The cells were seeded in a 24-well plate (7.5×10^4 cells/well) during 24 h. Subsequently, the medium was removed and cells treated with each plant extract (10 µM GAE), or with a pure polyphenol (quercetin, caffeic, chlorogenic, or gallic acids, 10 µM), or with a related circulating metabolite (ferulic, 3,4-dihydroxyphenylpropionic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, 3-hydroxyphenylacetic, 3-hydroxybenzoic, or hippuric acids, 10 µM, Sigma–Aldrich, St-Louis, MO, USA) during 24 h. Each polyphenolic extract or pure compound was diluted in complete DMEM to maintain cells in the culture medium recommended by ATCC. Next, cell culture medium was eliminated, phosphate buffer saline (PBS) was used to wash cells once, and trypsin-EDTA (Pan Biotech, Dutscher, Brumath, France) was added to detach cells. After centrifugation ($500 \times g$, 4 min., 25 °C), cell staining was performed with Trypan blue solution (Sigma–Aldrich, St-Louis, MO, USA) and cell counting achieved in a Malassez chamber.

The mitochondrial metabolic activity of cells was measured by using the 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, according to the method previously described [41]. Briefly, the cells were seeded in a 96-well plate (1×10^4 cells/well) during 24 h. Subsequently, the medium was removed and cells were treated with each plant extract (10 µM GAE), or with a pure polyphenol (quercetin, caffeic, chlorogenic or gallic acids, 10 µM), or with a related circulating metabolite (ferulic, 3,4-dihydroxyphenylpropionic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, 3-hydroxyphenylacetic, 3-hydroxybenzoic, or hippuric acids, 10 µM) for 24 h. Five hours before the end of the experiment, 20 µL of 5 mg/mL MTT reagent (Sigma–Aldrich, St-Louis, MO, USA) diluted in PBS were added in each well. After centrifugation at $500 \times g$ for 4 min. at 25 °C, the medium was removed and 200 µL of dimethylsulfoxide (DMSO) were added in each well, in order to dissolve formazan crystals originating from MTT mitochondrial metabolism in living cells. Absorbance was measured at 560 nm (TECAN, Männedorf, Switzerland).

2.5. Measurement of Intracellular ROS Levels

The ROS levels were measured using the fluorogenic probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay, in accordance with the method previously reported [41]. Cells were seeded in a 96-well black plate (1.8×10^4 cells/well) in DMEM containing 5.5 mM glucose (normoglycemic condition) for 24 h. Subsequently, the medium was removed, cells rinsed twice with PBS, and 100 µL of PBS containing 10 µM of DCFH-DA (Sigma–Aldrich, St-Louis, MO, USA) added in each well. After incubation in a humidified atmosphere (5% CO₂, 37 °C,) for 45 min., PBS containing DCFH-DA was removed and cells were treated with each plant extract (10 µM GAE), or with a pure polyphenol (quercetin, caffeic, chlorogenic, or gallic acids, 10 µM), or with a related circulating metabolite (ferulic, 3,4-dihydroxyphenylpropionic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, 3-hydroxyphenylacetic, 3-hydroxybenzoic or hippuric acids, 10 µM) in hyperglycemic condition (33 mM glucose) or in normoglycemic condition

(5.5 mM glucose). After 3 h, fluorescence measurement was performed at the excitation and emission wavelengths of 492 nm and 520 nm, respectively (FLUOstar Optima, Bmg Labtech, Cambridge, UK). For ROS level determination in cells that were exposed to specific inhibitors of intracellular signaling pathways, cells were pre-incubated with 10 μ M of inhibitors targeting NF κ B (JSH-23) or AMPK (Compound C) in a humidified atmosphere (5% of CO₂, 37 °C) for 1 h. Then, as described above, cells were treated with PBS containing DCFH-DA for 45 min. before exposition to each plant extract or pure polyphenol in hyperglycemic condition for 3 h. Next, fluorescence measurement was conducted at the excitation and emission wavelengths of 492 nm and 520 nm, respectively (FLUOstar Optima, Bmg Labtech, Cambridge, UK).

2.6. Determination of Antioxidant SOD Activity

The cells were seeded in a six-well plate (3.5×10^5 cell/well) in DMEM containing 5.5 mM glucose (normoglycemic condition) during 24 h. Subsequently, the medium was removed and cells were treated with each plant extract (10 μ M GAE) or a pure polyphenol, namely caffeic acid, chlorogenic acid, gallic acid, or quercetin (10 μ M) in hyperglycemic condition (33 mM glucose), or in normoglycemic condition (5.5 mM glucose) for 3 h. Next, the medium was removed and cells were washed with PBS, scrapped, and pooled in a phosphate buffer containing KH₂PO₄ (100 mM) and DTT (1 mM), pH 7.4. Next, a freeze-thaw step consisting on four cycles of fast freezing in liquid nitrogen and subsequent thawing in 37 °C water bath was done in order to lyse cells, as we reported previously [42]. After centrifugation at 500 \times g for 4 min. at 25 °C, supernatants containing proteins were collected. The protein contents were determined using the bicinchoninic acid assay (BCA) [43] and a calibration curve built with standard bovine serum albumin. The SOD activity of protein lysates were measured according to the method that was described by Bitar et al. [44], by calculating the reduction of acetylated cytochrome C by superoxide radicals produced by the xanthine/xanthine oxidase system. Total SOD activity was measured in a reagent buffer at pH 7.8 with xanthine oxidase (1–2 U/mg protein), xanthine (0.5 mM), cytochrome C (0.2 mM), KH₂PO₄ (50 mM), and EDTA (2 mM). MnSOD activity was determined similarly, after the addition of NaCN (1 mM) that leads to a specific inhibition of Cu/ZnSOD activity. Enzymatic activities were measured every 5 s during 3 min. at 25 °C, at a wavelength of 550 nm (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Cambridge, UK), and they were expressed as U/g protein.

2.7. Measurement of Intracellular NO Levels

The 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM) diacetate was used to determine intracellular NO levels, according to the method previously described [42]. Briefly, the cells were seeded in a 96-well black plate (1.8×10^4 cells/well) in DMEM containing 5.5 mM glucose (normoglycemic condition) for 24 h. Subsequently, the medium was removed and cells treated with each plant extract (10 μ M GAE), or with a pure polyphenol (quercetin, caffeic, chlorogenic, or gallic acids, 10 μ M), or with a related circulating metabolite (ferulic, 3,4-dihydroxyphenylpropionic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, 3-hydroxyphenylacetic, 3-hydroxybenzoic, or hippuric acids, 10 μ M) in hyperglycemic condition (33 mM glucose) or in normoglycemic condition (5.5 mM glucose) for 3 h. Next, the medium was removed, cells were washed once with PBS and 100 μ L of PBS containing 5 μ M of DAF-FM (Sigma–Aldrich, St-Louis, MO, USA) added in each well. After incubation in a humidified atmosphere (5% CO₂, 37 °C,) for 45 min., PBS containing DAF-FM was removed, and cells were treated with 100 μ L of insulin (1 μ g/mL, Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) for 2 h. Fluorescence measurement was performed at the excitation and emission wavelengths of 492 nm and 520 nm, respectively (FLUOstar Optima, Bmg Labtech, Cambridge, UK).

2.8. Evaluation of NF κ B/SEAP Activity

Murine bEnd3-Blue cells expressing NF κ B/SEAP reporter gene were cultured in a 96-well black plate (1.8×10^4 cells/well) in DMEM containing 5.5 mM of glucose (normoglycemic condition) for 24 h. The day after, the medium was removed and cells were treated for 3 h with a polyphenol

related circulating metabolite (ferulic, 3,4-dihydroxyphenylpropionic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, 3-hydroxyphenylacetic, 3-hydroxybenzoic or hippuric acids, 10 μ M) in hyperglycemic condition (33 mM glucose) or in normoglycemic condition (5.5 mM glucose). NF κ B/SEAP activity was evaluated with Quanti-Blue assay (Invivogen, Toulouse, France) and absorbance was measured at 620–655 nm (FLUOstar Omega, Bmg Labtech, Cambridge, UK).

2.9. Quantification of Cytokine Secretion

The cells were seeded in a six-well plate (3.5×10^5 cells/well) in DMEM containing 5.5 mM glucose (normoglycemic condition) for 24 h. Subsequently, the medium was removed and cells treated with each plant extract (10 μ M GAE), or with a pure polyphenol (quercetin, caffeic, chlorogenic or gallic acids, 10 μ M), or with a related circulating metabolite (ferulic, 3,4-dihydroxyphenylpropionic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, 3-hydroxyphenylacetic, 3-hydroxybenzoic or hippuric acids, 10 μ M) in hyperglycemic condition (33 mM glucose), or in normoglycemic condition (5.5 mM glucose) for 8 h. Next, cell culture media were collected and analyzed using Mouse IL-6 ELISA kit (eBioscience, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France). For cellular protein extraction, 700 μ L of PBS were added to each well. After scrapping, cells were collected and centrifuged at $500 \times g$ for 4 min. at 25 $^{\circ}$ C. Supernatants were removed and 200 μ L of lysis buffer were added (Tris 25mM pH 8.3, KCl 10 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, protease inhibitors 1 X). After resuspension of cell pellet in lysis buffer, a centrifugation at $500 \times g$ for 4 min. at 25 $^{\circ}$ C was performed and supernatants containing proteins were collected. Total cellular protein contents were determined by BCA assay and absolute values of IL-6 were normalized to these contents.

2.10. Evaluation of Gene Expression

The cells were seeded in a six-well plate (3.5×10^5 cells/ well) in DMEM containing 5.5 mM of glucose (normoglycemic condition) during 24 h. Subsequently, the medium was removed and cells treated with each plant extract (10 μ M GAE) or a pure polyphenol, namely caffeic acid, chlorogenic acid, gallic acid or quercetin (10 μ M) in hyperglycemic condition (33 mM glucose), or in normoglycemic condition (5.5 mM glucose) for 6 h. Next, total RNA was isolated with TRIzolTM (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France). Next, 4 μ g of RNA were reverse-transcribed (RT) using Random hexamer primers (Eurogentec, Liège, Belgium) with SuperscriptTM II (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France). The quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was achieved by using fast SYBR greenTM master Mix (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France). The relative expression of genes coding for redox factors (catalase, Cu/ZnSOD, GPx, HO-1, MnSOD, Nox4, and Nrf2), the pro-inflammatory mediator NF κ B and vasoactive markers (eNOS, ET-1) was normalized to the expression rate of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene. Table 1 reports primer sequences. The results were obtained through analysis by 7500 system SDS software (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France).

2.11. Statistical Analysis

Data were expressed as means \pm SEM of three independent experiments (three cellular passages). Statistical analysis was conducted through one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's multiple comparison test, and the Pearson linear correlation was established when appropriate by the program Graph-Pad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Statistically significant differences were considered for a p value < 0.05 .

Table 1. Primers used for reverse-transcribed-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis.

Mouse Gene	Sequence
Catalase	Forward CCT-CCT-CGT-TCA-GGA-TGT-GGT-T Reverse CGA-GGG-TCA-CGA-ACT-GTG-TCA-G
Cu/Zn Superoxide dismutase (Cu/ZnSOD)	Forward GCA-GGG-AAC-CAT-CCA-CTT Reverse TAC-AAC-CTC-TGG-ACC-CGT
endothelial Nitric oxide synthase (eNOS)	Forward CTG-TGG-TCT-GGT-GCT-GGT-C Reverse TGG-GGC-AAC-TTG-AAG-AGT-GTG
Endothelin-1 (ET-1)	Forward CCC-TTT-GCA-GAA-TGG-ATT-AT Reverse CTG-TAG-TCA-ATG-TGC-TCG-GT
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Forward TTC-ACC-ACC-ATG-GAG-AAG-GC Reverse GGC-ATG-GAC-TGT-GGT-CAT-GA
Glutathione peroxidase (GPx)	Forward TGC-TCA-TTG-AGA-ATG-TCG-CGT-CTC Reverse AGG-CAT-TCC-GCA-GGA-AGG-TAA-AGA
Heme oxygenase-1 (HO-1)	Forward GGT-CAT-GGC-TTC-CTT-GTA-C Reverse AGT-GAG-GCC-CAT-ACC-AGA-AG
MnSOD	Forward ATG-TTG-TGT-CGG-GCG-GCG Reverse AGG-TAG-TAA-GCG-TGC-TCC-CAC-ACG
Nuclear factor kappa B (NFκB)	Forward GTG-ATG-GGC-CTT-CAC-ACA-CA Reverse CAT-TTG-AAC-ACT-GCT-TTG-ACT
NADPH oxidase 4 (Nox4)	Forward GAT-CAC-AGA-AGG-TCC-CTA-GCA-G Reverse GTT-GAG-GGC-ATT-CAC-CAA-GT
Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)	Forward TTG-GCA-GAG-ACA-TTC-CCA-T Reverse GCT-GCC-ACC-GTC-ACT-GGG

3. Results

3.1. Characterization of Polyphenols Extracted from Medicinal Plants and Evaluation of Their Free Radical-Scavenging and Reducing Activities

UPLC-ESI-MS-MS analysis (Figure 1A) shows that polyphenols detected in *A. borbonica* plant extract were mainly phenolic acids, including chlorogenic and dicaffeoylquinic acids, which are derivatives of caffeic acid, and quercetin and kaempferol glycosides from the flavonoid family (Table 2). Polyphenols that were depicted in *A. triplinervis* plant extract were the phenolic acids protocatechuic, isoferulic, and caffeic acids (Figure 1B). Of note, UPLC-ESI-MS-MS analysis also led to identifying both ayapin and ayapanin, known as specific coumarin derivatives in *A. triplinervis* plant. Regarding *T. bentzoe* plant extract, different polyphenols that were derived from gallic and ellagic acids were detected, such as the ellagitannins punicalin and punicalagin (Figure 1C). *D. viscosa* plant extract was characterized by the presence of different flavonoids, including the methylated form of quercetin called isorhamnetin, a trimethoxyflavone and procyanidins (Figure 1D). Total polyphenol contents ranged from 0.5 to 8.1 g GAE/100 g plant, depending on the medicinal plant extract considered, as reported in Table 3. *T. bentzoe* plant was identified as the richest source of polyphenols, followed by both *A. borbonica* and *D. viscosa* plants exhibiting similar ranges of total polyphenol quantities that were 2.5-fold lower than that of *T. bentzoe* plant. In comparison, the total polyphenol content of *A. triplinervis* plant was six- to 14-fold lower than those of other medicinal plants. To evaluate whether the polyphenols present in plant extracts exhibit free-radical scavenging and reducing capacities, DPPH assay was performed using vitamin C as a positive control. Given that UPLC-ESI-MS-MS analysis led to identify caffeic acid in both *A. borbonica* and *A. triplinervis* plants, chlorogenic acid in *A. borbonica* plant, gallic acid in *T. bentzoe* plant, and quercetin in *A. borbonica*, *A. triplinervis*, and *D. viscosa* plants, the corresponding standard polyphenols were also assessed for DPPH assay. The data show that all polyphenol-rich plant extracts were able to scavenge and reduce DPPH radical (Table 3). Polyphenol-rich extracts from *T. bentzoe*, *D. viscosa*, and *A. borbonica* exerted the most pronounced antioxidant activity as compared to that of vitamin C. Interestingly, the standard polyphenols quercetin, caffeic, chlorogenic, and gallic

acids exhibited radical-scavenging and reducing capacities, which suggested their possible contribution to the antioxidant properties of the medicinal plants.

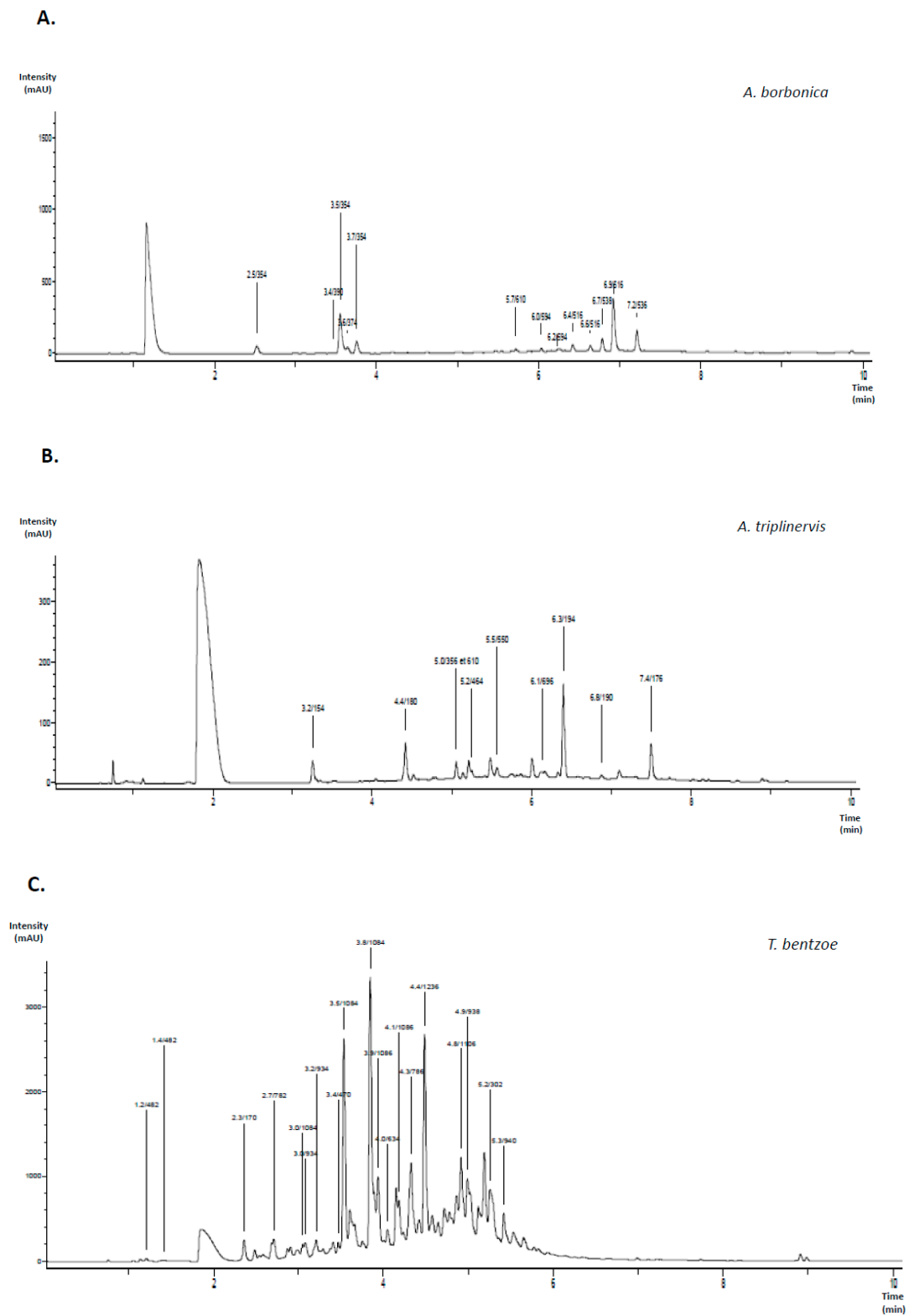


Figure 1. Cont.

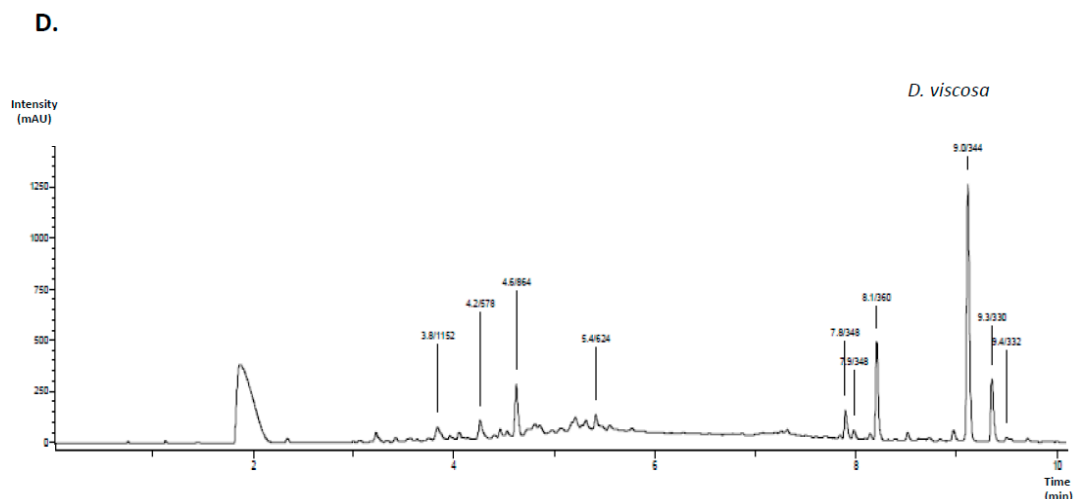


Figure 1. Identification of polyphenols from medicinal plant extracts. Polyphenols extracted from the medicinal plants *Antirhea borbonica* (A), *Ayapana triplinervis* (B), *Terminalia bentzoe* (C), and *Dodonaea viscosa* (D) were identified by Ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis (UPLC-ESI-MS-MS) at 280 nm.

Table 2. Compounds identified in polyphenol-rich extracts from medicinal plants.

Medicinal Plant	Retention Time (min)	Molecular Weight (Da)	Parent Ions	Fragment Ions	Identified Compound
<i>A. borbonica</i>	2.5	354	353	191	Chlorogenic acid isomer
	3.5	354	353	191	Chlorogenic acid
	3.7	354	353	191, 173	Chlorogenic acid isomer
	5.7	610	609	301	Quercetin-hexoside-ramnoside
	6.0	594	593	447, 285	Kaempferol-hexoside-ramnoside
	6.2	594	593	455, 285	Kaempferol-hexoside-ramnoside
	6.4	516	515	353, 191	Dicaffeoylquinic acid
	6.6	516	515	353, 191	Dicaffeoylquinic acid
	6.9	516	515	353, 191	Dicaffeoylquinic acid
<i>A. triplinervis</i>	3.2	154	153	109	Protocatechuic acid
	4.4	180	179	/	Caffeic acid
	5.0	356	355	193	Feruloyl-hexoside
	5.2	610	609	301, 179	Quercetin-hexoside-ramnoside
	5.2	464	463	301	Quercetin-hexoside
	5.5	550	549	505, 463, 301	Quercetin-hexoside-malonate
	6.1	696	695	533, 515, 371, 209	Tricaffeoyl-glucarate
	6.3	194	193	/	Isoferulic acid
	6.8	190	191 *	163, 133 *	Ayapin
7.4	176	177 *	145, 133, 121 *	Ayapanin (Herniarin)	
<i>T. bentzoe</i>	1.2	482	481	301	Hexahydroxydiphenoyl (HHDP)-hexoside
	1.4	482	481	301	HHDP-hexoside
	2.3	170	169	125	Gallic acid
	2.7	782	781	721, 601, 299, 271	Punicalin
	3.0	934	933	/	Galloyl-punicalin
	3.2	934	933	915, 781, 721, 601	Galloyl-punicalin
	3.4	470	469	425	Valoneic acid dilactone
	3.5	1084	1083	781, 601	Punicalagin
	3.8	1084	1083	781, 601	Punicalagin
	3.9	186	185	783, 601, 451	Digalloyl-gallagyl-hexoside
	4.0	634	633	463, 301	HHDP-galloyl-hexoside
	4.1	1086	1085	933, 721, 601	Digalloyl-punicalin
	4.3	786	785	633, 483	HHDP-digalloyl-hexoside
	4.9	938	937	785, 767, 741, 465, 301	Tri-galloyl-HHDP-glucose
5.2	302	301	/	Ellagic acid	
5.3	940	939	787, 769, 617	Pentagalloyl-hexoside	
<i>D. viscosa</i>	3.8	1152	1151	981, 863, 711	Procyanidin tetramer type A
	4.2	578	557	451, 425	Procyanidin dimer B2
	4.6	864	863	711, 693, 559	Procyanidin trimer type A
	5.4	624	623	315	Isorhamnetin-hexoside-rhamnoside
	9.0	344	343	329, 301, 283	5,7-Dihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone (Santin)

Polyphenol-rich extracts from medicinal plants were analyzed by UPLC-ESI-MS-MS at 280 nm. The phytochemicals were detected according to their retention time and the m/z ratio of their parent ions $[M - H]^-$ and fragments at negative mode, except for the parent ions $[M + H]^+$ and fragments that were detected at positive mode and indicated by *.

Table 3. Total polyphenol contents and free radical-scavenging and reducing activities of plant extracts.

	Total Polyphenol Contents (g GAE/100 g)	DPPH Reduced (%)
Plants		
<i>A. borbonica</i>	3.44 ± 0.11 ^{b,c}	89.50 ± 1.24 ^e
<i>A. triplinervis</i>	0.58 ± 0.02 ^{a,c,d}	67.99 ± 1.58 ^f
<i>T. bentzoe</i>	8.14 ± 0.27 ^{a,b,d}	92.43 ± 0.42
<i>D. viscosa</i>	3.22 ± 0.12 ^{b,c}	89.95 ± 1.41
Standard antioxidants		
Vitamin C	-	93.78 ± 0.65
Caffeic acid	-	92.58 ± 0.63
Chlorogenic acid	-	89.36 ± 0.75 ^e
Gallic acid	-	94.04 ± 0.06
Quercetin	-	92.56 ± 0.54

Total polyphenol contents from medicinal plant extracts were determined by Folin-Ciocalteu assay and expressed as g gallic acid equivalent (GAE)/100 g plant. Free radical-scavenging and reducing capacities of plant polyphenols (100 µM GAE), vitamin C, quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids (100 µM) were measured by DPPH assay and expressed as % DPPH reduced. Data are means ± SEM of three independent experiments. a: $p < 0.005$ as compared to *A. borbonica*, b: $p < 0.005$ as compared to *A. triplinervis*, c: $p < 0.005$ as compared to *T. bentzoe*, d: $p < 0.005$ as compared to *D. viscosa*, e: $p < 0.05$ and f: $p < 0.005$ as compared to vitamin C positive control.

3.2. Effect of Polyphenols on the Viability of Cerebral Endothelial Cells

In order to determine the possible effect of polyphenols on the cellular viability, bEnd3 cerebral endothelial cells were exposed to each polyphenol-rich plant extract or standard caffeic acid, chlorogenic acid, gallic acid, or quercetin. Cell counting data show that neither polyphenol-rich plant extracts nor standard polyphenols modulated the cellular viability (Figure 2A). Furthermore, any plant extract or standard polyphenol changed the mitochondrial metabolic activity of cerebral endothelial cells that were evaluated by MTT assay (Figure 2B), which suggested the absence of cytotoxic action on bEnd3 cerebral endothelial cells in our experimental conditions.

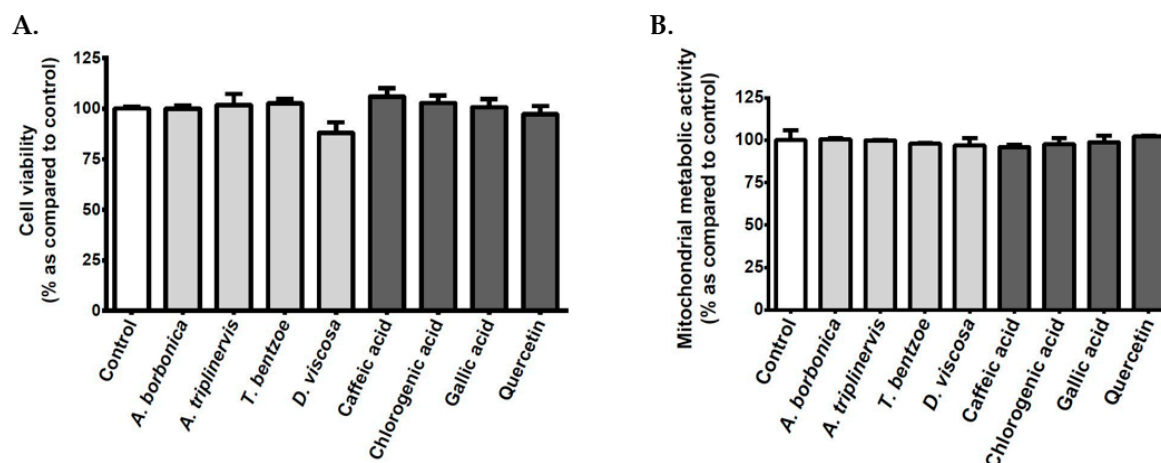


Figure 2. Effect of polyphenols on the viability and mitochondrial metabolic activity of cerebral endothelial cells. Cells were exposed to normoglycemic condition in presence or not of each polyphenol-rich plant extract (10 µM GAE) or standard polyphenol (10 µM) for 24 h. In order to evaluate the cellular viability, the cells were counted by using the Trypan blue exclusion method (A). The mitochondrial metabolic activity was determined by the 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (B). Data are means ± SEM of three independent experiments.

3.3. Effect of Polyphenols on Intracellular ROS Levels on Cerebral Endothelial Cells in Hyperglycemic Condition

During diabetes, oxidative stress plays a causal role in hyperglycemia-related neurovascular complications by inducing blood-brain barrier dysfunction. We determined the impact of an experimental hyperglycemia mimicked by high glucose concentration on ROS production from cerebral endothelial

cells that were exposed or not to polyphenols. The data show that the exposure of cells to the hyperglycemic condition led to a significant increase in intracellular ROS levels reaching $126.91 \pm 1.70\%$ (Figure 3A). Noticeably, all polyphenol-rich plant extracts as well as standard caffeic acid, chlorogenic acid, gallic acid, and quercetin counteracted the deleterious effect of the hyperglycemic condition. These data suggest that hyperglycemic condition induced oxidative stress on cerebral endothelial cells and that polyphenols exerted a protective action. Such an antioxidant effect of polyphenol-rich plant extracts could be partly attributed to their free radical-scavenging and reducing capacities described above, and they may result from the presence of phytochemicals, like quercetin, caffeic, chlorogenic, and gallic acids in the medicinal plant extracts.

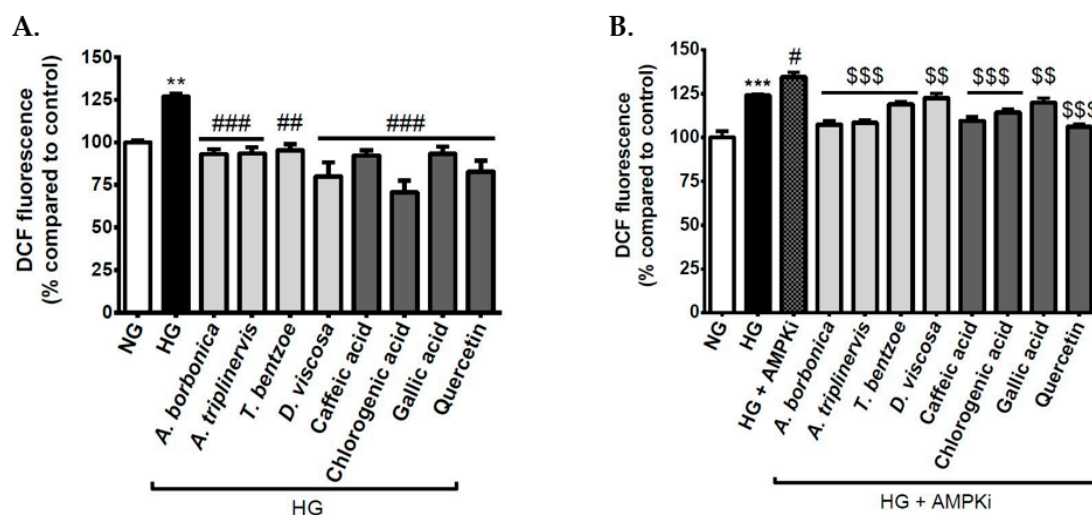


Figure 3. Effect of polyphenols on intracellular reactive oxygen species (ROS) levels on cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition. Cells were exposed to normoglycemic condition (NG) or hyperglycemic condition (HG) in the presence or not of each polyphenol-rich plant extract (10 μ M gallic acid equivalent (GAE)) or standard polyphenol (10 μ M). Intracellular ROS levels were measured by the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay (A). For the experiment with AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway inhibitor, cells were pre-incubated with the Compound C (10 μ M) during 1 h. Subsequently, the intracellular ROS levels were determined in the experimental conditions described above for normoglycemic (NG) and hyperglycemic (HG) conditions (B). Data are means \pm SEM of three independent experiments. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$, as compared to NG. #: $p < 0.05$ as compared to HG. #: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.005$ as compared to HG. #: $p < 0.05$ as compared to HG. \$\$: $p < 0.01$ and \$\$\$: $p < 0.005$ as compared to HG + AMPK pathway inhibitor.

3.4. Effect of Signaling Pathway Inhibitors and Polyphenols on Intracellular ROS Levels on Cerebral Endothelial Cells in Hyperglycemic Condition

In order to better understand the molecular mechanisms that are involved in high glucose-induced ROS production from endothelial cells and the protective effect of polyphenols, bEnd3 cells were pre-incubated with specific inhibitors targeting NF κ B or AMPK pathways, before ROS level measurement. The results show that the inhibition of NF κ B pathway led to a decrease in ROS levels in both normoglycemic and hyperglycemic conditions, providing evidence for a causal role of NF κ B in ROS production (Table 4). Conversely, the inhibition of AMPK pathway induced an elevation of ROS levels in both normoglycemic and hyperglycemic conditions, highlighting a protective role of AMPK against ROS production. Interestingly, the co-treatment of cells with AMPK pathway inhibitor and polyphenols during hyperglycemic condition abrogated the increase in ROS production exacerbated by AMPK pathway inhibitor (Figure 3B). This suggests that polyphenols may help to reduce redox damages that are related to AMPK pathway blockade and protect cerebral endothelial cells against high glucose-mediated oxidative stress.

Table 4. Effect of nuclear factor kappa B (NFκB) and AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibition on intracellular ROS levels of cerebral endothelial cells during hyperglycemic condition.

Cell Conditions	Intracellular ROS Levels (% of Control)		
	Vehicle	NFκB Inhibition	AMPK Inhibition
Normoglycemic condition	100 ± 2.12	80.38 ± 2.92 *	137.89 ± 3.19 ***
Hyperglycemic condition	127.75 ± 2.66 ***	80.28 ± 3.21 ###	142.16 ± 2.88 ##

Cells were preconditioned with NFκB and AMPK inhibitors (10 μM), for 1 h before the exposition to DCFH-DA probe for 45 min. Subsequently, the cells were co-exposed to the inhibitors (10 μM) and 5.5 mM or 33 mM of glucose to mimic normoglycemic and hyperglycemic conditions, respectively. Intracellular ROS levels were measured by DCFH-DA assay. The data are means ± SEM of three independent experiments. *: $p < 0.05$ and ***: $p < 0.005$ as compared to normoglycemic condition. ##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.005$ as compared to hyperglycemic condition.

3.5. Effect of Polyphenols on SOD Activity on Cerebral Endothelial Cells in Hyperglycemic Condition

SOD activity was determined to elucidate the mechanisms involved in the ability of polyphenols to reduce oxidative stress mediated by hyperglycemic condition. The results show that the total SOD and Cu/ZnSOD activities were significantly elevated in cells exposed to hyperglycemic condition (Table 5). Interestingly, all of the polyphenol-rich plant extracts reversed the up-regulated activities of total and Cu/ZnSOD mediated by high glucose, except *D. viscosa* plant extract, which only modulated the activity of Cu/ZnSOD. Standard caffeic acid, chlorogenic acid, gallic acid, and quercetin also abrogated the hyperglycemic condition effect on total and Cu/ZnSOD activities. This suggests the possible involvement of these polyphenols in the bioactivity of medicinal plant extracts. Concerning MnSOD activity, it was unchanged in cells that were exposed to the hyperglycemic condition. Noteworthy, *A. triplinervis* plant extract, chlorogenic acid, gallic acid, and quercetin significantly increased MnSOD activity. Taken together, these findings demonstrate that Cu/ZnSOD was more particularly enhanced during high glucose-mediated oxidative stress. Such an enzymatic activation could result from the elevation of intracellular ROS levels induced by hyperglycemic condition that we reported above. Polyphenol-rich plant extracts may preserve the endogenous antioxidant defense system.

Table 5. Effect of polyphenols on superoxide dismutase (SOD) activity on cerebral endothelial cells in Hyperglycemic condition.

Cell Conditions	Total SOD Activity (U/g Protein)	Cu/ZnSOD Activity (U/g Protein)	MnSOD Activity (U/g Protein)
NG	9.45 ± 0.41	2.28 ± 0.13	6.09 ± 0.13
HG	13.28 ± 0.76 ***	10.77 ± 0.54 ***	4.68 ± 0.54
HG + <i>A. borbonica</i>	10.85 ± 0.36 #	6.27 ± 0.25 ##	5.10 ± 0.54
HG + <i>A. triplinervis</i>	9.09 ± 0.37 ###	4.05 ± 0.93 ###	9.01 ± 1.24 ##
HG + <i>T. bentzoe</i>	9.69 ± 0.31 ###	7.14 ± 0.09 #	4.84 ± 1.37
HG + <i>D. viscosa</i>	13.08 ± 0.14	7.41 ± 0.77 #	5.08 ± 0.77
HG + Caffeic acid	8.73 ± 0.37 ###	3.80 ± 0.36 ###	6.42 ± 0.71
HG + Chlorogenic acid	7.47 ± 0.43 ###	3.24 ± 0.04 ###	8.30 ± 0.04 #
HG + Gallic acid	11.16 ± 0.40 #	1.22 ± 0.64 ###	11.33 ± 0.64 ###
HG + Quercetin	8.90 ± 0.73 ###	3.65 ± 1.50 ###	10.42 ± 1.86 #

Cells were exposed to normoglycemic condition (NG) or hyperglycemic condition (HG) in presence or not of each polyphenol-rich plant extract (10 μM GAE) or standard polyphenol (10 μM). Subsequently, total SOD, Cu/ZnSOD, and MnSOD activities were measured. Data are means ± SEM of three independent experiments. ***: $p < 0.005$ as compared to NG. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.005$ as compared to HG.

3.6. Effect of Polyphenols on the Expression of Genes Encoding Redox Markers on Endothelial Cells in Hyperglycemic Condition

Redox status homeostasis is regulated by ROS-detoxifying enzymes, including Cu/ZnSOD, MnSOD, catalase, GPx, and HO-1, as well as ROS-producing enzymes, such as Nox4. It was relevant to assess the impact of polyphenol-rich plant extracts on the production of such redox enzymes. Results show on the one hand that the expression of genes coding for the antioxidant enzymes Cu/ZnSOD

(Figure 4A), MnSOD (Figure 4B), catalase (Figure 4C), and HO-1 (Figure 4D) was down-regulated, and, on the other hand, that GPx gene expression (Figure 4E) was up-regulated in response to high glucose concentration. *A. borbonica* and *D. viscosa* plant extracts exerted a protective action against the modulation of Cu/ZnSOD, MnSOD, HO-1, and GPx gene expression mediated by hyperglycemic condition. *D. viscosa* plant extract also improved catalase gene expression. *A. triplinervis* plant extract protected against the alteration of MnSOD, HO-1, and GPx gene expression in high glucose-exposed cells. Regarding *T. bentzoe* plant extract, it counteracted MnSOD gene expression reduction mediated by hyperglycemic condition. Standard polyphenols were also able to counteract the impact of hyperglycemic condition on the expression of genes encoding redox enzymes, depending on the considered enzyme. Of note, all of the pure polyphenols abrogated the decrease in HO-1 gene expression caused by high glucose; and quercetin exerted a marked protective action by inducing a four-fold increase in HO-1 gene expression. Concerning the ROS-producing enzyme Nox4, its gene expression was up-regulated in hyperglycemic condition-exposed cells (Figure 4F). *A. borbonica* plant extract, caffeic, and gallic acids protected against Nox4 gene expression deregulation. It is well known that the transcription factor Nrf2 is involved in the enhancement of the expression of genes encoding antioxidant enzymes. Interestingly, high glucose concentration reduced by a two-fold factor Nrf2 gene expression (Figure 4G). This result is consistent with data described above showing the down-regulation of Cu/ZnSOD, MnSOD, catalase, and HO-1 gene expression in hyperglycemic condition. *A. borbonica*, *T. bentzoe*, and *D. viscosa* plant extracts as well as caffeic, chlorogenic, and gallic acids abrogated Nrf2 gene expression decrease during hyperglycemic condition. Collectively, these findings demonstrate that the hyperglycemic condition altered the cerebral endothelial cell redox status by promoting oxidative stress. Polyphenol-rich plant extracts exhibited protective antioxidant properties. Given that quercetin, caffeic, chlorogenic, and gallic acids exerted similar activities, these polyphenols could partly contribute to the biological effects of the medicinal plant extracts.

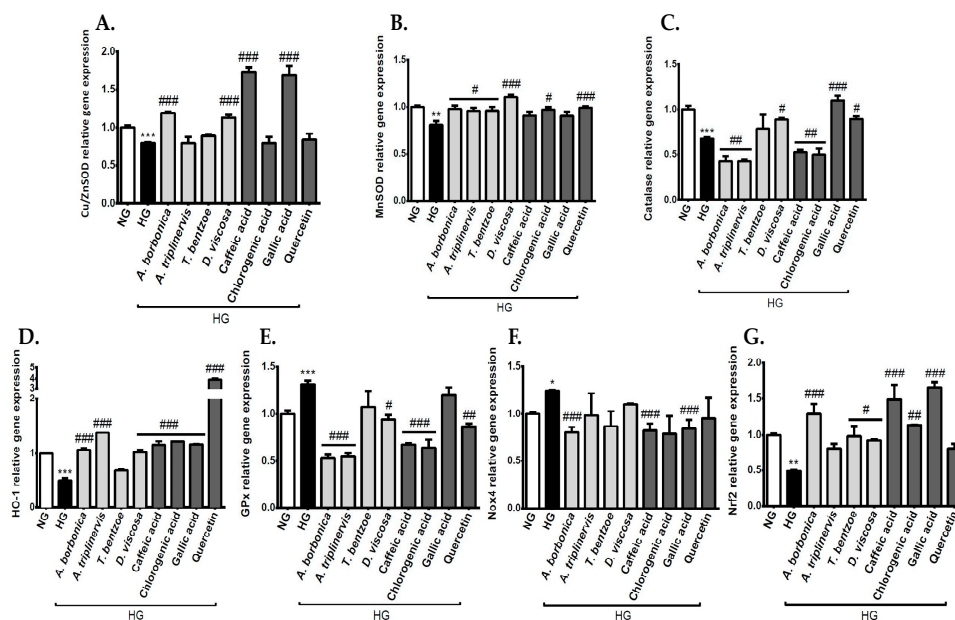


Figure 4. Effect of polyphenols on the expression of genes encoding redox enzymes and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) transcription factor on cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition. Cells were exposed to normoglycemic condition (NG) or hyperglycemic condition (HG) in the presence or not of each polyphenol-rich plant extract (10 μ M GAE) or standard polyphenol (10 μ M). The expression of genes coding for Cu/ZnSOD (A), MnSOD (B), catalase (C), and heme oxygenase-1 (HO-1) (D), GPx (E), Nox4 (F), and Nrf-2 (G) was measured by RT-qPCR and normalized to GAPDH gene expression. The data are means \pm SEM of three independent experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.005$, as compared to NG. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.005$ as compared to HG.

3.7. Effect of Polyphenols on Inflammatory Markers on Cerebral Endothelial Cells in Hyperglycemic Condition

Hyperglycemia-mediated oxidative stress is known to cause the nuclear translocation of NFκB, which activates the transcription of several genes coding for pro-inflammatory cytokines, like IL-6. We evaluated the production of pro-inflammatory markers by measuring NFκB gene expression and IL-6 secretion. The data indicate that NFκB gene expression (Figure 5A) and IL-6 release (Figure 5B) were elevated in cells that were exposed to high glucose level, demonstrating a pro-inflammatory response of cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition. Interestingly, all polyphenol-rich plant extracts and standard polyphenols exerted an anti-inflammatory action by lowering both NFκB gene expression and IL-6 secretion, except for gallic acid, without effect on NFκB gene expression.

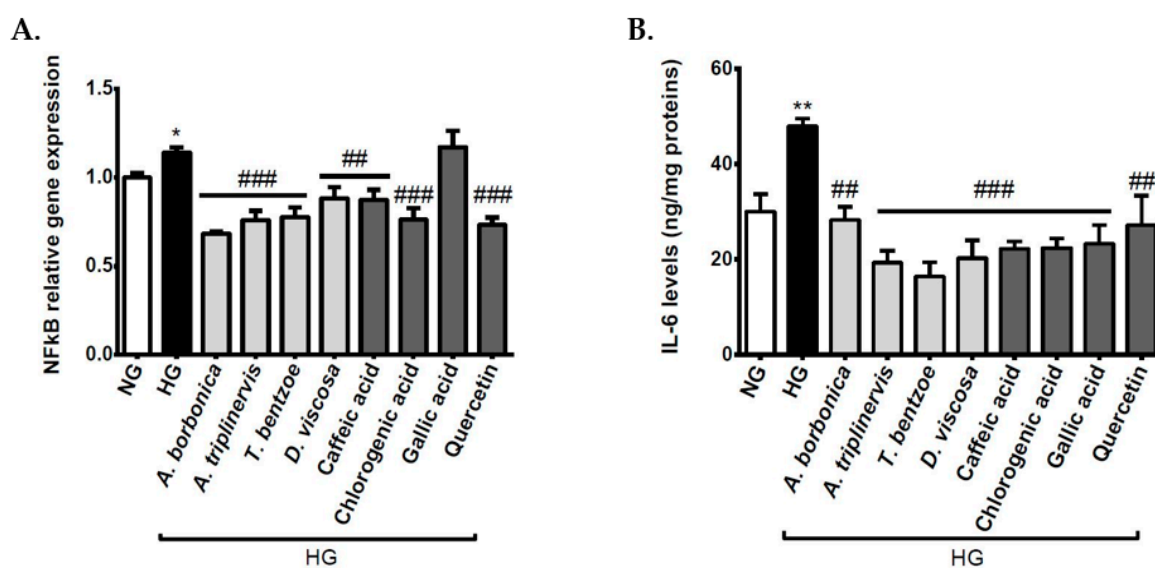


Figure 5. Effect of polyphenols on the production of inflammatory markers on cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition. The cells were exposed to normoglycemic condition (NG) or hyperglycemic condition (HG) in the presence or not of each polyphenol-rich plant extract (10 μM GAE) or standard polyphenol (10 μM). The expression of NFκB gene was measured by RT-qPCR and normalized to GAPDH gene expression (A). The secretion of IL-6 was measured by ELISA kit (B). Data are means ± SEM of three independent experiments. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ as compared to NG. ###: $p < 0.01$ and ####: $p < 0.005$ as compared to HG.

3.8. Effect of Polyphenols on Vasoactive Markers on Cerebral Endothelial Cells in Hyperglycemic Condition

Endothelial cells are the major source of NO, which plays an important physiological role as a vasodilator factor. During hyperglycemia-mediated oxidative stress, it is established that ROS alter eNOS activity and NO production. Moreover, ROS may exacerbate the production of the vasoconstrictor factor ET-1. We evaluated the effect of polyphenols on these vasoactive markers. The results show that high glucose concentration caused an elevated expression of ET-1 gene expression (Figure 6A). Oppositely, hyperglycemic condition induced a down-regulation of eNOS gene expression (Figure 6B). Some polyphenol-rich plant extracts and standard polyphenols exerted a protective action against the deleterious effect of high glucose concentration on ET-1 and eNOS gene expression. Moreover, the hyperglycemic condition significantly decreased intracellular NO levels (Figure 6C), and all plant extracts counteracted this effect. Standard caffeic, chlorogenic and gallic acids, as well as quercetin exerted a similar protective action, suggesting their possible contribution to the plant extract benefits on NO generation during hyperglycemic condition. Noteworthy, there was a significant negative Pearson correlation between intracellular NO and ROS levels in cells that were exposed to the hyperglycemic condition (Figure 6D). This result suggests that oxidative stress caused by hyperglycemic condition

could be associated with the dysfunction of cerebral endothelial cells through damaged production of NO.

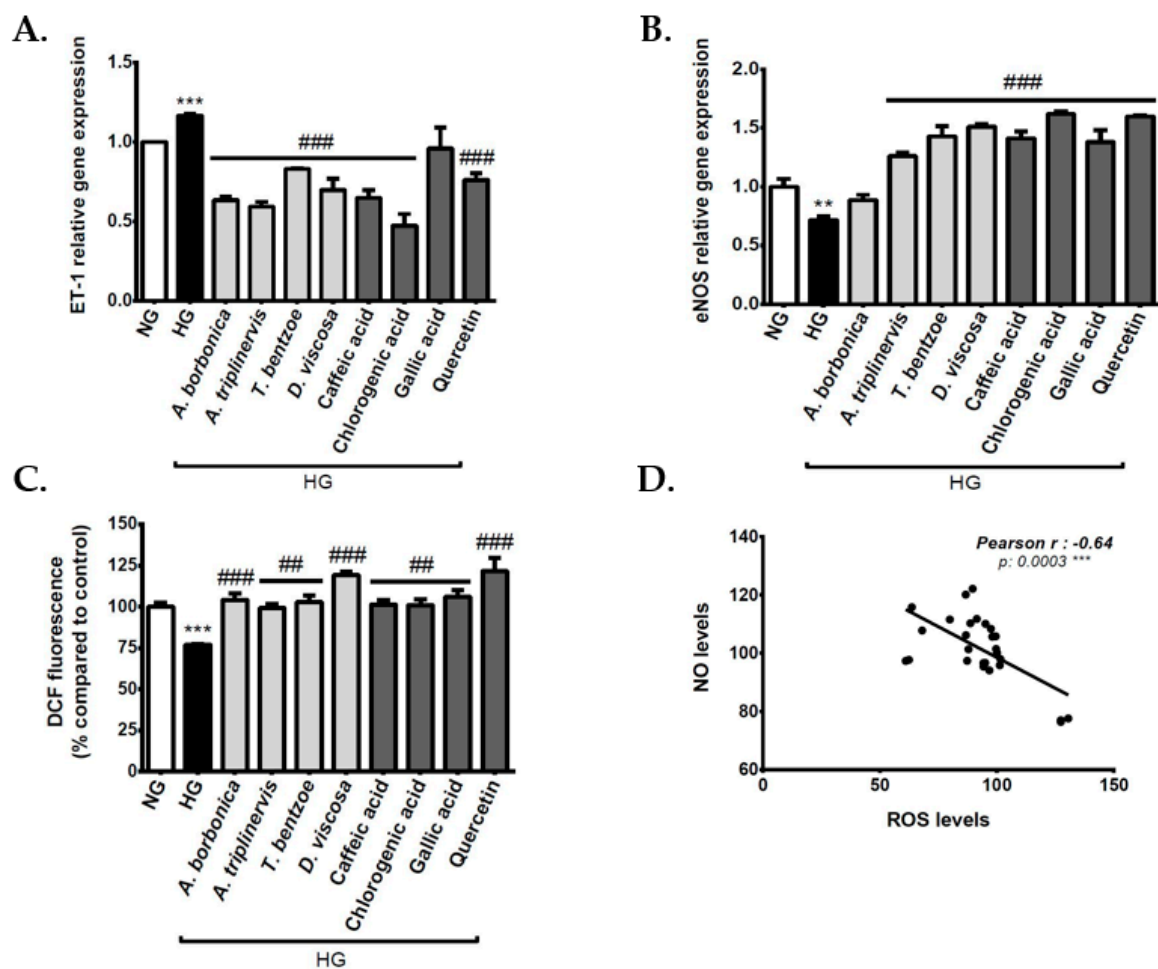


Figure 6. Evaluation of polyphenols on the production of vasoactive markers on cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition. Cells were exposed to normoglycemic condition (NG) or hyperglycemic condition (HG) in the presence or not of each polyphenol-rich plant extract (10 μ M GAE) or standard polyphenol (10 μ M). The expression of genes coding for endothelin-1 (ET-1) (A) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (B) was measured by RT-qPCR and normalized to GAPDH gene expression. Intracellular nitric oxide (NO) levels were measured by 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM) assay (C). The statistical correlation between intracellular ROS and NO levels was established (D). Data are means \pm SEM of three independent experiments. **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.005$ as compared to normoglycemic condition NG. #: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.005$ as compared to HG.

3.9. Effect of Polyphenol Related Circulating Metabolites on Cerebral Endothelial Cell Viability, Redox, Inflammatory and Vasoactive Markers in Hyperglycemic Condition

Given that polyphenols are poorly absorbed and extensively catabolized by the gut microflora, six related circulating metabolites were assessed for their ability to modulate cerebral endothelial cell viability as well as key redox, inflammatory, and vasoactive markers in hyperglycemic condition. These metabolites were ferulic, 3,4-dihydroxyphenylpropionic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, 3-hydroxyphenylacetic, 3-hydroxybenzoic, and hippuric acids. Cell counting data (Figure 7A) and mitochondrial metabolic activity measurement (Figure 7B) show that polyphenol related circulating metabolites did not exert a cytotoxic effect on bEnd3 cerebral endothelial cells. Table 6 summarizes the data that were obtained regarding ROS production, NF κ B transcriptional activity, IL-6 secretion, and NO levels in cells that were exposed to normoglycemic or hyperglycemic condition, in the

presence or not of circulating metabolites. While the hyperglycemic condition significantly elevated intracellular ROS levels, only ferulic, 3,4-dihydroxyphenylpropionic, and 3,4-dihydroxyphenylacetic acids exerted an antioxidant effect by decreasing the ROS production. Of note, all of the polyphenol circulating metabolites exhibited anti-inflammatory properties by abrogating the elevation of NFκB activity and IL-6 release induced by high glucose condition. Furthermore, all of the polyphenol circulating metabolites protected against the decrease in intracellular NO vasodilator levels mediated by hyperglycemic condition.

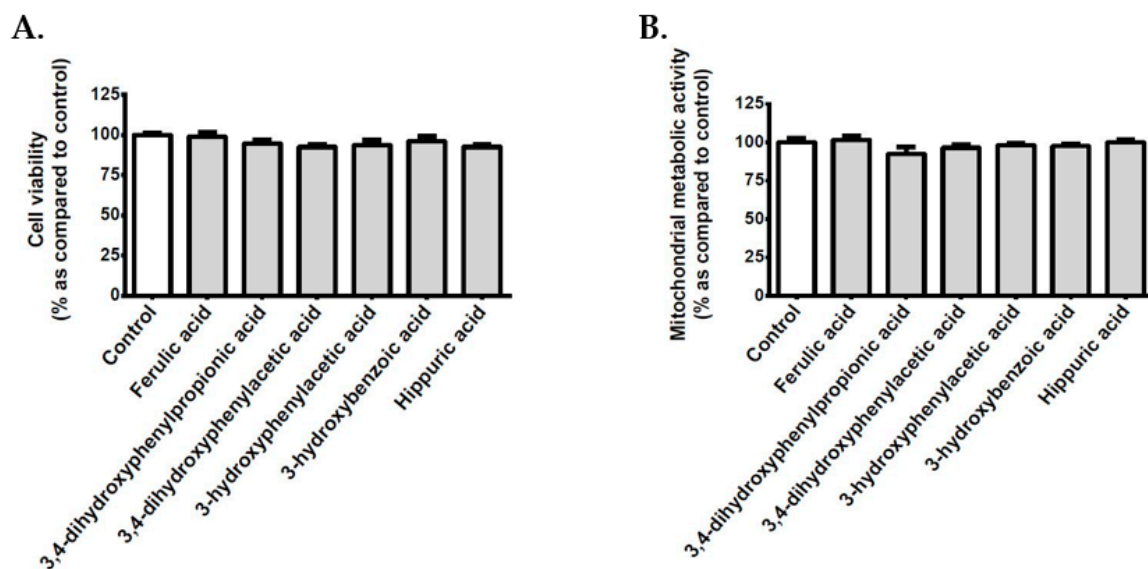


Figure 7. Effect of polyphenol related circulating metabolites on the viability and mitochondrial metabolic activity of cerebral endothelial cells. Cells were exposed to normoglycemic condition in presence or not of each compound (10 μ M) for 24 h. The cellular viability was measured by counting cells through the Trypan blue exclusion method (A). The mitochondrial metabolic activity of cells was determined by the MTT assay (B). Data are means \pm SEM of three independent experiments.

Table 6. Effect of polyphenol related circulating metabolites on redox, inflammatory, and vasoactive markers on cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition.

Cell Conditions	ROS Levels (%)	NFκB/SEAP Activity (%)	IL-6 Secretion (ng/mg Proteins)	NO Levels (%)
NG	100.00 \pm 2.46	100.00 \pm 1.11	30.01 \pm 3.64	100.00 \pm 2.54
HG	118.75 \pm 1.89 ***	133.69 \pm 10.46 **	47.95 \pm 1.61 **	70.51 \pm 0.94 ***
HG + Ferulic acid	84.33 \pm 4.51 ###	104.40 \pm 0.23 ##	31.96 \pm 2.09 #	80.08 \pm 1.13 ##
HG + 3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	104.16 \pm 3.95 #	100.29 \pm 3.41 ##	26.62 \pm 8.30 #	83.42 \pm 1.66 ###
HG + 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	84.17 \pm 4.14 ###	102.03 \pm 1.10 ##	23.50 \pm 7.90 #	80.62 \pm 0.30 ###
HG + 3-Hydroxyphenylacetic acid	109.38 \pm 1.16	104.31 \pm 2.46 ##	19.34 \pm 1.80 ###	83.65 \pm 1.36 ###
HG + 3-Hydroxybenzoic acid	107.21 \pm 0.74	102.89 \pm 0.58 ##	28.13 \pm 7.20 #	79.77 \pm 0.93 #
HG + Hippuric acid	113.72 \pm 0.94	95.78 \pm 3.18 ##	26.69 \pm 3.00 ##	91.53 \pm 3.36 ###

Cells were exposed to normoglycemic condition (NG) or hyperglycemic condition (HG) in the presence or not of each polyphenol related circulating metabolite (10 μ M). Intracellular ROS levels was measured by DCFH-DA assay. NFκB/SEAP activity and IL-6 secretion were determined by Quanti-Blue assay and ELISA kit, respectively. The intracellular NO levels were measured by DAF-FM assay. Data are means \pm SEM of three independent experiments (three cellular passages), except for NFκB/SEAP activity and IL-6 secretion measurement, which were performed twice (two cellular passages). **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.005$ as compared to NG. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.005$ as compared to HG.

4. Discussion

During type 2 diabetes, hyperglycemia promotes oxidative stress, which induces cerebral endothelial dysfunctions and BBB alterations, aggravating cerebrovascular complications, such as

stroke. The present study evaluated the protective effects of polyphenols on redox, inflammatory, and vasoactive markers of murine bEnd3 cerebral endothelial cells during hyperglycemic condition. This experimental hyperglycemic condition was mimicked by treating cells with a high glucose concentration (33 mM) after a glucose starvation related to normoglycemia (5.5 mM). Similar treatments with high glucose level were reported to mimic hyperglycemia in in vitro cellular models and led to demonstrate high glucose-caused redox and pro-inflammatory alterations that are associated with endothelial dysfunctions, such as altered permeability and reduced NO production [40,42,45,46]. Here, four characterized polyphenol-rich extracts from *A. borbonica*, *A. triplinervis*, *D. viscosa*, and *T. bentzoe* medicinal plants were assessed for their capacity to protect endothelial functions during hyperglycemic condition. Furthermore, quercetin, caffeic, chlorogenic, and gallic acids were used as reference polyphenols due to their identification in plant extracts. When considering that our previous study conducted on bEnd3 cerebral endothelial cells showed that hyperglycemic condition led to time-dependent redox alterations between 3–24 h of exposure [42], the same experimental condition was achieved here. Regarding the dose of 10 μ M of polyphenols used, it is consistent with the pharmacological doses broadly used in literature and in our published studies [37–39,41,47]. This dose could be considered to be close to circulating concentrations reaching less than 10 μ M in nutritional situations, given that polyphenols are poorly absorbed through the intestinal tract and that their bioavailability largely depends on their structure and microbial catabolism [27,32]. Of note, our present data demonstrate that polyphenols used at 10 μ M did not alter the viability of bEnd3 cerebral endothelial cells after 24 h of treatment. Therefore, the biological effects of polyphenols observed could not be associated with a damaged cellular viability. Similar results were obtained when bovine aortic endothelial cells were treated with curcumin (10 μ M) during 18 h of exposure. However, when the impact of different concentrations (0–30 μ M) of curcumin was assessed, it was found that the cellular viability significantly decreased in the presence of 25 and 30 μ M of curcumin [48]. Conversely, Chen et al. [49] demonstrated that a treatment with 10 and 25 μ M of resveratrol for 24 h did not alter bEnd3 cell viability. These results suggest that the possible cytotoxic action of polyphenols might depend on their structure, the concentration used, the time of exposure, as well as the cell line considered. Several authors also reported polyphenol structure-antioxidant activity relationships [29]. Thus, it was essential here to characterize the chemical nature of polyphenols extracted from the medicinal plants selected. More particularly, leaves were used, since they constitute the most commonly and easily collected plant parts for the preparation of herbal remedies [50].

Our UPLC-ESI-MS-MS data show the presence of different types of polyphenols in medicinal plant extracts that are widely found in the human diet due to their abundance in several vegetables, fruits, and plant-derived beverages, such as coffee [27]. Indeed, for *A. borbonica* plant extract, the major polyphenols identified were caffeic and chlorogenic acids that are members of the family of phenolic acids well known to be abundant in many red fruits and coffee [27]. In agreement with our published data [38], quercetin and kaempferol glycosides that belong to the flavonoid family were also detected in *A. borbonica* plant extract. *D. viscosa* plant extract also contained different flavonoids, including the methylated form of quercetin, called isorhamnetin, procyanidins, and a trimethoxyflavone. While this trimethoxyflavone was reported as one of the bioactive phytochemicals responsible for the anti-inflammatory activity of *Artemisia asiatica* [51], quercetin, kaempferol, and procyanidins are flavonoids more commonly provided by the diet through the consumption of foods, such as onion, broccoli, grape, or cocoa. Noteworthy, literature data indicate that flavonoids may account for about two-thirds of the daily polyphenol intake in humans [27]. Quercetin glycosides and caffeic acid derivatives were also depicted in *A. triplinervis* plant extract. In addition, UPLC-ESI-MS-MS analysis helped to characterize the coumarin derivatives ayapin and ayapanin that we previously identified in *A. triplinervis* essential oil and correlated with oil composition variations, depending on the developmental stage and geographical location of the medicinal plant [52]. For *T. bentzoe* plant extract, the predominant polyphenols identified were gallic and ellagic acids as well as their sugar conjugates comprising the ellagitannins punicalin and punicalagin. Interestingly, these compounds may represent

unique ellagitannins from specific dietary sources, like pomegranate, and be responsible for most of the antioxidant properties that were attributed to this fruit [53,54]. Altogether, our UPLC-ESI-MS-MS results demonstrate that the polyphenol composition was dependent on the medicinal plant considered. Concomitantly, the total polyphenol content ranging from 0.5 to 8.1 g GAE/100 g of plant also depended on the nature of the medicinal plant. It led to identifying *T. bentzoe* plant as the richest polyphenol source, followed by both *A. borbonica* and *D. viscosa* plants, and *A. triplinervis* plant. This agrees with literature data reporting that medicinal plants may naturally provide high levels of polyphenols similarly to dietary sources, such as tea, cocoa, grape, or curcuma [27,28,37,39]. Despite it being established that the total polyphenol content from fruits and vegetables varies depending on cultivars, climatic environment, cultural practices, and harvest conditions [55], there is still a lack of data regarding medicinal plants. Nevertheless, the total polyphenol content remains a relevant indicator of the antioxidant capacity of food matrix and a useful preliminary marker for identifying natural sources of polyphenols as functional foods [56].

An *in vitro* study was conducted on cerebral endothelial cells exposed to hyperglycemic condition in the presence or not of polyphenols to assess whether the presence of polyphenols in the medicinal plant extracts was associated with antioxidant activities. Our findings provide evidence for the antioxidant effects of medicinal plant polyphenols against high glucose-induced oxidative stress. Indeed, the results from DCFH-DA assay show that the hyperglycemic condition led to increased intracellular ROS levels. According to Kassab et al. [13], in hyperglycemic condition, glucose is phosphorylated and converted into fructose-6-phosphate, next into glyceraldehyde-3-phosphate and transformed into glycerol phosphate, a precursor of diacylglycerol which is a signaling molecule that is able to modulate protein kinase C activity involved in redox deregulation. Moreover, the overproduction of superoxide caused by hyperglycemia inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase that is the rate-limiting enzyme of the pentose phosphate pathway able to provide reducing equivalents to the endogenous antioxidant defense system [57]. Interestingly, medicinal plant polyphenols protected cerebral endothelial cells by decreasing ROS production elevated by hyperglycemic condition. Quercetin, caffeic, chlorogenic, and gallic acids also improved the ROS levels in hyperglycemic condition. This raises the possibility that such polyphenols could partly contribute to the antioxidant effects of plant extracts on cerebral endothelial cells. Accordingly, *A. borbonica* plant, quercetin, caffeic, chlorogenic, and gallic acids have previously been shown to decrease ROS levels in 3T3-L1 adipose cells that were exposed to metabolic and inflammatory stimuli, like hydrogen peroxide, TNF α , and bacterial lipopolysaccharides [38,39,41]. Here, cerebral endothelial cell pretreatment with specific inhibitors of intracellular signaling pathways highlights a causal role of NF κ B, while a protective action of AMPK on redox changes. This is consistent with our published data demonstrating the causal involvement of NF κ B, JNK, ERK, and PI3K pathways and the protective role of AMPK in ROS production of bEnd3 cells in hyperglycemic condition [42]. Moreover, we found that hyperglycemic condition induced a pro-inflammatory response of cerebral endothelial cells, by elevating NF κ B gene expression and IL-6 release. Accordingly, several literature data provided evidence for the crosstalk between oxidative stress and inflammation, and showed that NF κ B suppression limited redox damages in *in vitro* cell models as well as in diabetic rats [58–60]. Importantly, our present data show that polyphenol-rich plant extracts, as well as quercetin, caffeic, chlorogenic, and gallic acids exerted anti-inflammatory effects, by lowering NF κ B and IL-6 production caused by high glucose on cerebral endothelial cells. In parallel, we found that all polyphenols tested abrogated the increase in ROS levels mediated by AMPK blockade in cells that were exposed to hyperglycemic condition. When considering that AMPK is a conserved key enzyme involved in cell energy homeostasis and able to counteract oxidative stress [61,62], polyphenols may help to reduce redox alterations related to AMPK suppression and, thus, to protect cerebral endothelial cells during hyperglycemia. Of note, Shen et al. [63] reported that polyphenols like quercetin up-regulate AMPK gene expression. This activation of AMPK prevents oxidative stress-induced vascular dysfunction via the increased phosphorylation and activation of eNOS. Jiang et al. [64] found that chlorogenic acid

improved ROS and NO production by activating AMPK signaling pathway and eNOS activity on human aortic endothelial cells that were exposed to hypochlorous acid.

The antioxidant properties of medicinal plant polyphenols on cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition may result from their ability to scavenge and neutralize ROS, as demonstrated by DPPH assay. Indeed, through electronic delocalization on their phenolic nucleus, polyphenols can react with free radicals. Subsequently, the phenoxyl radicals produced are stabilized by the resonance effect of the phenolic nucleus. Moreover, the antioxidant activity of polyphenols depends on the number and the position of hydroxyl groups in the molecular structure [29]. Given that flavonoids are composed of three phenolic rings, such a chemical structure may explain why quercetin and the medicinal plant extracts containing quercetin derivatives exerted high free radical-scavenging and reducing capacities. The antioxidant properties of these molecules could also be associated with their capacity to modulate the mitochondrial function, keeping in mind that mitochondria constitute a main source of ROS [65]. Here, we show, for the first time, that all polyphenolic plant extracts, quercetin, and chlorogenic acid improved the mitochondrial MnSOD gene expression deregulated by hyperglycemic condition. In parallel, only *A. triplinervis* plant extract, quercetin, chlorogenic, and gallic acids significantly elevated MnSOD enzymatic activity, suggesting their possible specific impact on MnSOD mitochondrial marker. Our previous data demonstrated the ability of pure polyphenols, such as caffeic and gallic acids, to improve mitochondrial respiration and biogenesis in adipose cells that were exposed to hydrogen peroxide-mediated oxidative stress [66]. It will be relevant to evaluate the impact of medicinal plant extracts on mitochondrial functions of cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition. It is known that cerebral endothelial cells are rich in mitochondria [67]. Additionally, brain is not well equipped with antioxidant defenses, despite its high consumption of oxygen [58], leading to an increased risk of brain damages during high glucose-induced oxidative stress. Thus, antioxidant strategies that aim to limit mitochondrial alterations at the cerebral level are of high interest.

Oxidative stress occurs when there is an imbalance between the rate of ROS production and the capacity of the endogenous antioxidant defense to neutralize ROS. Our data indicate that plant polyphenols were able to regulate both ROS-producing and ROS-detoxifying systems, depending on the medicinal plant considered. On the one hand, only *A. borbonica* plant polyphenols as well as caffeic and gallic acids counteracted the up-regulation of the expression of the gene encoding the ROS-producing enzyme Nox4 in hyperglycemic condition. This agrees with our previous data showing the ability of *A. borbonica* plant polyphenols to abrogate Nox4 gene expression elevation in adipose cells that were exposed to oxidative stress induced by bacterial lipopolysaccharides [68]. A similar protective antioxidant effect of resveratrol was observed in bEnd3 cells through inhibition of high glucose-induced Nox activation and ROS generation [49]. Nox4 is the most abundant vascular Nox isoform, located in the mitochondria. Once activated, Nox4 leads to an increased production of ROS that triggers the nuclear translocation of NFκB, leading to pro-inflammatory cytokine production [16]. A persistent elevation of Nox4 mRNA levels was described in human aortic endothelial cells that were exposed for 24–72 h to hyperglycemic condition. This event was associated with the nuclear translocation of NFκB and its binding to Nox4 gene promoter [69]. Concordantly, our present study demonstrates NFκB involvement in redox changes mediated by high glucose in bEnd3 cells. In vivo studies reported increased levels of Nox4 protein in cerebral endothelial cells from mouse ischemic brains and stroke patient samples. A link between the level of Nox4 protein, brain infarct volume, and neurological improvements was depicted in Nox4^{-/-} mice [70]. Here, our data highlighting the capacity of polyphenols to target both Nox4 and NFκB suggest the relevance to assess their possible benefits in in vivo animal models exposed to cerebrovascular complications, such as stroke. On the other hand, medicinal plant polyphenols also improved major antioxidant factors, including SOD, catalase, GPx, HO-1, and Nrf2. More precisely, we found that Cu/ZnSOD activity was up-regulated in hyperglycemic condition, whereas MnSOD activity was not modulated by high glucose. Accordingly, Weidig et al. [71] observed a significant elevation of Cu/ZnSOD activity in coronary endothelial

cells that were exposed to 22 mM of glucose. This may be explained by the fact that cytosolic Cu/ZnSOD is recognized as the first line of the endogenous defense system to neutralize superoxide radicals [72]. Medicinal plant polyphenols regulated SOD activity on cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition, which suggested their ability to preserve the endogenous antioxidant defense system. Moreover, the hyperglycemic condition down-regulated the expression of Cu/ZnSOD, MnSOD, catalase, and HO-1 genes and up-regulated GPx gene expression, while polyphenols counteracted these effects. Accordingly, *A. borbonica* plant polyphenols were previously shown to up-regulate SOD gene expression on adipose cells that were exposed to oxidative stress [39]. It was also reported that quercetin, detected in *A. borbonica*, *A. triplinervis* and *D. viscosa* plants, improved HO-1 gene expression on endothelial cells exposed to hyperglycemic condition. Of note, Li et al. [73] demonstrated that quercetin significantly elevated HO-1 gene expression when human aortic endothelial cells were exposed to the pro-inflammatory mediators lipopolysaccharides, by regulating the Nrf2 signaling pathway. Additionally, quercetin was shown to regulate SOD enzymatic activity in a traumatic brain injury model via Nrf2 signaling pathway [74]. Nrf2 redox-sensitive transcriptional factor is recognized to play a crucial role in cellular defense mechanisms against a variety of stresses. During oxidative stress condition, Nrf2 is translocated into the nucleus and binds to the antioxidant response element of target genes, such as SOD, catalase, GPx, and HO-1, to regulate their transcription rate, helping to restore redox homeostasis [75]. Recently, we showed that high glucose-induced oxidative stress was associated with altered Nrf2 gene expression and nuclear translocation in cerebral endothelial cells [42]. The present study demonstrates that all medicinal plant polyphenols, except *A. triplinervis* plant, abrogated the down-regulation of Nrf2 gene expression mediated by hyperglycemic condition in cerebral endothelial cells. Quercetin, caffeic, chlorogenic, and gallic acids exerted a similar protective action, raising the possibility for their contribution to the beneficial effect of medicinal plant extracts. Consistently, literature data reported that polyphenols, such quercetin and caffeic acid, regulate Nrf2 production [76,77]. According to Nabavi et al. [78], Nrf2 may provide a new therapeutic target for the treatment of diabetic microvascular complications. Authors also emphasized the relevance of antioxidant strategies while using polyphenols to target Nrf2. In Nrf2^{-/-} rat and diabetic mouse models, Nrf2 activation led to an improvement of vascular function and decreased vasoconstriction [18,79]. Such a link between oxidative stress and endothelial dysfunctions was found in the present study, through the evidence of a negative correlation between intracellular ROS levels and NO vasodilator production. Interestingly, our data demonstrate that all medicinal plant extracts counteracted the decrease in NO production induced by the hyperglycemic condition. Except for *A. borbonica* plant, all polyphenol-rich plant extract also protected against the down-regulation of eNOS gene expression mediated by high glucose. Conversely, medicinal plant polyphenols suppressed the up-regulation of ET-1 vasoconstrictor gene expression that was caused by high glucose. These data demonstrate the protective action of medicinal plant extracts against the altered production of vasoactive markers in hyperglycemic condition and suggest their capacity to ameliorate vasodilation and attenuate vasoconstriction. Similar beneficial effects were detected for quercetin, caffeic, and chlorogenic acids, emphasizing their possible involvement in the bioactivity of plant extracts. Accordingly, other studies showed that polyphenols, like quercetin and chlorogenic acid, protected endothelial cells from hypochloride-caused oxidative stress and improved ex vivo aortic vessel function by enhancing eNOS activity and NO release [63,64]. Taken together, our findings demonstrate for the first time that the French medicinal plants *A. borbonica*, *A. triplinervis*, *D. viscosa*, and *T. bentzoe* constitute natural sources of antioxidant and anti-inflammatory polyphenols that are able to improve vasoactive markers, and could be used as innovative therapeutic strategies against cerebrovascular disorders that are associated with hyperglycemia. The novel comparative analysis we performed regarding the medicinal plant polyphenolic composition helps to identify three medicinal plants with high levels of polyphenols, namely *T. bentzoe*, *A. borbonica*, and *D. viscosa*, as compared to *A. triplinervis* plant, which contains a lower polyphenol content. Concomitantly, the comparison of the biological activities of plant extracts on the same cellular model and in similar experimental conditions highlights the absence of cytotoxic

action for all plant extracts tested. This underlines the possibility of their use in preclinical studies, in order to identify the most bioactive extract for future investigations in humans. On the one hand, all of the polyphenolic plant extracts were able to modulate redox, inflammatory, and vasoactive markers in cerebral endothelial cells, with a degree of efficiency depending on the medicinal plant considered. This provides new perspectives on the advantage of the use of a mixture of natural polyphenolic compounds when compared to the use of pure polyphenols for nutritional strategies. Such mixtures of natural polyphenols may also lead to their synergistic action through the impact of plant matrix on polyphenol chemical stability and cell accessibility. Our previous study contributed to show that a crude curcuminoid-rich extract from *Curcuma longa* exerts stronger antioxidant and anti-inflammatory effects on adipose cells than curcumin-enriched fractions [37]. On the other hand, the use of pure compounds helps to hypothesize their contribution to the mechanism of action of plant extracts, and to emphasize their relevance as therapeutic potentials for pharmacological strategies against cerebrovascular complications related to hyperglycemia.

Limitations of this study warrant mention. Polyphenol bioavailability is known to be low, given that, depending on their chemical structure, polyphenols are poorly absorbed through the intestinal tract and extensively catabolized by the gut microflora into microbial metabolites. Previously, we contributed to identifying the parent polyphenols quercetin, caffeic, chlorogenic, and gallic acids in urine samples that were collected from humans after the intake of polyphenol-rich beverages, demonstrating their ability to be absorbed in in vivo condition [80]. In parallel, literature data [32,33] and our previous studies [81–83] led to detect ferulic, 3,4-dihydroxyphenylpropionic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, 3-hydroxyphenylacetic, 3-hydroxybenzoic and hippuric acids as circulating metabolites in rats and humans after consumption of polyphenols like caffeic, chlorogenic and gallic acids, quercetin, and procyanidins. When considering the presence of such polyphenols on the medicinal plant extracts we used here, it was relevant to assess the effect of their related circulating metabolites on cerebral endothelial cells. Importantly, our data show, for the first time, that the polyphenol circulating metabolites tested improve ROS production, NF κ B transcriptional activity, IL-6 secretion, and NO levels in cerebral endothelial cells during the hyperglycemic condition. This result emphasizes their possible involvement in the capacity of medicinal plant polyphenols to improve redox, inflammatory, and vasoactive markers in in vivo condition. It will be of interest to determine the molecular mechanism implicated in the bioactivity of polyphenol circulating metabolites. Another limitation of the present study is that polyphenol uptake mechanism by cells remains poorly understood. Literature data indicate that the uptake of polyphenols, such as flavonoids, depends on cellular types. Rather than different levels of passive diffusion, this may be explained by a greater level of intracellular metabolism and faster rate of export from different cells [84,85]. It is also assumed that polyphenol transport through the BBB is limited and associated with the inhibition of efflux transporters, such as P-glycoprotein [86,87]. Absorbed phenolic acids, like caffeic acid, were found to accumulate in the brain at nanomolar concentrations [88] and exert neuroprotective effects during cerebral ischemic injury [89]. Our recent study conducted on a mouse stroke model co-exposed to hyperglycemia and *A. borbonica* plant polyphenols or pure caffeic acid, led to demonstrate the presence of caffeic acid and its circulating metabolite ferulic acid in the infarcted hemisphere. Moreover, we found that the capacity of polyphenols to decrease cerebral infarct volume and hemorrhagic transformation aggravated by hyperglycemia was associated with an improvement of the production of vascular endothelial-cadherin used as a BBB integrity marker, and with a reduction of neuroinflammation [40]. Further work will be needed in order to assess the gut absorption, metabolism, and ability of other medicinal plant polyphenols to target cerebrovascular cells in in vivo diabetic and ischemic conditions. Given that UPLC-ESI-MS-MS analysis identified polyphenols such as quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids in medicinal plant extracts, the biological effects of standard molecules were assessed. It will be relevant to evaluate their role as active principles after fractionation and purification from medicinal plants. However, it is not excluded that other phytochemicals detected like kaempferol, trimethoxyflavone, ellagic acid or ellagitannins may be involved. Literature data provided evidence for

their antioxidant and anti-inflammatory properties [38,51,53,54]. In our study, polyphenol-rich plant extracts were prepared through a pharmacological approach based on aqueous acetonetic extraction. The most traditionally employed method for preparation of herbal remedies is infusion, which consists of soaking the plant part in very hot water [50]. Recently, *A. borbonica* plant infusion was shown to exert antioxidant properties on in vitro and in vivo models exposed to glycoxidative condition [90]. It will be of interest to evaluate the benefits of infusions that were prepared from the medicinal plants tested here, during cerebrovascular complications related to diabetes.

5. Conclusions

This study demonstrates that medicinal plant polyphenols attenuated oxidative stress and improved inflammatory and vasoactive markers on cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition. Figure 8 summarizes the molecular targets that are involved in polyphenol action. Whereas the hyperglycemic condition induced oxidative stress by deregulating several redox factors, including ROS, Nox4, SOD, catalase, GPx, HO-1, and Nrf2, medicinal plant polyphenols limited oxidative stress mediated by hyperglycemic condition. Cell pretreatment with inhibitors of signaling pathways led to show the causal role of NFκB, while a protective action of AMPK on redox changes. Hyperglycemic condition induced a pro-inflammatory response by increasing NFκB gene expression and IL-6 secretion. Moreover, it altered ET-1, eNOS, and NO vasoactive marker production. Importantly, medicinal plant polyphenols protected against the deleterious effects of hyperglycemic condition. Quercetin, caffeic, chlorogenic, and gallic acids identified as predominant plant polyphenols, and related circulating metabolites exerted similar beneficial activities. A better understanding of the molecular mechanisms that are involved in polyphenol uptake by cerebral endothelial cells is needed. Preclinical studies on diabetic animal models will also help to assess the ability of polyphenols to target cells in in vivo condition and protect against cerebrovascular complications during type 2 diabetes.

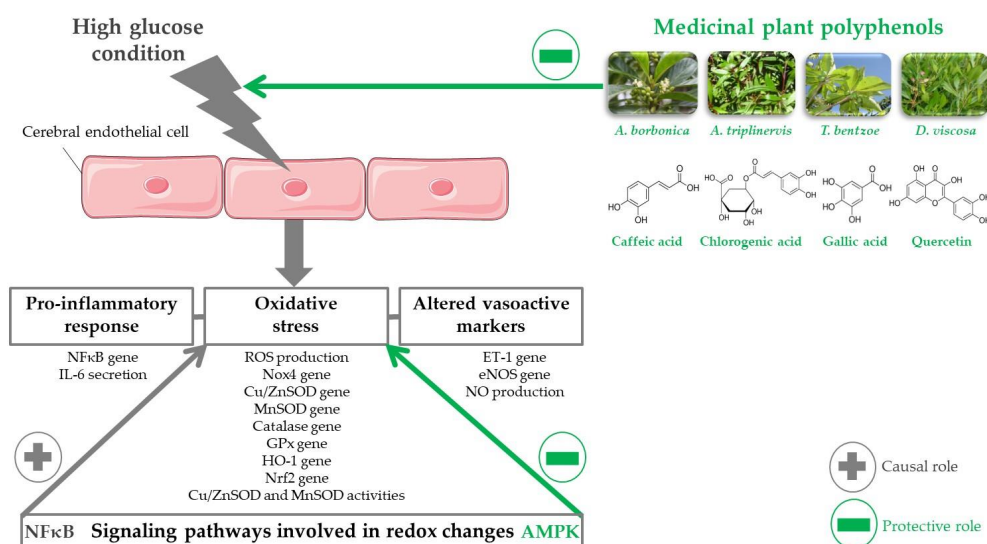


Figure 8. Overview of the molecular targets involved in the protective effects of medicinal plant polyphenols on cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition. High glucose condition increased ROS levels and deregulated key redox factors comprising Nox4, SOD, catalase, GPx, HO-1, and Nrf2. Medicinal plant polyphenols attenuated oxidative stress mediated by hyperglycemic condition. Cell preconditioning with inhibitors of signaling pathways showed the causal role of NFκB while a protective action of AMPK on redox changes. Hyperglycemic condition promoted a pro-inflammatory status by elevating NFκB gene expression and IL-6 secretion, and damaged ET-1, eNOS and NO vasoactive marker production. Interestingly, medicinal plant polyphenols protected against the deleterious effects of hyperglycemic condition. Quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids identified as predominant plant polyphenols exerted similar protective effects.

Author Contributions: J.T. and M.-P.G. contributed to the conception and the design of the study. J.T., A.A., P.C., A.G.-B. and M.-P.G. were involved in the acquisition of data. J.T. and M.-P.G. contributed to the analysis and interpretation of data. All authors were involved in drafting the manuscript and gave final approval for the submission of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the European Regional Development Funds RE0001897 and GURDTI 2018-1828-0002370 (UE-Région Réunion-French State national counterpart), the University of La Réunion and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Janice Taïlé is a recipient of a fellowship from the Région Réunion.

Acknowledgments: The authors thank Jacqueline Smadja from the University of La Réunion for her contribution to the collection and botanical identification of medicinal plants.

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

References

1. Abbott, N.J.; Patabendige, A.A.K.; Dolman, D.E.M.; Yusof, S.R.; Begley, D.J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **2009**, *37*, 13–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Daneman, R.; Prat, A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb. Persp. Biol.* **2015**, *7*, a020412. [[CrossRef](#)]
3. Kolster, M.; Wilhelmi, M.; Schrimpf, C.; Hilfiker, A.; Haverich, A.; Aper, T. Outgrowing endothelial and smooth muscle cells for tissue engineering approaches. *J. Tissue Eng.* **2017**, *8*, 2041731417698852. [[CrossRef](#)]
4. Bellien, J.; Jacob, M.; Monteil, C.; Remy-Jouet, I.; Roche, C.; Duflo, T.; Vendeville, C.; Gutierrez, L.; Thuillez, C.; Richard, V.; et al. Physiological role of endothelin-1 in flow-mediated vasodilatation in humans and impact of cardiovascular risk factors. *J. Hypertens.* **2017**, *35*, 1204–1212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Abbott, N.J.; Friedman, A. Overview and introduction: The blood-brain barrier in health and disease. *Epilepsia* **2012**, *53*, 1–6. [[CrossRef](#)]
6. Sena, C.M.; Pereira, A.M.; Seica, R. Endothelial dysfunction: A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Mol. Basis Dis.* **2013**, *1832*, 2216–2231. [[CrossRef](#)]
7. Zhang, Z.; Yan, J.; Shi, H. Hyperglycemia as a Risk Factor of Ischemic Stroke. *J. Drug Metab. Toxicol.* **2014**, *4*, 153.
8. Sajja, R.K.; Prasad, S.; Cucullo, L. Impact of altered glycaemia on blood-brain barrier endothelium: An in vitro study using the hCMEC/D3 cell line. *Fluids Barriers CNS* **2014**, *11*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Simpson, I.A.; Appel, N.M.; Hokari, M.; Oki, J.; Holman, G.D.; Maher, F.; Koehler-Stec, E.M.; Vannucci, S.J.; Smith, Q.R. Blood-brain barrier glucose transporter: Effects of hypo- and hyperglycemia revisited. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 238–247. [[CrossRef](#)]
10. Guzik, T.J.; Mussa, S.; Gastaldi, D.; Sadowski, J.; Ratnatunga, C.; Pillai, R.; Channon, K.M. Mechanisms of Increased Vascular Superoxide Production in Human Diabetes Mellitus. Role of NAD(P)H Oxidase and Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation* **2002**, *105*, 1656–1662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hink, U.; Li, H.; Mollnau, H.; Oelze, M.; Matheis, E.; Hartmann, M.; Skatchkov, M.; Thaiss, F.; Stahl, R.A.K.; Warnholtz, A.; et al. Mechanisms Underlying Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Circ. Res.* **2001**, *88*, e14–e22. [[CrossRef](#)]
12. Mates, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **2000**, *153*, 83–104. [[CrossRef](#)]
13. Kassab, A.; Piwowar, A. Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes. *Biochimie* **2012**, *94*, 1837–1848. [[CrossRef](#)]
14. Takayama, T.; Wada, A.; Tsutamoto, T.; Ohnishi, M.; Fujii, M.; Isono, T.; Horie, M. Contribution of Vascular NAD(P)H Oxidase to Endothelial Dysfunction in Heart Failure and the Therapeutic Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitor. *Circ. J.* **2004**, *68*, 1067–1075. [[CrossRef](#)]
15. Giacco, F.; Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* **2011**, *107*, 1058–1070. [[CrossRef](#)]
16. Winkler, K.; Hermans, J.J.; Schiffers, P.; Moens, A.; Paul, M.; Schmidt, H.H. NOX1, 2, 4, 5: Counting out oxidative stress. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *164*, 866–883. [[CrossRef](#)]
17. Guzik, T.J.; West, N.E.J.; Black, E.; McDonald, D.; Ratnatunga, C.; Pillai, R.; Channon, K.M. Vascular Superoxide Production by NAD(P)H Oxidase: Association With Endothelial Dysfunction and Clinical Risk Factors. *Circ. Res.* **2000**, *86*, e85–e90. [[CrossRef](#)]

18. Sharma, A.; Rizky, L.; Stefanovic, N.; Tate, M.; Ritchie, R.H.; Ward, K.W.; de Haan, J.B. The nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) activator dh404 protects against diabetes-induced endothelial dysfunction. *Cardiovasc. Diabetol.* **2017**, *16*, 33. [[CrossRef](#)]
19. Cui, W.; Min, X.; Xu, X.; Du, B.; Luo, P. Role of Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 in Diabetic Nephropathy. *J. Diabetes Res.* **2017**, *2017*, 3797802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Liu, Y.; Zhang, L.; Liang, J. Activation of the Nrf2 defense pathway contributes to neuroprotective effects of phloretin on oxidative stress injury after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *J. Neurol. Sci.* **2015**, *351*, 88–92. [[CrossRef](#)]
21. Thorwald, M.A.; Godoy-Lugo, J.A.; Rodriguez, G.J.; Rodriguez, M.A.; Jamal, M.; Kinoshita, H.; Nakano, D.; Nishiyama, A.; Forman, H.J.; Ortiz, R.M. Nrf2-related gene expression is impaired during a glucose challenge in type II diabetic rat hearts. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *130*, 306–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Somade, O.T.; Ajayi, B.O.; Tajudeen, N.O.; Atunlute, E.M.; James, A.S.; Kehinde, S.A. Camphor elicits up-regulation of hepatic and pulmonary pro-inflammatory cytokines and chemokines via activation of NF- κ B in rats. *Pathophysiol. Off. J. Int. Soc. Pathophysiol.* **2019**, *26*, 305–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Carling, D. AMPK signalling in health and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2017**, *45*, 31–37. [[CrossRef](#)]
24. Eid, A.A.; Lee, D.Y.; Roman, L.J.; Khazim, K.; Gorin, Y. Sestrin 2 and AMPK connect hyperglycemia to Nox4-dependent endothelial nitric oxide synthase uncoupling and matrix protein expression. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 3439–3460. [[CrossRef](#)]
25. Jang, H.J.; Ridgeway, S.D.; Kim, J.A. Effects of the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on high-fat diet-induced insulin resistance and endothelial dysfunction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2013**, *305*, E1444–E1451. [[CrossRef](#)]
26. Mellor, D.D.; Madden, L.A.; Smith, K.A.; Kilpatrick, E.S.; Atkin, S.L. High-polyphenol chocolate reduces endothelial dysfunction and oxidative stress during acute transient hyperglycaemia in Type 2 diabetes: A pilot randomized controlled trial. *Diabet. Med.* **2012**, *30*, 478–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073S–2085S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Septembre-Malaterre, A.; Stanislas, G.; Douraguia, E.; Gonthier, M.P. Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Reunion French Island. *Food Chem.* **2016**, *212*, 225–233. [[CrossRef](#)]
29. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933–956. [[CrossRef](#)]
30. Umeno, A.; Horie, M.; Murotomi, K.; Nakajima, Y.; Yoshida, Y. Antioxidative and Antidiabetic Effects of Natural Polyphenols and Isoflavones. *Molecules* **2016**, *21*, 708. [[CrossRef](#)]
31. Yu, P.; Wang, L.; Tang, F.; Zeng, L.; Zhou, L.; Song, X.; Jia, W.; Chen, J.; Yang, Q. Resveratrol Pretreatment Decreases Ischemic Injury and Improves Neurological Function Via Sonic Hedgehog Signaling After Stroke in Rats. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 212–226. [[CrossRef](#)]
32. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747. [[CrossRef](#)]
33. Kawabata, K.; Yoshioka, Y.; Terao, J. Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules* **2019**, *24*, 370. [[CrossRef](#)]
34. Smadja, J.M.; Marodon, C. *Le Grand Livre des Plantes Médicinales de l'île de La Réunion Inscrites à la Pharmacopée Française*; Éditions Orphie: Saint Denis, France, 2016; p. 231.
35. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lavergne, R. *Tisaneurs et Plantes Médicinales Indigènes à la Réunion*; Éditions Orphie: Saint Denis, France, 2016; p. 435.
37. Septembre-Malaterre, A.; Le Sage, F.; Hatia, S.; Catan, A.; Janci, L.; Gonthier, M.P. Curcuma longa polyphenols improve insulin-mediated lipid accumulation and attenuate proinflammatory response of 3T3-L1 adipose cells during oxidative stress through regulation of key adipokines and antioxidant enzymes. *Biofactors* **2016**, *42*, 418–430. [[CrossRef](#)]
38. Le Sage, F.; Meilhac, O.; Gonthier, M.P. Anti-inflammatory and antioxidant effects of polyphenols extracted from *Antirhea borbonica* medicinal plant on adipocytes exposed to *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharides. *Pharmacol. Res.* **2017**, *119*, 303–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. 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 H₂O₂, TNF α and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismutase and NF-kappaB genes. *J. Inflamm. (London)* **2015**, *12*, 10.
40. 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**, e1900779. [[CrossRef](#)]
41. Hatia, S.; Septembre-Malaterre, A.; Le Sage, F.; Badiou-Beneteau, A.; Baret, P.; Payet, B.; Lefebvre d'Hellencourt, C.; Gonthier, M.P. Evaluation of antioxidant properties of major dietary polyphenols and their protective effect on 3T3-L1 preadipocytes and red blood cells exposed to oxidative stress. *Free Radic. Res.* **2014**, *48*, 387–401. [[CrossRef](#)]
42. Arcambal, A.; Taïlé, J.; Rondeau, P.; Viranaïcken, W.; Meilhac, O.; Gonthier, M.P. Hyperglycemia modulates redox, inflammatory and vasoactive markers through specific signaling pathways in cerebral endothelial cells: Insights on insulin protective action. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *130*, 59–70. [[CrossRef](#)]
43. Bainor, A.; Chang, L.; McQuade, T.J.; Webb, B.; Gestwicki, J.E. Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. *Anal. Biochem.* **2010**, *410*, 310–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bitar, M.S.; Wahid, S.; Mustafa, S.; Al-Saleh, E.; Dhaunsi, G.S.; Al-Mulla, F. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *511*, 53–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **2001**, *414*, 813–820. [[CrossRef](#)]
46. Obermeier, B.; Daneman, R.; Ransohoff, R.M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1584–1596. [[CrossRef](#)]
47. Ruskovska, T.; Massaro, M.; Carluccio, M.A.; Arola-Arnal, A. Systematic bioinformatic analysis of nutrigenomic data of flavanols in cell models of cardiometabolic disease. *Food Funct.* **2020**, *11*, 5040–5064. [[CrossRef](#)]
48. Motterlini, R.; Foresti, R.; Bassi, R.; Green, C.J. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28*, 1303–1312. [[CrossRef](#)]
49. Chen, F.; Qian, L.H.; Deng, B.; Liu, Z.M.; Zhao, Y.; Le, Y.Y. Resveratrol protects vascular endothelial cells from high glucose-induced apoptosis through inhibition of NADPH oxidase activation-driven oxidative stress. *CNS Neurosci. Ther.* **2013**, *19*, 675–681. [[CrossRef](#)]
50. Samoisy, A.K.; Mahomoodally, M.F. Ethnopharmacological analysis of medicinal plants used against non-communicable diseases in Rodrigues Island, Indian Ocean. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *173*, 20–38. [[CrossRef](#)]
51. Kim, J.M.; Lee, D.H.; Kim, J.S.; Lee, J.Y.; Park, H.G.; Kim, Y.J.; Oh, Y.K.; Jung, H.C.; Kim, S.I. 5,7-dihydroxy-3,4,6-trimethoxyflavone inhibits the inflammatory effects induced by *Bacteroides fragilis* enterotoxin via dissociating the complex of heat shock protein 90 and I kappaB alpha and I kappaB kinase-gamma in intestinal epithelial cell culture. *Clin. Exp. Immunol.* **2009**, *155*, 541–551. [[CrossRef](#)]
52. Gauvin-Bialecki, A.; Marodon, C. Essential oil of *Ayapana triplinervis* from Reunion Island: A good natural source of thymohydroquinone dimethyl ether. *Biochem. Syst. Ecol.* **2008**, *36*, 853–858. [[CrossRef](#)]
53. Wang, Y.; Wang, H.; Li, P.; Zhang, Q.; Kim, H.J.; Gee, S.J.; Hammock, B.D. Phage-displayed peptide that mimics aflatoxins and its application in immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2426–2433. [[CrossRef](#)]
54. Kang, B.; Kim, C.Y.; Hwang, J.; Jo, K.; Kim, S.; Suh, H.J.; Choi, H.S. Punicalagin, a Pomegranate-Derived Ellagitannin, Suppresses Obesity and Obesity-Induced Inflammatory Responses Via the Nrf2/Keap1 Signaling Pathway. *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**, *63*, e1900574. [[CrossRef](#)]
55. Deng, S.; West, B.J.; Jensen, C.J. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. *Food Chem.* **2010**, *122*, 267–270. [[CrossRef](#)]
56. Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernández-López, J.; Sendra, E.; Sayas-Barberá, E.; Pérez-Álvarez, J.A. Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 1217–1223. [[CrossRef](#)]

57. Rolo, A.P.; Palmeira, C.M. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *212*, 167–178. [[CrossRef](#)]
58. Chan, P.H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **2001**, *21*, 2–14. [[CrossRef](#)]
59. Ashafaq, M.; Raza, S.S.; Khan, M.M.; Ahmad, A.; Javed, H.; Ahmad, M.E.; Tabassum, R.; Islam, F.; Siddiqui, M.S.; Safhi, M.M.; et al. Catechin hydrate ameliorates redox imbalance and limits inflammatory response in focal cerebral ischemia. *Neurochem. Res.* **2012**, *37*, 1747–1760. [[CrossRef](#)]
60. Morris, G.P.; Wright, A.L.; Tan, R.P.; Gladbach, A.; Ittner, L.M.; Vissel, B. A Comparative Study of Variables Influencing Ischemic Injury in the Longa and Koizumi Methods of Intraluminal Filament Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148503. [[CrossRef](#)]
61. Ceriello, A.; dello Russo, P.; Amstad, P.; Cerutti, P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* **1996**, *45*, 471–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Tang, H.; Pan, C.S.; Mao, X.W.; Liu, Y.Y.; Yan, L.; Zhou, C.M.; Fan, J.Y.; Zhang, S.Y.; Han, J.Y. Role of NADPH oxidase in total salvianolic acid injection attenuating ischemia-reperfusion impaired cerebral microcirculation and neurons: Implication of AMPK/Akt/PKC. *Microcirculation* **2014**, *21*, 615–627. [[CrossRef](#)]
63. Shen, Y.; Croft, K.D.; Hodgson, J.M.; Kyle, R.; Lee, I.L.E.; Wang, Y.; Stocker, R.; Ward, N.C. Quercetin and its metabolites improve vessel function by inducing eNOS activity via phosphorylation of AMPK. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 1036–1044. [[CrossRef](#)]
64. Jiang, R.; Hodgson, J.M.; Mas, E.; Croft, K.D.; Ward, N.C. Chlorogenic acid improves ex vivo vessel function and protects endothelial cells against HOCl-induced oxidative damage, via increased production of nitric oxide and induction of Hmox-1. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *27*, 53–60. [[CrossRef](#)]
65. Rigoulet, M.; Yoboue, E.D.; Devin, A. Mitochondrial ROS generation and its regulation: Mechanisms involved in H(2)O(2) signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *14*, 459–468. [[CrossRef](#)]
66. Baret, P.; Septembre-Malaterre, A.; Rigoulet, M.; Lefebvre d’Hellencourt, C.; Priault, M.; Gonthier, M.P.; Devin, A. Dietary polyphenols preconditioning protects 3T3-L1 preadipocytes from mitochondrial alterations induced by oxidative stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 167–174. [[CrossRef](#)]
67. Carvalho, C.; Moreira, P.I. Oxidative Stress: A Major Player in Cerebrovascular Alterations Associated to Neurodegenerative Events. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 806. [[CrossRef](#)]
68. Le Sage, F.; Meilhac, O.; Gonthier, M.P. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces pro-inflammatory adipokine secretion and oxidative stress by regulating Toll-like receptor-mediated signaling pathways and redox enzymes in adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2017**, *446*, 102–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Williams, C.R.; Lu, X.; Sutliff, R.L.; Hart, C.M. Rosiglitazone attenuates NF-κB-mediated Nox4 upregulation in hyperglycemia-activated endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2012**, *303*, C213–C223. [[CrossRef](#)]
70. Kleinschnitz, C.; Grund, H.; Wingler, K.; Armitage, M.E.; Jones, E.; Mittal, M.; Barit, D.; Schwarz, T.; Geis, C.; Kraft, P.; et al. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol.* **2010**, *8*, e1000479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Weidig, P.; McMaster, D.; Bayraktutan, U. High glucose mediates pro-oxidant and antioxidant enzyme activities in coronary endothelial cells. *Diabetes Obes. Metab.* **2004**, *6*, 432–441. [[CrossRef](#)]
72. Mates, J.M.; Perez-Gomez, C.; Nunez de Castro, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **1999**, *32*, 595–603. [[CrossRef](#)]
73. Liu, P.; Yang, X.; Hei, C.; Meli, Y.; Niu, J.; Sun, T.; Li, P.A. Rapamycin Reduced Ischemic Brain Damage in Diabetic Animals Is Associated with Suppressions of mTOR and ERK1/2 Signaling. *Int. J. Biol. Sci.* **2016**, *12*, 1032–1040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Li, X.; Wang, H.; Gao, Y.; Li, L.; Tang, C.; Wen, G.; Zhou, Y.; Zhou, M.; Mao, L.; Fan, Y. Protective Effects of Quercetin on Mitochondrial Biogenesis in Experimental Traumatic Brain Injury via the Nrf2 Signaling Pathway. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0164237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Yan, W.; Wang, H.D.; Hu, Z.G.; Wang, Q.F.; Yin, H.X. Activation of Nrf2-ARE pathway in brain after traumatic brain injury. *Neurosci. Lett.* **2008**, *431*, 150–154. [[CrossRef](#)]
76. Arredondo, F.; Echeverry, C.; Abin-Carriquiry, J.A.; Blasina, F.; Antúnez, K.; Jones, D.P.; Go, Y.M.; Liang, Y.L.; Dajas, F. After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 738–747. [[CrossRef](#)]

77. 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. [[CrossRef](#)]
78. Nabavi, S.F.; Barber, A.J.; Spagnuolo, C.; Russo, G.L.; Daglia, M.; Nabavi, S.M.; Sobarzo-Sanchez, E. Nrf2 as molecular target for polyphenols: A novel therapeutic strategy in diabetic retinopathy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2016**, *53*, 293–312. [[CrossRef](#)]
79. Priestley, J.R.; Kautenburg, K.E.; Casati, M.C.; Endres, B.T.; Geurts, A.M.; Lombard, J.H. The NRF2 knockout rat: A new animal model to study endothelial dysfunction, oxidant stress, and microvascular rarefaction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2016**, *310*, H478–H487. [[CrossRef](#)]
80. Ito, H.; Gonthier, M.P.; Manach, C.; Morand, C.; Mennen, L.; Remesy, C.; Scalbert, A. Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. *Br. J. Nutr.* **2005**, *94*, 500–509. [[CrossRef](#)]
81. Gonthier, M.P.; Verny, M.A.; Besson, C.; Remesy, C.; Scalbert, A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1853–1859. [[CrossRef](#)]
82. Gonthier, M.P.; Donovan, J.L.; Texier, O.; Felgines, C.; Remesy, C.; Scalbert, A. Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *35*, 837–844. [[CrossRef](#)]
83. Rios, L.Y.; Gonthier, M.P.; Remesy, C.; Mila, I.; Lapiere, C.; Lazarus, S.A.; Williamson, G.; Scalbert, A. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 912–918. [[CrossRef](#)]
84. Spencer, J.P.; Abd-el-Mohsen, M.M.; Rice-Evans, C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: Implications for their bioactivity. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *423*, 148–161. [[CrossRef](#)]
85. Rodriguez-Mateos, A.; Toro-Funes, N.; Cifuentes-Gomez, T.; Cortese-Krott, M.; Heiss, C.; Spencer, J.P. Uptake and metabolism of (-)-epicatechin in endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *559*, 17–23. [[CrossRef](#)]
86. Kitagawa, S. Inhibitory effects of polyphenols on p-glycoprotein-mediated transport. *Biol. Pharmaceut. Bull.* **2006**, *29*, 1–6. [[CrossRef](#)]
87. Bansal, T.; Jaggi, M.; Khar, R.K.; Talegaonkar, S. Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2009**, *12*, 46–78. [[CrossRef](#)]
88. Szwajgier, D.; Borowiec, K.; Pustelniak, K. The Neuroprotective Effects of Phenolic Acids: Molecular Mechanism of Action. *Nutrients* **2017**, *9*, 477. [[CrossRef](#)]
89. Pinheiro Fernandes, F.D.; Fontenele Menezes, A.P.; de Sousa Neves, J.C.; Fonteles, A.A.; da Silva, A.T.; de Araújo Rodrigues, P.; Santos do Carmo, M.R.; de Souza, C.M.; de Andrade, G.M. Caffeic acid protects mice from memory deficits induced by focal cerebral ischemia. *Behav. Pharmacol.* **2014**, *25*, 637–647. [[CrossRef](#)]
90. 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.



V.2. Résultat 2 : “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.”

(**Taïlé J.**, Patché J., Veeren B., Gonthier M-P., *International Journal of Molecular Sciences*, Soumis).

L'étude précédente a mis en avant l'impact délétère de l'hyperglycémie sur la production de marqueurs redox, inflammatoires et vasoactifs sur des cellules endothéliales cérébrales. Ces cellules jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie cérébrale via leur implication dans la fonctionnalité de la BHE mais également dans le maintien de l'intégrité et de l'étanchéité de la BHE. Selon les données de la littérature, l'hyperglycémie induit un état pro-inflammatoire menant à la production de molécules d'adhésion favorisant ainsi le recrutement, l'adhésion puis la transmigration des monocytes à travers la barrière endothéliale. De plus, l'hyperglycémie est connue pour entraîner une altération de la perméabilité de la BHE via la dégradation des protéines des jonctions serrées qui sont notamment régulées par le facteur de transcription clé PPARγ. Par ailleurs, les cellules endothéliales expriment à leur surface des transporteurs d'efflux indispensables à la régulation de l'homéostasie cérébrale et plus particulièrement deux transporteurs d'efflux, que sont la P-gp et la BCRP.

Notre deuxième étude visait à évaluer les effets protecteurs des polyphénols (10 μM) sur la réponse inflammatoire, le recrutement monocyttaire, la perméabilité des cellules ainsi que sur la captation des polyphénols par les endothéliales cérébrales murines bEnd3 en condition d'hyperglycémie (33 mM de glucose).

Les résultats obtenus ont montré que l'hyperglycémie induit une élévation de l'activité transcriptionnelle de NFκB à différents de temps de traitement (3, 8 et 24 h), de la sécrétion de MCP-1 et de l'expression des gènes codant pour des médiateurs pro-inflammatoires, à savoir IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, iNOS. A l'inverse, la condition hyperglycémique réduit l'expression génique de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. La réponse pro-inflammatoire induite par l'hyperglycémie a entraîné une

augmentation de l'expression du gène codant pour la molécule d'adhésion E-sélectine, connue pour favoriser l'adhésion des monocytes puis leur transmigration endothéliale. Par ailleurs, nos résultats ont révélé que l'expression des gènes codant pour des jonctions serrées, à savoir occludine, claudine-5, ZO-1 et ZO-2 était réduite en condition hyperglycémique. L'utilisation d'une molécule fluorescente, le FITC-Dextran-4kD, a permis de démontrer que l'hyperglycémie a augmenté la perméabilité endothéliale. Les polyphénols extraits des plantes médicinales et les polyphénols purs ont exercé un effet protecteur, en diminuant l'activation de NFκB, la production de marqueurs pro-inflammatoires, le recrutement monocyttaire et la perméabilité endothéliale. Le facteur de transcription PPARγ est connu pour jouer un rôle protecteur important contre l'inhibition de NFκB et dans l'intégrité endothéliale. Nous avons montré que le préconditionnement des cellules endothéliales avec un agoniste de PPARγ a diminué l'activation de NFκB et la perméabilité endothéliale causées par l'hyperglycémie. A l'inverse, un antagoniste de PPARγ a aggravé les altérations induites par l'hyperglycémie. Alors que l'hyperglycémie a réduit le taux d'expression génique de PPARγ, les polyphénols extraits des 4 plantes médicinales ainsi que la quercétine et les acides caféique et chlorogénique ont protégé contre cette action délétère de l'hyperglycémie. Nous avons relevé que le degré de protection des extraits végétaux et des polyphénols purs dépendait de la nature de la plante médicinale, du composé phénolique et de la cible moléculaire. Pour comprendre cette variabilité dans les effets des polyphénols, nous avons étudié le niveau de captation des polyphénols par les cellules en conditions normoglycémique et hyperglycémique, en présence ou non d'inhibiteurs spécifiques des transporteurs d'efflux P-gp et BCRP. Nos données ont montré la présence d'acide caféique, de quercétine et de son métabolite méthylé généré par les cellules, à savoir l'isorhamnétine, au niveau intracellulaire alors que les acide chlorogénique et gallique n'y ont pas été retrouvés. De manière importante, nous avons trouvé que l'inhibiteur de BCRP a induit une accumulation de la quercétine et de l'isorhamnétine dans les cellules, suggérant son rôle dans l'efflux de ces polyphénols. De plus, tous les polyphénols ont été détectés liés à la membrane cytoplasmique des cellules. L'hyperglycémie a atténué l'interaction entre les cellules et les acides caféique, chlorogénique et gallique, indépendamment des transporteurs P-gp et BCRP suggérant l'existence de mécanismes/récepteurs membranaires de ces acides phénoliques sensibles à l'hyperglycémie. Les taux intracellulaires de quercétine et de son métabolite méthylé étaient 10 fois supérieurs à ceux mesurés pour l'acide caféique. Ce résultat

pourrait être lié au caractère plus lipophile des flavonoïdes comme la quercétine et l'isorhamnétine.

En conclusion, cette étude a démontré l'effet protecteur des extraits riches en polyphénols de plantes médicinales et des polyphénols de référence contre l'action délétère de l'hyperglycémie. Les polyphénols ont réduit la réponse pro-inflammatoire, le recrutement monocytaire et l'altération de la perméabilité endothéliale causés par l'hyperglycémie. Le degré de bioactivité variable des polyphénols pourrait être lié à la variabilité de leur degré de captation par les cellules endothéliales cérébrales.



Article

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

Janice Taïlé ¹, Jessica Patché ¹, Bryan Veeren ¹, Marie-Paule Gonthier ^{1,*}

¹ Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188, Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, La Réunion, France; janice.taile@univ-reunion.fr (J.T.); jessica.patche@univ-reunion.fr (J.P.); bryan.veeren@univ-reunion.fr (B.V.)

* Correspondence: marie-paule.gonthier@univ-reunion.fr (M.-P.G.) Tel.: +262 693 92 08 55

Abstract: 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 NFκB activity, deregulated the expression of IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, iNOS, IL-10 and E-selectin genes, raised MCP-1 secretion and elevated monocyte adhesion and transendothelial migration. High glucose decreased occludin, claudin-5, ZO-1 and 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. PPARγ agonist also attenuated these damages while PPARγ antagonist aggravated them, suggesting PPARγ protective action. Interestingly, polyphenols improved PPARγ gene expression lowered by high glucose. Moreover, polyphenols were detected at the intracellular level or membrane-bound to cells, with evidence for 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.

Citation: Taïlé, J.; Patché, J.; Veeren, B.; Gonthier M-P. 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**, *22*, x.

<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Received: date

Accepted: date

Published: date

Keywords: Cerebral endothelial cell; hyperglycemia; inflammation; permeability; polyphenols; medicinal plants

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The blood-brain barrier (BBB) is a crucial cellular barrier responsible for a strict regulation of paracellular permeability between the blood and the brain tissue [1,2]. Microvascular cerebral endothelial cells which compose the BBB are interconnected by tight junctions constituted with three major transmembrane proteins which are occludins, claudins and junctional adhesion proteins. Other tight junction proteins such as zona occludens-1 (ZO-1) and zona occludens-2 (ZO-2) are important for connecting transmembrane proteins with the cytoskeleton at the intracellular level. These multiprotein junctional complexes are essential to regulate paracellular permeability in order to maintain BBB tightness, and their production is strictly regulated via signaling pathways involving key transcriptional factors such as the nuclear factor kappa B (NFκB) and the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) [3-7]. Cerebral endothelial cells also

express various families of drug efflux transport proteins and particularly two major efflux transporters which are the P-glycoprotein (Pgp) and the breast cancer resistance protein (BCRP) that restrict substances penetrating the brain [8]. Indeed, these extra- and intracellular components limit permeability to low molecular mass molecules and increase barrier electrical resistance. Of note, gelatinolytic matrix metalloproteinases (MMP) and particularly MMP-2 and MMP-9 play a major role in various disorders and mainly in diabetes case via the degradation of intercellular junction proteins, leading to BBB disruption [9,10]. Furthermore, it is well known that during type 2 diabetes, hyperglycemic condition leads to vascular endothelial inflammation through the activation of NF κ B which increases the production of pro-inflammatory cytokines including tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukins like interleukin-1 beta (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) as well as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) [11]. Moreover, hyperglycemia-associated inflammation induces an overproduction of cell adhesion molecules in endothelial cell surface such as endothelial-leukocyte adhesion molecule (E-selectin) promoting the adherence and the transendothelial migration of circulating monocytes and other inflammatory cells through the BBB [12,13]. Additionally, pro-inflammatory cytokine secretion leads to a reduction of Pgp and BCRP expression and activities [14]. Taken together, these vascular endothelial dysfunctions lead to the BBB impairment.

Plant polyphenols are the most abundant antioxidants provided by the human diet. Among them, flavonoids such as quercetin and phenolic acids like caffeic, chlorogenic and gallic acids are the most consumed [15]. Several studies reported that dietary polyphenols exert beneficial health effects through metabolic and anti-inflammatory actions that target the endothelium and improve the vascular function [16-19]. Polyphenols also constitute the active substances present in many medicinal plants. Recently, we showed that polyphenols extracted from four medicinal plants referenced in the French Pharmacopeia for antidiabetic properties, namely *Antirhea borbonica*, *Ayapana triplinervis*, *Dodonaea viscosa* and *Terminalia bentzoe*, attenuate oxidative stress and the alteration of vasoactive markers production in cerebral endothelial cells during hyperglycemic condition. Quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids that we detected as major polyphenols in these medicinal plant extracts exhibit similar protective properties [20,21]. However, the impact of these polyphenolic plant extracts on the inflammatory response and permeability of cerebral endothelial cells remains poorly elucidated.

The present study aimed to determine the protective effects of medicinal plant polyphenols on inflammatory and permeability markers as well as monocyte recruitment on cerebral endothelial cells exposed to hyperglycemic condition. The characterized polyphenol-rich extracts from *A. borbonica*, *A. triplinervis*, *D. viscosa* and *T. bentzoe* plants, and pure quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids identified as predominant phytochemicals were tested. In an innovative way, the uptake of polyphenols by cerebral endothelial cells was evaluated by comparing their intracellular and membrane-bound levels, in presence or not of specific inhibitors targeting Pgp and BCRP efflux transporters.

2. Results

The composition of the characterized polyphenol-rich extracts from *A. borbonica*, *A. triplinervis*, *D. viscosa* and *T. bentzoe* plants, as well as the polyphenols quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids used for the experiments are presented on Figure 1.

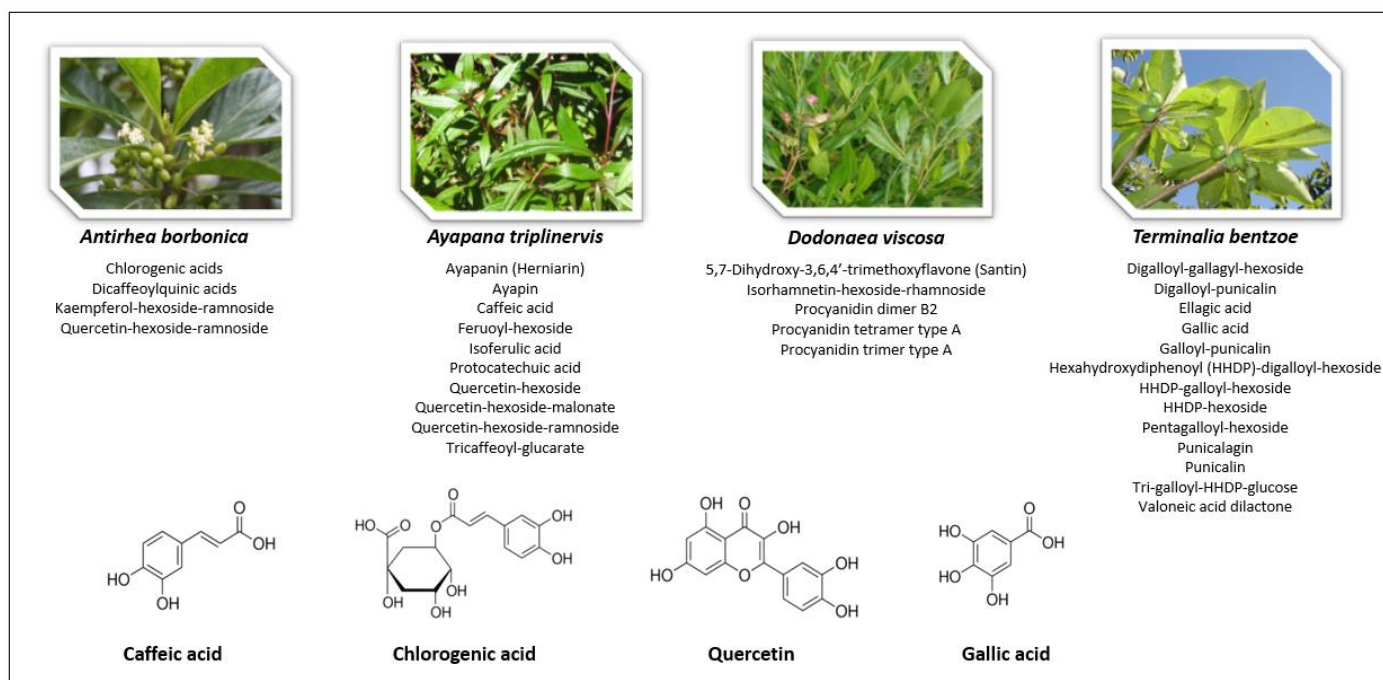


Figure 1. Polyphenol-rich medicinal plant extracts and pure polyphenols tested. The polyphenols present in the extracts obtained from *A. borbonica*, *A. triplinervis*, *D. viscosa* and *T. bentzoe* medicinal plants were previously identified [21]. Caffeic acid, chlorogenic acid and quercetin derivatives were detected as main polyphenols present in *A. borbonica*, *A. triplinervis* and *D. viscosa* plants, while gallic acid derivatives were detected in *T. bentzoe* plant. Consistently, pure quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids were used as control polyphenols in the experiments.

2.1. Effect of hyperglycemic condition and polyphenols on the production of inflammatory markers on cerebral endothelial cells

During diabetes, hyperglycemia may mediate pro-inflammatory effects via the activation of the transcriptional factor NF κ B that regulates the expression of genes coding for cytokines. We evaluated NF κ B transcriptional activity in cells exposed to normoglycemic or hyperglycemic condition, in presence or not of polyphenols for 3 h (Figure 2A), 8 h (Figure 2B) and 24 h (Figure 2C). Results show that high glucose condition significantly elevated the transcriptional activity of NF κ B from 3-24 h. All polyphenol-rich plant extracts and pure polyphenols counteracted the increase in NF κ B activity mediated by hyperglycemic condition.

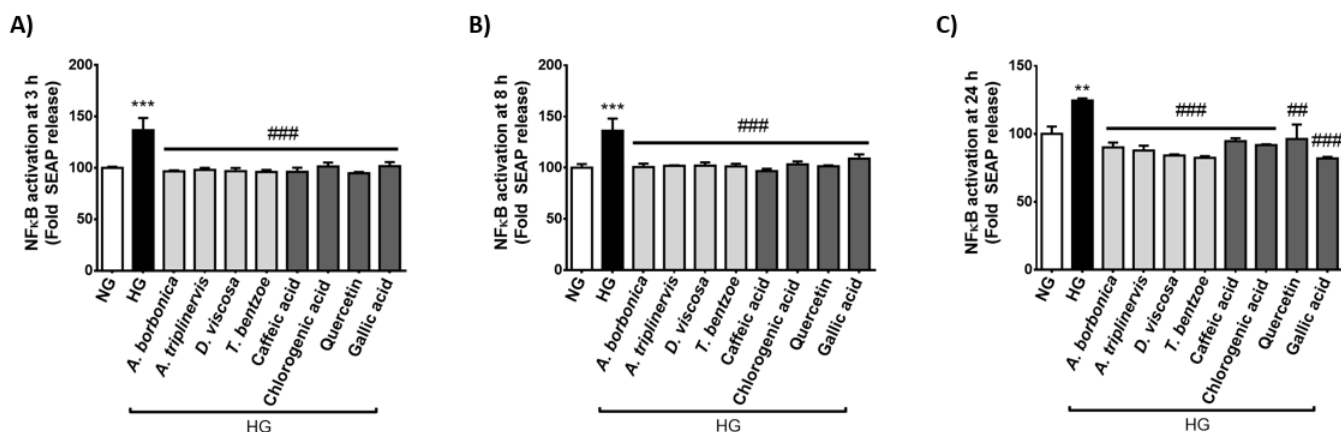


Figure 2. Effect of hyperglycemic condition and polyphenols on the transcriptional activity of NF κ B in cerebral endothelial cells. Cells were exposed to normoglycemic condition (NG) or hyperglycemic condition (HG) in the

presence or not of each polyphenol-rich plant extract (10 μ M GAE) or a pure polyphenol (10 μ M). NF κ B/SEAP activity was determined by Quanti-Blue assay at 3 h (A), 8 h (B) and 24 h (C). Data are means \pm SEM of three independent experiments (three cellular passages). **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.005$ as compared to NG; #: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.005$ as compared to HG.

Concordantly, results from RT-qPCR analysis indicate that hyperglycemic condition led to an up-regulated expression of the genes encoding the pro-inflammatory markers IL-1 β (Figure 3A), IL-6 (Figure 3B), TNF- α (Figure 3C), COX-2 (Figure 3D) and iNOS (Figure 3E). Conversely, high glucose condition down-regulated the expression of the gene coding for the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Figure 3F). *A. borbonica* extract reduced TNF- α and COX-2 gene expression while it raised IL-10 gene expression. *A. triplinervis* extract decreased IL-1 β , IL-6, COX-2 and iNOS gene expression. *D. viscosa* extract attenuated IL-6 and COX-2 gene expression whereas it improved IL-10 gene expression. *T. bentzoe* extract led to a reduction of IL-1 β , IL-6 and COX-2 gene expression. Gallic acid improved the production of all the inflammatory markers studied. Caffeic acid also modulated the expression of genes coding for all markers, except for iNOS. Chlorogenic acid reduced the expression of IL-1 β , IL-6, COX-2 and iNOS genes. Quercetin lowered the expression of TNF- α and iNOS genes, and elevated that of IL-10 gene.

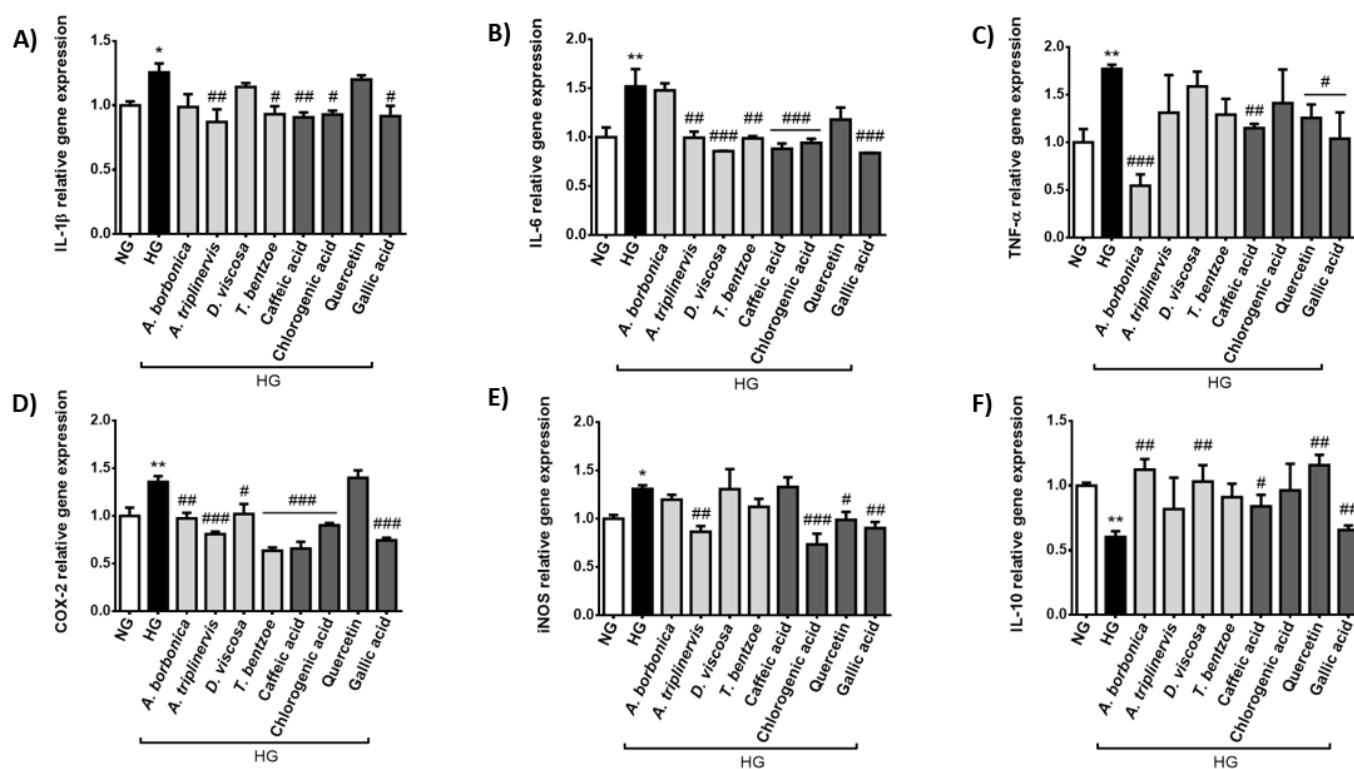


Figure 3. Effect of hyperglycemic condition and polyphenols on the inflammatory response of cerebral endothelial cells. Cells were exposed to normoglycemic condition (NG) or hyperglycemic condition (HG) in presence or not of each polyphenol-rich plant extract (10 μ M GAE) or a pure polyphenol (10 μ M). Relative expression of genes coding for IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α (C), COX-2 (D), iNOS (E) and IL-10 (F) was measured by RT-qPCR and normalized to GAPDH gene expression. Data are means \pm SEM of three independent experiments (three cellular passages). *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ as compared to NG; #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.005$ as compared to HG.

In order to assess the effect of hyperglycemic condition and polyphenols on the production of inflammatory markers involved in endothelial cell and leukocyte interaction, MCP-1 secreted levels (Figure 4A) and E-selectin gene expression rate (Figure 4B) were measured. We found that hyperglycemic condition induced a 3-fold increase in MCP-1 release. All polyphenol-rich plant extracts and pure polyphenols significantly decreased

MCP-1 secretion mediated by hyperglycemic condition. High glucose also led to an elevation of E-selectin gene expression while *A. borbonica*, *A. triplinervis* and *D. viscosa* extracts as well as chlorogenic acid and quercetin protected against this deleterious action of hyperglycemic condition. Collectively, these data suggest the ability of polyphenol-rich plant extracts and pure polyphenols to attenuate the pro-inflammatory response of cerebral endothelial cells caused by hyperglycemic condition. The extent of the anti-inflammatory action of polyphenols depended on the nature of the plant extract, phenolic compound and inflammatory marker considered.

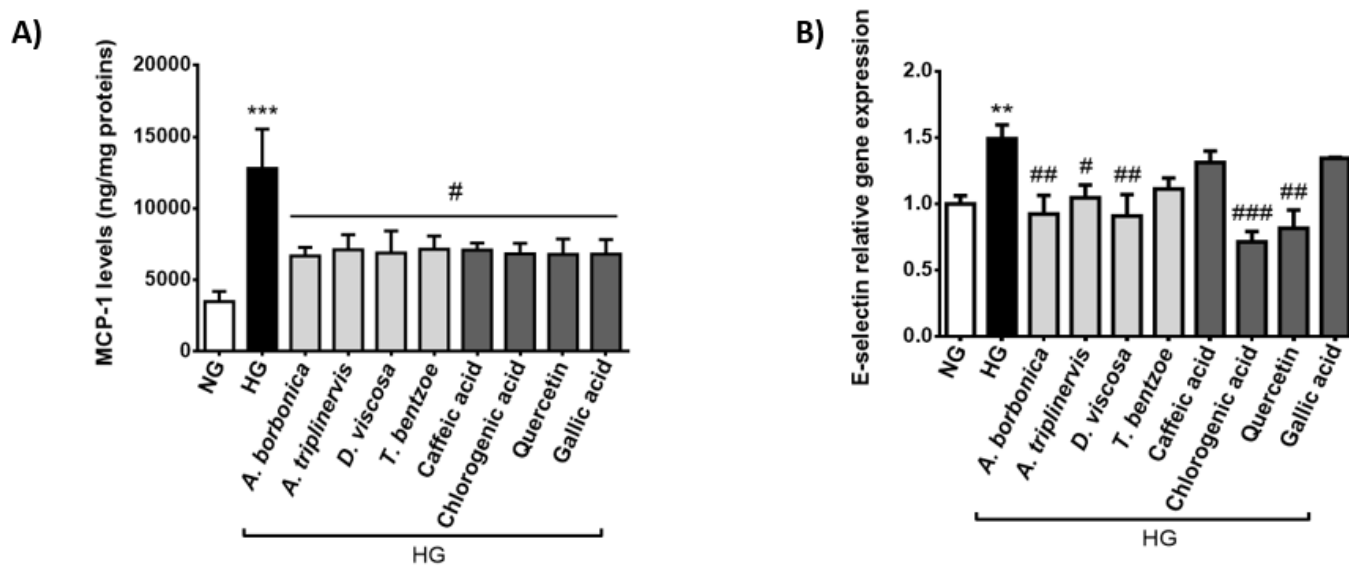


Figure 4. Effect of hyperglycemic condition and polyphenols on markers involved in endothelial cell and leukocyte interaction. Cells were exposed to normoglycemic condition (NG) or hyperglycemic condition (HG) in presence or not of each polyphenol-rich plant extract (10 μ M GAE) or a pure polyphenol (10 μ M). The secretion of MCP-1 was measured by ELISA kit (A). The expression of E-selectin gene was measured by RT-qPCR and normalized to GAPDH gene expression (B). Data are means \pm SEM of three independent experiments (three cellular passages). **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.005$ as compared to NG; #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.005$ as compared to HG.

2.2. Effect of hyperglycemic condition and polyphenols on the monocyte adhesion and transendothelial migration

Hyperglycemia is reported to promote the adhesion of monocytes on cerebral endothelial cells, leading to monocyte transendothelial migration. We determined the effect of polyphenols on THP-1 monocyte adhesion on bEnd3 cerebral endothelial cell during high glucose exposure of 3 h (Figure 5A), 8 h (Figure 5B) and 24 h (Figure 5C). Results demonstrate that high glucose led to a significant elevation of monocyte adhesion from 3–24 h. Polyphenols exerted a protective effect by decreasing monocyte adhesion induced by hyperglycemic condition. Noticeably, polyphenol action was dependent on the nature of the medicinal plant or phenolic compound tested and was also time-dependent. Indeed, polyphenol-rich extract from *D. viscosa* reduced monocyte adhesion from 3–8 h but was inefficient at 24 h, in contrast to the three other plant extracts which exhibited protective properties from 3–24 h similarly to chlorogenic and gallic acids. While caffeic acid and quercetin did not modulate monocyte adhesion at 3 h, they were able to attenuate it from 8–24 h, underlining the possibility for different cellular accessibility rates or mechanisms of action. In parallel, we found that the monocyte transendothelial migration was significantly increased during a 24-h high glucose exposure (Figure 5D). All polyphenol-rich plant extracts and pure polyphenols exerted a protective role by limiting the monocyte transendothelial migration mediated by hyperglycemic condition.

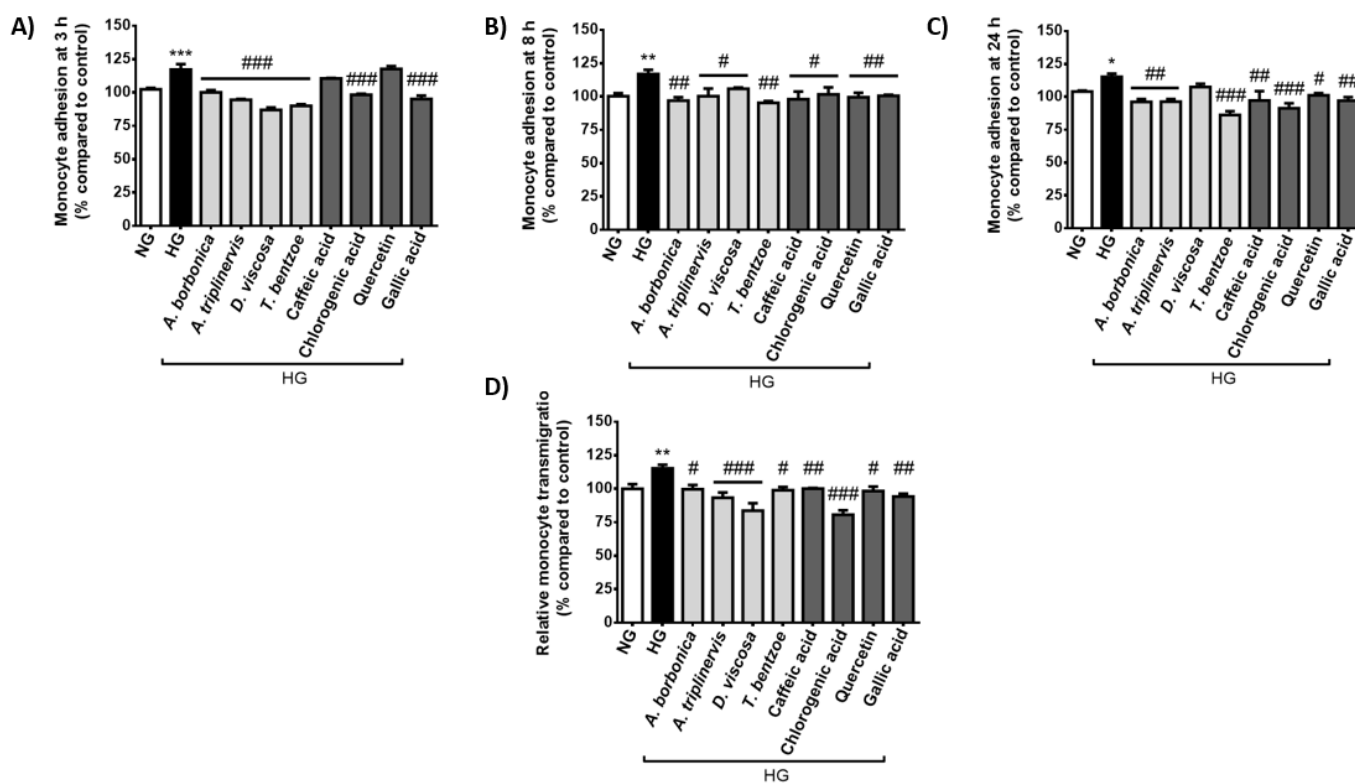


Figure 5. Effect of hyperglycemic condition and polyphenols on monocyte adhesion and transendothelial migration. Cells were exposed to normoglycemic condition (NG) or hyperglycemic condition (HG) in presence or not of each polyphenol-rich plant extract (10 μ M GAE) or a pure polyphenol (10 μ M). Adhesion of THP-1 cells on bEnd3 cerebral endothelial cells was measured at 3 h (A), 8 h (B) and 24 h (C). Transendothelial migration of THP-1 cells through bEnd3 cellular barrier was determined at 24 h (D). Data are means \pm SEM of three independent experiments (three cellular passages). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.005$, as compared to NG; #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.005$ as compared to HG.

2.3. Effect of hyperglycemic condition and polyphenols on the production of permeability markers on cerebral endothelial cells

The tight junctions occludin, claudin-5, ZO-1 and ZO-2 play a critical role for maintaining the restrictive paracellular permeability of the BBB. We assessed the impact of high glucose concentration on the endothelial permeability to FITC-Dextran and the expression of genes encoding tight junctions. Results show that hyperglycemic condition led to an increased FITC-Dextran permeability reaching $127.01 \pm 1.30\%$ (Figure 6A). Moreover, RT-qPCR data demonstrate that high glucose caused a down-regulation of the expression of genes coding for occludin (Figure 6B), claudin-5 (Figure 6C), ZO-1 (Figure 6D) and ZO-2 (Figure 6E). Importantly, all polyphenol-rich plant extracts and pure polyphenols counteracted the deleterious effect of hyperglycemic condition on FITC-Dextran permeability and claudin-5 gene expression. Regarding occludin gene expression, all polyphenols tested exerted a protective action, except quercetin. Concerning ZO-1 gene expression, polyphenol-rich plant extracts, caffeic and chlorogenic acids counteracted high glucose effect. For ZO-2 gene expression, all plant extracts except *T. bentzoe* extract, and the pure compounds caffeic, chlorogenic and gallic acids reversed the action of hyperglycemic condition. Thus, here again the extent of the protective action of polyphenols was dependent on the nature of the plant extract, phenolic compound and tight junction marker tested.

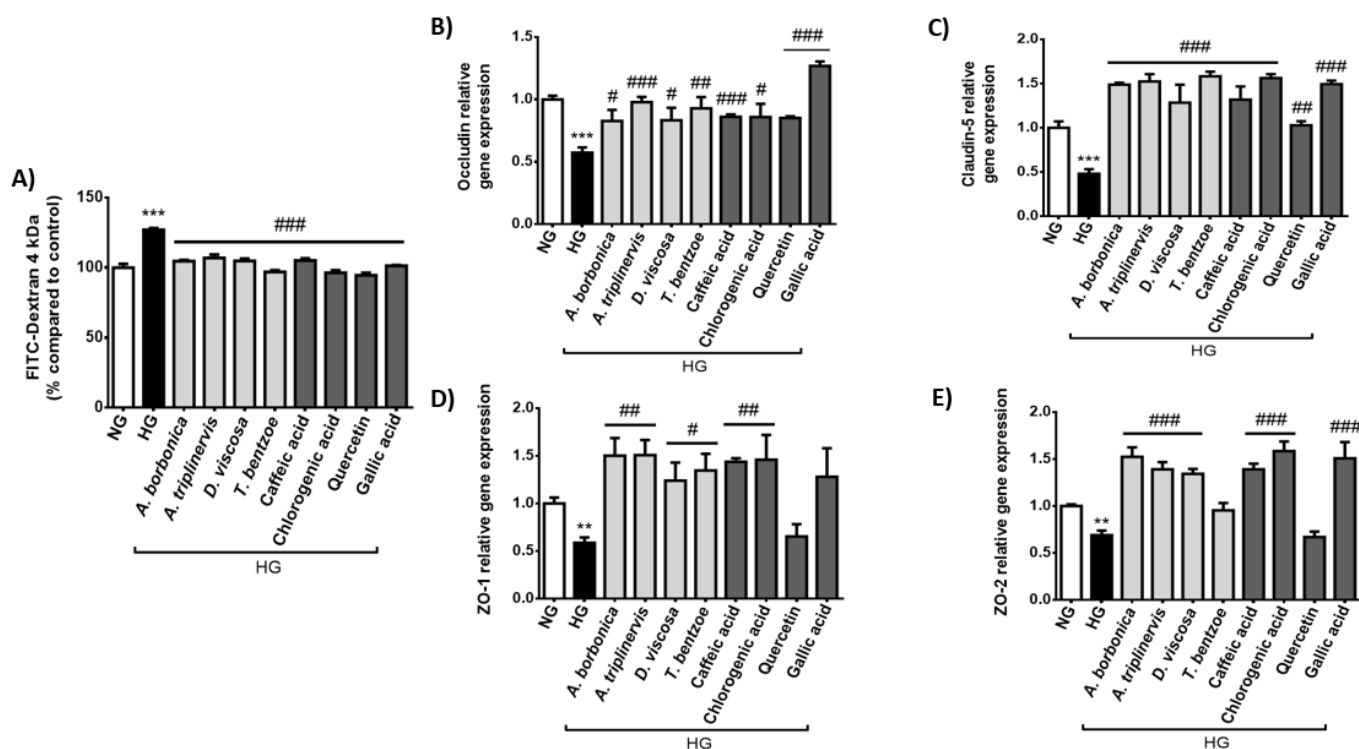


Figure 6. Effect of hyperglycemic condition and polyphenols on the permeability and the expression of genes coding tight junction proteins in cerebral endothelial cells. Cells were exposed to normoglycemic condition (NG) or hyperglycemic condition (HG) in presence or not of each polyphenol-rich plant extract (10 μ M GAE) or a pure polyphenol (10 μ M). The endothelial permeability (A) was determined through FITC-Dextran assay. Relative expression of genes coding for occludin (B), claudin-5 (C), ZO-1 (D) and ZO-2 (E) was measured by RT-qPCR and normalized to GAPDH gene expression. Data are means \pm SEM of three independent experiments (three cellular passages). **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.005$ as compared to NG; #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.005$ as compared to HG.

2.4. Effect of PPAR γ agonist and antagonist on the inflammatory and permeability alterations caused by hyperglycemic condition on cerebral endothelial cells

The transcriptional factor PPAR γ has been reported to protect the BBB integrity via improvement of tight junction proteins. We assessed the effect of PPAR γ agonist (Pioglitazone) or antagonist (GW9662) on markers of the inflammatory response and permeability changes induced by hyperglycemic condition, by measuring NF κ B transcriptional activity and FITC-Dextran permeability. Results show that PPAR γ agonist blocked high glucose-mediated activation of NF κ B while PPAR γ antagonist aggravated it (Figure 7A). Additionally, PPAR γ agonist protected against FITC-Dextran permeability elevation promoted by hyperglycemic condition whereas PPAR γ antagonist exacerbated it (Figure 7B). This suggests the protective role of PPAR γ against the inflammatory and permeability alterations induced by hyperglycemic condition on cerebral endothelial cells. Interestingly, all polyphenol-rich plant extracts as well as quercetin, caffeic and chlorogenic acids significantly protected against PPAR γ gene expression down-regulation caused by hyperglycemic condition (Figure 7C).

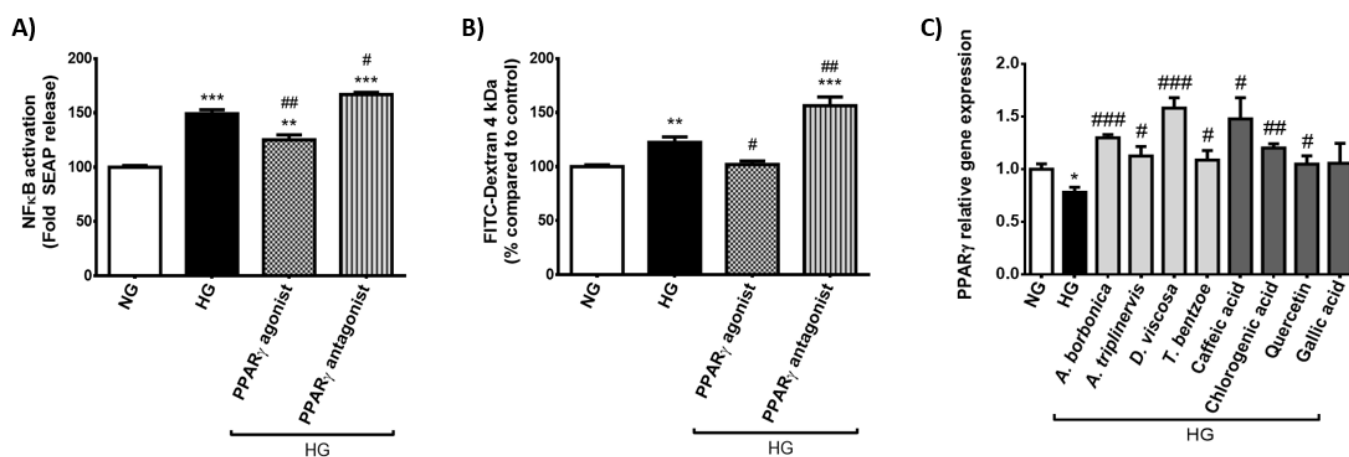


Figure 7. Effect of PPAR γ agonist and antagonist on the inflammatory and permeability alterations caused by hyperglycemic condition in cerebral endothelial cells. Cells were exposed to normoglycemic condition (NG) or hyperglycemic condition (HG) in presence or not of PPAR γ agonist or antagonist (10 μ M) for 3 h. NF κ B/SEAP activity (A) and the endothelial permeability (B) were determined by Quanti-Blue and FITC-dextran assays, respectively. In parallel, cells were exposed to normoglycemic condition (NG) or hyperglycemic condition (HG) in presence or not of each polyphenol-rich plant extract (10 μ M GAE) or a pure polyphenol (10 μ M) for 3 h. Relative expression of PPAR γ gene was measured by RT-qPCR and normalized to GAPDH gene expression (C). Data are means \pm SEM of three independent experiments (three cellular passages). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.005$ as compared to NG; #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.005$ as compared to HG.

2.5. Detection of polyphenols at the intracellular level or membrane-bound to cerebral endothelial cells in normoglycemic or hyperglycemic condition

There is still a lack of data regarding the molecular mechanisms involved in the uptake of polyphenols by cells. Both Pgp and BCRP are main efflux transporters regulating the BBB paracellular permeability. To determine whether these transporters could be implicated in the interaction between polyphenols and cerebral endothelial cells, bEnd3 cells were exposed to pure quercetin, caffeic, chlorogenic or gallic acids in normoglycemic or hyperglycemic condition, in presence or not of Pgp or BCRP specific inhibitor. Then, polyphenols present at the intracellular level or membrane-bound to cells were extracted and identified by mass spectrometry. Data show that quercetin, its methylated metabolite isorhamnetin produced by cells and caffeic acid were present at the intracellular level while chlorogenic and gallic acids were not detected in cells (Table). The methylated metabolite of caffeic acid, namely ferulic acid, was targeted during mass spectrometry analysis but not detected. Intracellular caffeic acid concentrations ranging 2 nM in normoglycemic condition were not significantly different during high glucose condition, in presence or not of Pgp and BCRP inhibitors. Intracellular levels of quercetin reaching 15 nM in normoglycemic condition were also not significantly changed in hyperglycemic condition. However, they were elevated in presence of BCRP inhibitor in normoglycemic or hyperglycemic condition. Similarly, intracellular isorhamnetin concentrations depicted 3 to 5-fold higher than those of parent quercetin were increased in presence of BCRP inhibitor during normoglycemic or hyperglycemic condition. The presence of Pgp inhibitor did not modulate intracellular levels of caffeic acid, quercetin and isorhamnetin. These data suggest a higher accumulation of both flavonoids quercetin and isorhamnetin in cells during BCRP inhibition and thus an involvement of BCRP in their efflux. Furthermore, all polyphenols were detected membrane-bound to cerebral endothelial cells. Concerning caffeic acid, its membrane-bound concentrations were 10-fold higher than those measured from the intracellular compartment and significantly reduced by hyperglycemic condition, in presence or not of Pgp and BCRP inhibitors. A similar decrease in the membrane-bound levels of chlorogenic and gallic acids was depicted during hyperglycemic condition, in presence or

not of Pgp and BCRP inhibitors. Oppositely, membrane-bound concentrations of quercetin and isorhamnetin were not changed by hyperglycemic condition, in presence or not of Pgp and BCRP inhibitors. Altogether, these findings raise the possibility that high glucose condition attenuated the interaction of the phenolic acids caffeic, chlorogenic and gallic acids with cerebral endothelial cells, independently of Pgp and BCRP efflux transporters. In parallel, hyperglycemic condition did not impact the interaction of cells with the flavonoids quercetin and its methylated metabolite isorhamnetin, despite their efflux may involve BCRP transporter.

Table. Concentrations of polyphenols detected at the intracellular level or membrane-bound to cerebral endothelial cells.

Concentration (nM)	NG	NG + Pgpi	NG + BCRPi	HG	HG + Pgpi	HG + BCRPi
Intracellular						
Caffeic acid	2.11 ± 0.02	1.91 ± 0.14	1.91 ± 0.24	1.96 ± 0.19	1.65 ± 0.36	1.60 ± 0.15
Chlorogenic acid	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Gallic acid	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Quercetin	15.70 ± 1.14	18.68 ± 1.51	24.36 ± 1.70**	17.36 ± 0.80	21.77 ± 0.08	39.00 ± 9.27#
Isorhamnetin	58.59 ± 7.92	57.22 ± 8.13	124.64 ± 13.09**	65.22 ± 2.49	76.24 ± 9.55	158.49 ± 22.51##
Membrane-bound						
Caffeic acid	26.18 ± 2.74	21.06 ± 4.22	18.00 ± 2.67	14.25 ± 2.80*	14.26 ± 1.96*	17.74 ± 3.52*
Chlorogenic acid	16.25 ± 0.94	12.38 ± 3.28	11.33 ± 1.86	7.70 ± 0.90*	5.73 ± 0.26*	9.06 ± 3.00*
Gallic acid	30.03 ± 3.75	26.43 ± 8.81	28.57 ± 8.31	12.35 ± 2.55*	13.11 ± 2.27*	10.21 ± 2.17*
Quercetin	11.13 ± 2.23	9.14 ± 3.16	7.00 ± 2.94	8.81 ± 1.81	8.08 ± 3.97	9.85 ± 4.50
Isorhamnetin	69.14 ± 18.60	57.74 ± 17.78	86.24 ± 9.08	46.17 ± 8.69	50.12 ± 17.01	76.52 ± 14.28

Cells were preconditioned or not with 5 µM of one efflux transporter inhibitor targeting Pgp (Pgpi) or BCRP (BCRPi) in normoglycemic (NG) or hyperglycemic (HG) condition. After 1 h, quercetin, caffeic acid, chlorogenic acid or gallic acid (10 µM) was added for 3 h. Next, the polyphenols present at the intracellular level or membrane-bound to cells were extracted and identified by mass spectrometry. Peak intensities were plotted against the corresponding standard concentrations used to build the calibration curves. Intracellular and membrane-bound concentrations of polyphenols measured were expressed as nM of quercetin, caffeic, chlorogenic or gallic acids. Isorhamnetin levels were expressed as nM of quercetin equivalent. Data are means ± SEM of three independent experiments (three cellular passages). *: p<0.05 and **: p<0.01 as compared to NG; #: p<0.05, ##: p<0.01 as compared to HG. nd: not detected.

3. Discussion

Hyperglycemia has been reported to alter the function of cerebral endothelial cells from the BBB, aggravating the risk of cerebrovascular complications such as stroke during diabetes [22,23]. There is still a lack of therapeutic strategies aiming to improve hyperglycemia-induced cerebral endothelial dysfunctions. This study provides evidence for the

protective effect of polyphenols on inflammatory and permeability markers on murine bEnd3 cerebral endothelial cells exposed to hyperglycemic condition. Our choice of the immortalized bEnd3 cell line is in line with literature data reporting its suitability for a mimetic system of the BBB permeability, in respect of the production of tight junction proteins and a variety of transporters including the efflux transporters Pgp and BCRP as well as glucose transporter type 1 (GLUT-1) [24,25]. The experimental hyperglycemia was mimicked by high glucose concentration (33 mM) and conducted in a time-dependent manner from 3-24 h, given that it caused time-dependent oxidative stress and deregulation of vasoactive markers without affecting the viability of bEnd3 cells in our previous studies [20,26]. Four characterized polyphenol-rich extracts from the French medicinal plants *A. borbonica*, *A. triplinervis*, *D. viscosa* and *T. bentzoe*, and their predominant polyphenols quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids were assessed, since we previously showed that they exhibited antioxidant properties on bEnd3 cells during hyperglycemic condition [21]. These polyphenolic plant extracts were prepared from the leaves which constitute the most traditionally collected plant compartments used for herbal remedies [27], despite here a pharmacological approach was achieved by using aqueous-acetonic extraction to enrich polyphenolic fractions [21]. Accordingly, a pharmacological dose of 10 μ M of polyphenols was used. This dose is broadly reported in literature [28]. Even if it is considered higher than circulating levels of polyphenols close to 1 μ M in nutritional studies [29], our published data indicated an absence of cytotoxic action on bEnd3 cells in our experimental conditions [21]. Thus, the biological effects of polyphenols observed in the present study could not be related to an alteration of the cellular viability.

First, our results demonstrate that hyperglycemic condition caused inflammatory alterations associated with monocyte adhesion and transendothelial migration, and the anti-inflammatory action of polyphenols. More particularly, high glucose induced a pro-inflammatory response through an increased NF κ B transcriptional activity, an altered expression of genes coding for IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, COX-2 and iNOS. These findings are consistent with literature data showing that diabetes/hyperglycemia-related vascular injury involves the activation of the transcriptional factor NF κ B as a pivotal dynamic system initiating the production of pro-inflammatory mediators [6,30,31]. In unstimulated cells, NF κ B is inactive in the cytoplasm when bound to the I κ B inhibitor protein. During inflammatory conditions mediated by stimuli such as high glucose-induced oxidative stress, the enzyme I κ B kinase is activated by reactive oxygen species (ROS) and phosphorylates I κ B. This phosphorylation of I κ B causes its rapid degradation by the proteasome and leads to NF κ B release and translocation into the nucleus. At the nuclear level, NF κ B binds to specific sequences of the promoter regions of target genes encoding pro-inflammatory cytokines comprising IL-1 β , IL-6, TNF- α whose the production is subsequently up-regulated. Oppositely, NF κ B down-regulates the expression of genes coding for anti-inflammatory factors like IL-10 [32]. In agreement with our findings, several literature data reported the deleterious action of hyperglycemia on the activation of NF κ B and pro-inflammatory cytokines production in endothelial cells, despite cerebral endothelial cells remain poorly studied [30,31,33]. Besides the control of cytokines synthesis, NF κ B enhances the production of enzymes like COX-2 and iNOS which generate mediators of inflammation. Our results indicate that high glucose condition increased COX-2 and iNOS gene expression in cerebral endothelial cells. This is consistent with published data reporting hyperglycemia-induced NF κ B nuclear translocation and up-regulation of COX-2 and iNOS in endothelial cells [31,34]. While COX-2 produces arachidonic acid-derived prostaglandin E2 known to maintain the inflammatory activation of the endothelium, iNOS promotes nitric oxide synthesis which contributes to oxidative stress and endothelial nitric oxide synthase uncoupling, reducing vasodilation [35]. In addition, IL-1 β has been reported to stimulate both COX-2 and iNOS, resulting in enhanced pro-inflammatory response [36]. Aljofan and Ding [37] demonstrated that hyperglycemia provokes oxidative stress through ROS overproduction in microvascular endothelial cells. Specific inhibition of COX-2 abolishes this deleterious action of hyperglycemia. Four main

regulatory pathways of ROS production and their links to diabetes/hyperglycemia and microvascular complications are known and include the increased intracellular production of advanced glycation end products, the stimulation of protein kinase C (PKC), the elevated flux of polyol and the activation of hexosamine pathway during glucose metabolism [31]. Given that endothelial cells take up glucose passively via the insulin-independent GLUT-1 and thus cannot limit glucose transport rate during hyperglycemia, the microvascular endothelium constitutes a major target of hyperglycemic damage via oxidative stress and related inflammation [33]. Xing and co-workers [38] reported the activation of NF κ B-dependent inflammatory pathway with higher levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α as well as iNOS and COX-2 activation in the aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. Interestingly, pre-treatment of diabetic rats with the antioxidant flavonoid troxerutin reduces the diabetes-mediated elevation of both iNOS and COX-2 as well as cytokines production via NF κ B inhibition. Other families of polyphenols such as anthocyanins and phenolic acids were found to alleviate endothelial dysfunctions by exerting antioxidant, anti-inflammatory and vasorelaxant effects [17,18,33,39-41]. Similarly, we recently reported that hyperglycemia-mediated oxidative stress in bEnd3 cerebral endothelial cells is prevented by a pharmacological inhibitor of NF κ B or polyphenolic extracts from *A. borbonica*, *A. triplinervis*, *D. viscosa* and *T. bentzoe* as well as pure quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids [21]. This may contribute to explain here why such polyphenols exhibited protective properties by reducing pro-inflammatory alterations caused by hyperglycemic condition. Mechanistically, it was found that polyphenols such as quercetin, caffeic and chlorogenic acids acting as ROS scavengers counteract NF κ B nuclear translocation by inhibiting I κ B phosphorylation in human umbilical endothelial cells exposed to hyperglycemia [42] and in *ex vivo* aortic vessel model exposed to oxidative stress [17]. Moreover, the anti-inflammatory benefits of polyphenols may result from their ability to activate the redox-sensitive nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) that itself down-regulates NF κ B and cytokines gene expression [43]. Concordantly, our published studies provided evidence for the capacity of the polyphenol-rich plant extracts and pure polyphenols tested here, to improve Nrf2 production altered in *in vitro* and *in vivo* models of inflammatory conditions mediated by hyperglycemia or bacterial lipopolysaccharides [20,21,44]. These results emphasize the high biological interest of antioxidants such as polyphenols to block the critical regulatory loop between oxidative stress and inflammation well documented in literature [32].

The present study demonstrates that high glucose condition led to a higher MCP-1 secretion and an up-regulated E-selectin gene expression in cerebral endothelial cells. Concordantly, we found that monocyte adhesion to cerebral endothelial cells and transendothelial migration were enhanced in hyperglycemic condition. These results are in line with literature data showing that pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α activate the endothelium and promote the recruitment of monocytes to the site of injury via MCP-1 release and the production of adhesive molecules like E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) [45,46]. If MCP-1 mediates the chemotaxis step, E-selectin is involved in the early steps of leukocyte recruitment at the endothelial surface, namely tethering and rolling. Then, these steps lead to leukocyte adhesion to the activated endothelium via ICAM-1-induced bonds with integrins which induce arrest of inflammatory cells at the vascular surface. In parallel, VCAM-1 mediates firm adhesion by recruiting blood cells by the activated endothelium [47]. Given that a raised synthesis of cell adhesion molecules is associated with atherosclerosis [48], there is an important interest to develop pharmacological strategies to attenuate adhesive molecules production in order to limit the process of atherosclerosis and related vascular damage. Several polyphenols have been reported to modulate leukocyte adhesion and transendothelial migration in experimental models of inflammation-mediated endothelial dysfunctions and atherosclerosis [16,18,19]. Nevertheless, polyphenol effect on monocyte recruitment by cerebral endothelial cells during hyperglycemia remains poorly investigated. For the first time, our results provide evidence for the capacity of the

polyphenolic extracts from *A. borbonica*, *A. triplinervis*, *D. viscosa* and *T. bentzoe* plants to reduce monocyte adhesion on cerebral endothelial cells and transendothelial migration in hyperglycemic condition. This could be related to the ability of plant polyphenols to attenuate high glucose-mediated pro-inflammatory response described above, and to decrease MCP-1 and E-selectin production. In accordance with literature data obtained for other polyphenolic families [16,18,33], quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids were found to exert protective effects, and thus could contribute here to the bioactivity of the plant extracts that improved the inflammatory response of cells in hyperglycemic condition.

Many studies have reported that hyperglycemia increases brain injury and the incidence of worse outcome in stroke [22,23]. Among the molecular mechanisms responsible for vascular damage and the BBB disruption in diabetes-associated hemorrhagic transformation in ischemic stroke, the deregulation of tight junctions is well documented. Occludin, claudins and ZO represent key tight junction proteins regulating the paracellular permeability. Occludin and claudins bind to each other in the intercellular cleft and further associate to ZO which in turn link to the cytoskeleton via the actin/myosin system [1,49]. Our study demonstrates that hyperglycemic condition increased the permeability to FITC-Dextran marker and decreased the production of occludin, claudin-5, ZO-1 and ZO-2 tight junctions in cerebral endothelial cells. Consistently, literature data reported the deleterious action of diabetes/hyperglycemia on the BBB permeability damage associated with diminished tight junctions on *in vitro* and *in vivo* models of stroke. Mechanistically, hyperglycemia was shown to alter various markers such as Nrf2 and hypoxia-inducible factor-1 involved in oxidative stress [50-52], PKC signaling pathway [53], microRNAs-related inflammation [54], MMP activities [55] and tight junction-associated extracellular vesicles release [56]. Consequently, antioxidant and anti-inflammatory molecules including the polyphenols quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids were reported as relevant pharmacological strategies helping to improve the BBB integrity, despite their action has been poorly investigated in diabetic condition [41,57-59]. In an innovative way, our study highlights the capacity of the polyphenolic plant extracts and pure polyphenols tested to counteract high glucose deleterious action on cerebral endothelial cells, by decreasing FITC-Dextran permeability and improving tight junctions production. Such protective effects of polyphenols could be attributed to their ability described above to decrease the activation of NF κ B, the production of cytokines and monocyte recruitment in hyperglycemic condition, and thus to attenuate the endothelial dysfunction and permeability damage. Importantly, our study demonstrates that PPAR γ agonist decreased high glucose-mediated NF κ B activation and permeability alteration, while PPAR γ antagonist aggravated them. This result suggests the protective action of PPAR γ and agrees with literature data reporting the key role of PPAR γ in the protection of the cerebrovascular endothelium during stroke [60]. While PPAR γ knockdown is associated with a higher cerebral infarct volume [61], PPAR γ activation reduces the death of ischemic neurons by inhibiting oxidative stress [62]. Moreover, PPAR γ pathway may improve stroke outcomes in diabetic condition by decreasing neuroinflammation via NF κ B inhibition and preserving the BBB integrity via tight junctions production [6,7]. PPAR γ was also cited as a possible therapeutic target for the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury [6,63]. Interestingly, our findings demonstrate that the four polyphenolic medicinal plant extracts as well as quercetin, caffeic and chlorogenic acids improved PPAR γ production that was lowered by high glucose. Such a positive regulation of PPAR γ by these polyphenols may constitute a novel mechanism of action helping to understand their protective effects against inflammatory and permeability alterations of cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition.

Noticeably, the present study underlines the possibility of a differential bioactivity extent of polyphenols on inflammatory and permeability markers, depending on the nature of the plant extract, phenolic compound and molecular target tested. Polyphenol structure-activity relationships were particularly documented for the antioxidant capacity

of flavonoids and phenolic acids [64]. The differential bioactivity extent of polyphenols may also result from a differential cellular accessibility rate or a differential interaction with cerebral endothelial cells. To assess polyphenol uptake in cells treated with pure quercetin, caffeic, chlorogenic or gallic acids, we compared the intracellular and membrane-bound levels of polyphenols in normoglycemic or hyperglycemic condition, in presence or not of inhibitors of main Pgp and BCRP efflux transporters. Quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids were detected membrane-bound to cells, while only caffeic acid, quercetin and its methylated metabolite isorhamnetin produced by cells were present in cells. The flavonoid quercetin, characterized by a more lipophilic structure than phenolic acids like caffeic acid [15], was detected at intracellular levels 10-fold higher than those of caffeic acid. This suggests the capacity of quercetin to cross the cellular membrane more easily than the phenolic acids tested and thus structure-uptake relationships. The low intracellular concentration of caffeic acid could account for the absence or undetectable level of ferulic acid, expected as a major methylated metabolite of caffeic acid [29]. We previously detected caffeic and ferulic acids in the infarcted cerebral hemisphere of mice intraperitoneally-treated with caffeic acid or *A. borbonica* plant extract, during an experimental stroke combined with hyperglycemia [20]. Other authors depicted phenolic acids including caffeic and gallic acids [65] as well as flavonoids such as quercetin [66] at nanomolar concentrations in the brain, providing evidence for their capacity to pass through the BBB. Based on cellular models, polyphenol uptake was found to be time-dependent [67] and limited for esterified molecules like chlorogenic acid due to the esterification of caffeic acid moiety composing chlorogenic acid [68]. This may explain here why chlorogenic acid was undetected in cerebral endothelial cells. At our best knowledge, our findings show for the first time that hyperglycemic condition attenuated the interaction of the phenolic acids caffeic, chlorogenic and gallic acids with cerebral endothelial cells, independently of Pgp and BCRP efflux transporters. Further studies will be needed to decipher the molecular mechanisms/possible membrane receptors induced by these phenolic acids and that could be deregulated in hyperglycemic condition. In parallel, our data indicate that hyperglycemic condition did not impact the interaction of cells with the flavonoids quercetin and isorhamnetin, despite their efflux may involve BCRP transporter. Functional BCRP has been detected in bEnd3 cerebral endothelial cells and reported to regulate the paracellular tightness [8]. According to literature data, quercetin and isorhamnetin also exert inhibitory effects on BCRP efflux function and may be candidates for potentiating drug delivery in the brain [69,70]. The detection of isorhamnetin, known to originate from the methylation of quercetin [29], shows the capacity of cerebral endothelial cells to metabolize quercetin in normoglycemic or hyperglycemic condition, and suggests the possible contribution of isorhamnetin to the biological effects of quercetin. Consistent with vascular protection, isorhamnetin was shown to protect human brain microvascular endothelial cells from oxidative stress-mediated NF κ B activation and apoptosis [71], and to improve hyperglycemia and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats [72]. It will be important to assess the biological effects of the polyphenol-rich medicinal plant extracts in *in vivo* condition, in order to better consider the metabolic fate of polyphenols and evaluate their potential as promising reagents for improving hyperglycemia and ischemia-induced cerebrovascular damage.

4. Materials and Methods

4.1. Preparation and characterization of polyphenol-rich medicinal plant extracts

The medicinal plants collected in Réunion Island (France) and botanically identified at the University of Réunion Island with voucher number were *A. borbonica* (Rubiaceae, RUN052-F), *A. triplinervis* (Asteraceae, TCN-P061), *T. bentzoe* (Combretaceae, TCN-P009) and *D. viscosa* (Sapindaceae, TCN-P028). Plants declaration to the Nagoya protocol for

Access and Benefit-Sharing Clearing-House was also performed (ABSCH-IRCC-FR-252879-1). Medicinal plant leaves were reduced to powder after airflow drying at 45°C. Then, each plant powder (2 g) was dissolved in 10 mL of an aqueous-acetonic solution (70%, v/v, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). The mixture obtained was incubated at 4°C for 90 min, centrifuged at 1,400 g at 4°C for 20 min. Polyphenol-rich supernatants were collected and stored at -80°C until analysis. According to the method previously published [44], an ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis (UPLC-ESI-MS-MS, Agilent Technologies, Les Ulis, France) was achieved to identify polyphenols present in the medicinal plant extracts. The medicinal plants *A. triplinervis*, *D. viscosa*, *A. borbonica* and *T. bentzoe* were found to exhibit total polyphenol contents reaching 0.6, 3.2, 3.4 and 8.1 g gallic acid equivalent (GAE)/100 g of plants, respectively. Caffeic acid, chlorogenic acid and quercetin derivatives were detected as main polyphenols present in *A. borbonica*, *A. triplinervis* and *D. viscosa* plants, while gallic acid derivatives were detected in *T. bentzoe* plant [21]. Consistently, pure quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids were used as control polyphenols in the experiments, and these chemical compounds were purchased from Sigma Aldrich (St-Louis, MO, USA).

4.2. Cell culture

Murine bEnd3 cerebral endothelial cells (ATCC® CRL-2299™, Manassas, VA, USA) and human THP-1 monocytic cells (ATCC® TIB-202™, Manassas, VA, USA) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 25 mM glucose, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 5 mM L-glutamine, 50 µU/mL penicillin and 2 µg/mL streptomycin (Pan Biotech, Dutscher, Brumath, France). A transfection of bEnd3 cells with the plasmid pNiFty-secreted alkaline phosphatase (pNiFty2-SEAP, InvivoGen, Toulouse, France) was performed to produce bEnd3-blue cell line model using lipofectamine 3000 (ThermoFischer Scientific, Les Ulis, France) and selection with Zeocin™ at 200 µg/mL (InvivoGen, Toulouse, France) during 3 weeks, according to the previously published method [20]. Five specific NFκB repeated transcription factor binding sites, an endothelial cell-leukocyte adhesion molecule proximal promoter and a SEAP reporter gene were contained on the pNiFty2-SEAP plasmid. bEnd3-blue cells were cultured in complete DMEM containing 200 µg/mL of Zeocin™. Cells were placed in an incubator at 37°C and 5% of CO₂.

4.3. Evaluation of NFκB activation

bEnd3-blue cells expressing NFκB/SEAP reporter gene, were cultured in a 96-well plate (1.8 × 10⁴ cells/well) in DMEM containing 5.5 mM of glucose (normoglycemic condition) for 24 h. Next, the medium was removed and cells were treated for 3, 8 or 24 h with each polyphenol-rich plant extract (10 µM GAE) or with a pure polyphenol, namely quercetin, caffeic, chlorogenic or gallic acids (10 µM) in hyperglycemic condition (33 mM glucose) or in normoglycemic condition (5.5 mM glucose). NFκB activation was evaluated through the measurement of NFκB/SEAP activity by using Quanti-Blue assay (InvivoGen, Toulouse, France), followed by absorbance measurement at 620-655 nm (FLUOstar Omega, Bmg Labtech, Cambridge, UK). For NFκB activation measurement in cells which were exposed to PPARγ agonist or antagonist, cells were preincubated with 10 µM of PPARγ agonist (Pioglitazone, Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) or PPARγ antagonist (GW9662, Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) in a humidified atmosphere (5% of CO₂, 37°C) for 1 h in normoglycemic condition. Then, cells were co-treated with PPARγ agonist or antagonist (10 µM) and high glucose level for 8 h. As described above, NFκB/SEAP activity was determined by Quanti-Blue assay and fluorescence measurement.

4.4. Evaluation of relative gene expression

bEnd3 cells were cultured in a 6-well plate (3.5×10^5 cells/well) in DMEM containing 5.5 mM of glucose (normoglycemic condition) for 24 h. Next, the medium was removed and cells were treated for 3 h with each polyphenol-rich plant extract (10 μ M GAE) or with a pure polyphenol, namely quercetin, caffeic, chlorogenic or gallic acids (10 μ M) in hyperglycemic condition (33 mM glucose) or in normoglycemic condition (5.5 mM glucose). An isolation of total RNA was performed with TRIzol™ (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France) and 4 μ g of RNA were reverse-transcribed (RT) using Random hexamer primers (Eurogentec, Liège, Belgium) with Superscript™ II (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France). Subsequently, the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was achieved using fast SYBR green™ master mix (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France). cDNA fragment was amplified by PCR using the following specific primers: claudin-5: GCT-GGC-GCT-GGT-GGC-ACT-CTT-TGT (forward), GGC-GAA-CCA-GCA-GAG-CGG-CAC (reverse); cyclooxygenase-2 (COX-2): TTT-GTT-GAG-TCA-TTC-ACC-AGA-CAG-AT (forward), CAG-TAT-TGA-GGA-GAA-CAG-ATG-GGA-TT (reverse); E-selectin: TCT-GGA-CCT-TTC-CAA-AAT-GG (forward), TGC-AAG-CTA-AAG-CCC-TCA-TT (reverse); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): TTC-ACC-ACC-ATG-GAG-AAG-GC (forward), GGC-ATG-GAC-TGT-GGT-CAT-GA (reverse); IL-1 β : GAC-CTT-CCA-GGA-TGA-GGA-CA (forward), AGC-TCA-TAT-GGG-TCC-GAC-AG (reverse); IL-6: CAA-GAG-ACT-TCC-ATC-CAG-TTG-C (forward), TTG-CCG-AGT-AGA-TCT-CAA-AGT-GAC (reverse); IL-10: ACC-TCC-TCC-ACT-GCC-TTG-CT (forward), GGT-TGC-CAA-GCC-TTA-TCG-GA (reverse); inducible nitric oxide synthase (iNOS): GCA-GCC-TGT-GAG-ACC-TTT-G (forward), GCA-TTG-GAA-GTG-AAG-CGT-TTC (reverse); occludin: CAC-ACT-TGC-TTG-GGA-CAG-AGG (forward), TGA-GCC-GTA-CAT-AGA-TCC-AGA-AG (reverse); PPAR γ : AAA-CTC-TGG-GAG-ATT-CTC-CT (forward), TGG-CAT-CTC-TGT-GTC-AAC (reverse); TNF- α : CTT-CTG-TCT-ACT-GAA-CTT-CGG-G (forward), CAG-GCT-TGT-CAC-TCG-AAT-TTT-G (reverse); ZO-1: GCT-GTC-CCT-GTG-AGT-CCT-TC (forward), TGC-CAG-GTT-TTA-GGG-TCA-CA (reverse); ZO-2: AGA-AGA-ACC-TCC-GCA-AGA-GC (forward), GCC-TCA-CGG-TAT-TCA-ACC-GA (reverse). Raw data were analyzed using CFX Manager software (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) and GAPDH gene expression was used for the normalization of target genes.

4.5. Quantification of cytokine secretion

bEnd3-blue cells were cultured in a 6-well plate (3.5×10^5 cells/well) in DMEM containing 5.5 mM glucose (normoglycemic condition) for 24 h. The medium was removed and cells were treated for 24 h with each polyphenol-rich plant extract (10 μ M GAE) or with a pure polyphenol, namely quercetin, caffeic, chlorogenic or gallic acids (10 μ M) in hyperglycemic condition (33 mM glucose) or in normoglycemic condition (5.5 mM glucose). Next, cell culture media were collected and analyzed using Mouse MCP-1 ELISA kit (eBioscience, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France). Concerning the extraction of cellular proteins, 700 μ L of phosphate buffer saline (PBS) were added to each well. After scrapping, cells were collected and centrifuged at 500 g for 4 min at 25 °C. Supernatants were removed and an addition of 200 μ L of lysis buffer (Tris 25mM pH 8.3, KCl 10 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, protease inhibitors 1 X) was done. After resuspension of cell pellet in lysis buffer, a novel centrifugation was achieved at 500 g for 4 min at 25°C, and supernatants containing proteins were collected. Total protein contents were determined using the bicinchoninic acid assay (BCA) [73].

4.6. Evaluation of endothelial permeability

bEnd3 cells were cultured in a 24-cell culture inserts (1×10^5 cells/insert, 0.4 μm pore size Millicell® Cell Culture Inserts, Merck Millipore, Guyancourt, France) in DMEM containing 5.5 mM glucose (normoglycemic condition) during 24 h. At confluence, the medium was removed and cells were treated for 24 h with each polyphenol-rich plant extract (10 μM GAE) or with a pure polyphenol, namely quercetin, caffeic, chlorogenic or gallic acids (10 μM) in hyperglycemic condition (33 mM glucose) or in normoglycemic condition (5.5 mM glucose). Then, cells were rinsed with PBS and Fluorescein IsoThioCyanate-Dextran (FITC-Dextran, 4 kDa, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) diluted in Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI, Pan Biotech, Dutscher, Brumath, France) was added to the inner chamber, while RPMI medium without FITC-Dextran was added to the outer chamber. In order to determine the cellular permeability, the quantity of FITC-Dextran that has crossed was measured every 15 min for 1 h at an excitation wavelength of 492 nm and an emission wavelength of 520 nm (FLUOstar Optima, Bmg Labtech, Cambridge, UK). For endothelial permeability measurement in cells which were exposed to PPAR γ agonist or antagonist, cells were pre-incubated with 10 μM of PPAR γ agonists (Pioglitazone, Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) or PPAR γ antagonist (GW9662, Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) in a humidified atmosphere (5% of CO $_2$, 37°C) for 1 h in normoglycemic condition. Then, cells were exposed to PPAR γ agonist or antagonist (10 μM) in hyperglycemic condition for 24 h. The following steps were performed as described above, and fluorescence was measured at the excitation and emission wavelengths of 492 and 520 nm, respectively (FLUOstar Optima, Bmg Labtech, Cambridge, UK).

4.7. Evaluation of monocyte adhesion on cerebral endothelial cells

The rate of monocyte adhesion was assessed by measuring the oxidation of the fluorogenic probe 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France), according to the published method slightly modified [74]. Briefly, bEnd3 cells were cultured in a 96-well plate (1.8×10^4 cells/well) in DMEM containing 5.5 mM glucose (normoglycemic condition) during 24 h. Next, the medium was removed and cells were treated for 3, 8 and 24 h with each polyphenol-rich plant extract (10 μM GAE) or with a pure polyphenol, namely quercetin, caffeic, chlorogenic or gallic acids (10 μM) in hyperglycemic condition (33 mM glucose) or in normoglycemic condition (5.5 mM glucose). Then, bEnd3 cells were rinsed twice with PBS and a first measurement of fluorescence was performed (Fb: unlabeled fluorescence) at an excitation and emission wavelengths of 492 and 520 nm, respectively (FLUOstar Optima, Bmg Labtech, Cambridge, UK). Then, THP-1 cells were incubated for 15 min with BCECF-AM fluorescent probe (20 μM in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) medium, Pan Biotech, Dutscher, Brumath, France). After a centrifugation at 400 g for 5 min at 25°C, 100 μL of a 10^5 fluorescent THP-1/mL cell suspension in RPMI medium were added. A second measurement of fluorescence was performed (Ft: total fluorescence) and cells were further co-incubated in a humidified atmosphere (5% of CO $_2$, 37°C), for 1 h. Next, non-adhering THP-1 cells were washed away using HBSS, and a measurement of the intensity of fluorescent adherent THP-1 cells was achieved (Fr: remaining fluorescence). Monocyte adhesion percentage was calculated according to the following formula:

$$\text{Adhesion (\%)} = \frac{\text{Fr} - \text{Fb}}{\text{Ft} - \text{Fb}} \times 100$$

4.8. Evaluation of monocyte transendothelial migration

bEnd3 cells were cultured in 12-cell culture inserts (12×10^4 cells/insert, $0.4 \mu\text{m}$ pore size, Millicell® Cell Culture Inserts, Merck Millipore, Guyancourt, France) in DMEM containing 5.5 mM glucose (normoglycemic condition) for 24 h. Next, at confluence, the medium was removed and cells were treated for 24 h with each polyphenol-rich plant extract ($10 \mu\text{M}$ GAE) or with a pure polyphenol, namely quercetin, caffeic, chlorogenic or gallic acids ($10 \mu\text{M}$) in hyperglycemic condition (33 mM glucose) or in normoglycemic condition (5.5 mM glucose). Next, based on Milenkovic et al. method [75] slightly modified, THP-1 cells were incubated for 15 min with BCECF-AM fluorescent probe ($20 \mu\text{M}$ in HBSS medium, Pan Biotech, Dutscher, Brumath, France). bEnd3 cells were rinsed twice with PBS. A density of 5×10^4 fluorescent THP-1 cells in $100 \mu\text{L}$ final volume of RPMI (Pan Biotech, Dutscher, Brumath, France) was added to the upper chamber and a solution of 10 ng/mL of MCP-1 (Standard Mouse MCP-1 recombinant protein, eBioscience, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France) in RPMI was added in the lower chamber, for a co-incubation of 3 h in a humidified atmosphere (5% of CO_2 , 37°C). The intensity of fluorescent THP-1 cells crossing bEnd3 cells was measured in the lower chamber at an excitation wavelength of 492 nm and an emission wavelength of 520 nm (FLUOstar Optima, Bmg Labtech, Cambridge, UK).

4.9. Evaluation of polyphenols uptake by cerebral endothelial cells

bEnd3 cells were cultured in a 6-well plate (3.5×10^5 cells/well) in DMEM containing 5.5 mM of glucose (normoglycemic condition) during 24 h. Then, the medium was removed and cells were preconditioned or not with $5 \mu\text{M}$ of one efflux transporter inhibitor targeting Pgp (Valspodar, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) or BCRP (KO143, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) in normoglycemic (5.5 mM glucose) or hyperglycemic condition (33 mM glucose). After 1 h, quercetin, caffeic, chlorogenic or gallic acids ($10 \mu\text{M}$) was added for 3 h. Next, cell culture medium was removed and 1 mL of PBS was added to rinse cells twice. On one hand, to collect polyphenols which were possibly membrane-bound to cells, $500 \mu\text{L}$ of 0.4% bovine serum albumin in PBS solution (w/v) were added and samples were stored in tubes during 45 min at 4°C . An addition of $500 \mu\text{L}$ of methanol/HCl (200 mM) was performed in each tube to extract polyphenols from cellular components. On the other hand, to collect polyphenols at the intracellular level, 1 mL of methanol/HCl (200 mM) was added to detach cells with the help of a scraper. Samples were collected and stored in tubes during 45 min at 4°C . Next, all samples originating from the membrane-bound fraction or from the intracellular compartment were spiked with $5 \mu\text{L}$ of the internal standard syringic acid ($1 \mu\text{M}$) and centrifuged at $14,000 \text{ g}$ during 5 min at 4°C . Supernatants containing polyphenols were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and Heated Electrospray Ionization (HESI)-Orbitrap mass spectrometer (Q Exactive Plus, ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France), according to the method we previously described [20]. Mass spectra were registered in full scan mode from m/z 100 to 1500 in negative ion mode. Polyphenols were identified according to their exact mass, retention time and MS/MS analysis. Data were acquired by XCalibur 4.0 software (Thermo Fisher Scientific Inc., Les Ulis, France). For quantitation, a mix of standard solutions of quercetin, caffeic, ferulic, chlorogenic, gallic and syringic acids was prepared in methanol with concentrations ranging $0.005\text{--}10 \mu\text{M}$. In parallel, two quality control samples were analyzed in duplicate within each batch, together with two blank samples containing methanol. The intensity of peaks was plotted against the corresponding standard concentrations to establish the calibration curves. Internal standard recovery was determined similarly. Calibration curves were built according to the method published [20].

4.10. Statistical analysis

Experiments were performed in three independent experiments (cellular passages) and data were expressed as means \pm SEM. Statistical analysis was performed by using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's multiple comparison test. Significant differences were considered for a p value <0.05 according to the Program GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

5. Conclusions

This study demonstrates the protective effect of polyphenol-rich extracts from four French medicinal plants as well as quercetin, caffeic, chlorogenic and gallic acids on cerebral endothelial cells exposed to an experimental hyperglycemia. Polyphenols attenuated pro-inflammatory and permeability alterations, decreased monocyte recruitment and improved the deregulation of NF κ B/PPAR γ pathways caused by hyperglycemic condition. The bioactivity extent of polyphenols depended on the nature of the polyphenol-rich plant extract, phenolic compound and molecular target considered. Importantly, polyphenols were detected at the intracellular level or membrane-bound to cerebral endothelial cells, with evidence for BCRP efflux transporter involvement. Therefore, these findings highlight the capacity of polyphenols to protect cerebral endothelial cells in hyperglycemic condition, and their relevance for the development of innovative pharmacological strategies aiming to improve cerebrovascular injury and stroke recovery during diabetes.

Author Contributions: J.T. and M.-P.G. were responsible for the conception and the design of the study. J.T., J.P., B.V. and M.-P.G. were involved in the acquisition of data. J.T. and M.-P.G. contributed to the analysis and the interpretation of results. All authors were involved in drafting the manuscript and gave final approval for the submission of the manuscript.

Funding: This research was funded by the European Regional Development Funds RE0001897 and GURDTI 2018-1828-0002370 (EU-Région Réunion-French State national counterpart), the University of La Réunion and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Janice Tailé is a recipient of a fellowship from the Région Réunion.

Acknowledgments: The authors thank Prof Jacqueline Smadja and Prof. Anne Gauvin-Bialecki from the University of La Réunion for contributing to the collection and the botanical identification of the medicinal plants. The authors thank Dr. Pascale Krejbich-Trotot from the University of La Réunion for the gift of THP-1 cells.

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

Abbreviations

<i>A. borbonica</i>	<i>Antirhea borbonica</i>
<i>A. triplinervis</i>	<i>Ayapana triplinervis</i>
BBB	blood-brain barrier
BCA	bicinchoninic acid
BCECF-AM	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester
BCRP	breast cancer resistance protein
bEnd3	brain endothelial cells
COX	cyclooxygenase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<i>D. viscosa</i>	<i>Dodonaea viscosa</i>
E-selectin	endothelial-leukocyte adhesion molecule
FITC	fluorescein isothiocyanate
GLUT-1	glucose transporter type 1
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HG	hyperglycemic condition

ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
I κ B	inhibitor protein of NF κ B
IL	interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MMP	matrix metalloproteinase
NF κ B	nuclear factor kappa B
NG	normoglycemic condition
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PBS	phosphate buffer saline
PKC	protein kinase C
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Pgp	P-glycoprotein
RPMI	Roswell park memorial institute medium
SEAP	secreted alkaline phosphatase
<i>T. bentzoe</i>	<i>Terminalia bentzoe</i>
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
UPLC-ESI-MS-MS	ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
ZO	zona occludens

References

- Abbott, N. J.; Patabendige, A. A.; Dolman, D. E.; Yusof, S. R.; Begley, D. J., Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* **2010**, *37* (1), 13-25.
- Daneman, R.; Prat, A., The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2015**, *7* (1), a020412.
- Nagy, Z.; Peters, H.; Hüttner, I., Fracture faces of cell junctions in cerebral endothelium during normal and hyperosmotic conditions. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **1984**, *50* (3), 313-22.
- Brooks, T. A.; Hawkins, B. T.; Huber, J. D.; Egleton, R. D.; Davis, T. P., Chronic inflammatory pain leads to increased blood-brain barrier permeability and tight junction protein alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2005**, *289* (2), H738-43.
- Brown, R. C.; Morris, A. P.; O'Neil, R. G., Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain research* **2007**, *1130* (1), 17-30.
- Jiang, Y.; Lin, L.; Liu, N.; Wang, Q.; Yuan, J.; Li, Y.; Chung, K. K.; Guo, S., FGF21 Protects against Aggravated Blood-Brain Barrier Disruption after Ischemic Focal Stroke in Diabetic db/db Male Mice via Cerebrovascular PPAR γ Activation. **2020**, *21* (3).
- Zhao, Z.; Zhang, X.; Dai, Y.; Pan, K.; Deng, Y.; Meng, Y.; Xu, T., PPAR- γ promotes p38 MAP kinase-mediated endothelial cell permeability through activating Sirt3. *BMC Neurology* **2019**, *19* (1), 289.
- Yang, S.; Jin, H.; Zhao, Z., Paracellular tightness and the functional expression of efflux transporters P-gp and BCRP in bEnd3 cells. *Neurological Research* **2018**, *40* (8), 644-649.
- Rempe, R. G.; Hartz, A. M. S.; Bauer, B., Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **2016**, *36* (9), 1481-507.
- Liu, J.; Jin, X.; Liu, K. J.; Liu, W., Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2012**, *32* (9), 3044-57.
- Somade, O. T.; Ajayi, B. O.; Tajudeen, N. O.; Atunlute, E. M.; James, A. S.; Kehinde, S. A., Camphor elicits up-regulation of hepatic and pulmonary pro-inflammatory cytokines and chemokines via activation of NF- κ B in rats. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology* **2019**, *26* (3-4), 305-313.

12. Mohammadian Haftcheshmeh, S.; Karimzadeh, M. R.; Azhdari, S.; Vahedi, P.; Abdollahi, E.; Momtazi-Borojeni, A. A., Modulatory effects of curcumin on the atherogenic activities of inflammatory monocytes: Evidence from in vitro and animal models of human atherosclerosis. **2019**.
13. Hijmans, J. G.; Bammert, T. D.; Stockelman, K. A.; Reiakvam, W. R.; Greiner, J. J.; DeSouza, C. A., High glucose-induced endothelial microparticles increase adhesion molecule expression on endothelial cells. *Diabetology International* **2019**, *10* (2), 143-147.
14. Birk, P.; Jürgen, D.; Stephan, K.; Jörg, H.; Heike, G., Regulation of BCRP (ABCG2) and P-Glycoprotein (ABCB1) by Cytokines in a Model of the Human Blood–Brain Barrier. *Cellular & Molecular Neurobiology* **2010**, *30* (1), 63-70.
15. Scalbert, A.; Williamson, G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* **2000**, *130* (8S Suppl), 2073S-85S.
16. Monfoulet, L. E.; Mercier, S.; Bayle, D.; Tamaian, R.; Barber-Chamoux, N.; Morand, C.; Milenkovic, D., Curcumin modulates endothelial permeability and monocyte transendothelial migration by affecting endothelial cell dynamics. *Free Radic Biol Med* **2017**, *112*, 109-120.
17. Jiang, R.; Hodgson, J. M.; Mas, E.; Croft, K. D.; Ward, N. C., Chlorogenic acid improves ex vivo vessel function and protects endothelial cells against HOCl-induced oxidative damage, via increased production of nitric oxide and induction of Hmox-1. *J Nutr Biochem* **2016**, *27*, 53-60.
18. Tang, J. S.; Bozonet, S. M.; McKenzie, J. L.; Anderson, R. F.; Melton, L. D.; Vissers, M. C. M., Physiological Concentrations of Blueberry-Derived Phenolic Acids Reduce Monocyte Adhesion to Human Endothelial Cells. **2019**, *63* (18), e1900478.
19. Mohd Ariff, A.; Abu Bakar, N. A.; Abd. Muid, S.; Omar, E.; Ismail, N. H.; Ali, A. M.; Mohd Kasim, N. A.; Mohd Nawawi, H., Ficus deltoidea suppresses endothelial activation, inflammation, monocytes adhesion and oxidative stress via NF-κB and eNOS pathways in stimulated human coronary artery endothelial cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies* **2020**, *20* (1), 56.
20. Arcambal, A.; Tailé, 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**, e1900779.
21. Tailé, 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. **2020**, *9* (7).
22. Desilles, J. P.; Syvannarath, V.; Ollivier, V.; Journé, C.; Delbosc, S.; Ducroux, C.; Boisseau, W.; Louedec, L.; Di Meglio, L.; Loyau, S.; Jandrot-Perrus, M.; Potier, L.; Michel, J. B.; Mazighi, M.; Ho-Tin-Noé, B., Exacerbation of Thromboinflammation by Hyperglycemia Precipitates Cerebral Infarct Growth and Hemorrhagic Transformation. *Stroke* **2017**, *48* (7), 1932-1940.
23. Zonneveld, T. P.; Nederkoorn, P. J.; Westendorp, W. F.; Brouwer, M. C.; van de Beek, D.; Kruij, N. D., Hyperglycemia predicts poststroke infections in acute ischemic stroke. *Neurology* **2017**, *88* (15), 1415-1421.
24. Omidi, Y.; Campbell, L.; Barar, J.; Connell, D.; Akhtar, S.; Gumbleton, M., Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain research* **2003**, *990* (1-2), 95-112.
25. Yang, S.; Mei, S.; Jin, H.; Zhu, B.; Tian, Y.; Huo, J.; Cui, X.; Guo, A.; Zhao, Z., Identification of two immortalized cell lines, ECV304 and bEnd3, for in vitro permeability studies of blood-brain barrier. *PLoS One* **2017**, *12* (10), e0187017.
26. Arcambal, A.; Tailé, J.; Rondeau, P.; Viranaïcken, W.; Meilhac, O.; Gonthier, M. P., Hyperglycemia modulates redox, inflammatory and vasoactive markers through specific signaling pathways in cerebral endothelial cells: Insights on insulin protective action. *Free Radic Biol Med* **2019**, *130*, 59-70.
27. Samoisy, A. K.; Mahomoodally, M. F., Ethnopharmacological analysis of medicinal plants used against non-communicable diseases in Rodrigues Island, Indian Ocean. *J Ethnopharmacol* **2015**, *173*, 20-38.
28. Ruskovska, T.; Massaro, M.; Carluccio, M. A.; Arola-Arnal, A., Systematic bioinformatic analysis of nutrigenomic data of flavanols in cell models of cardiometabolic disease. **2020**, *11* (6), 5040-5064.

29. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L., Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **2004**, *79* (5), 727-47.
30. Williams, C. R.; Lu, X.; Sutliff, R. L.; Hart, C. M., Rosiglitazone attenuates NF- κ B-mediated Nox4 upregulation in hyperglycemia-activated endothelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology* **2012**, *303* (2), C213-23.
31. Yuan, T.; Yang, T.; Chen, H.; Fu, D.; Hu, Y.; Wang, J.; Yuan, Q.; Yu, H.; Xu, W.; Xie, X., New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biol* **2019**, *20*, 247-260.
32. Barnes, P. J.; Karin, M., Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England journal of medicine* **1997**, *336* (15), 1066-71.
33. Markovics, A.; Biró, A., Effect of Anthocyanin-Rich Extract of Sour Cherry for Hyperglycemia-Induced Inflammatory Response and Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation. **2020**, *12* (11).
34. Sheu, M. L.; Ho, F. M.; Yang, R. S.; Chao, K. F.; Lin, W. W.; Lin-Shiau, S. Y.; Liu, S. H., High glucose induces human endothelial cell apoptosis through a phosphoinositide 3-kinase-regulated cyclooxygenase-2 pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2005**, *25* (3), 539-45.
35. Rajesh, M.; Mukhopadhyay, P.; Bátkai, S.; Haskó, G.; Liaudet, L.; Drel, V. R.; Obrosova, I. G.; Pacher, P., Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2007**, *293* (1), H610-9.
36. Kany, S.; Vollrath, J. T.; Relja, B., Cytokines in Inflammatory Disease. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20* (23), 6008.
37. Aljofan, M.; Ding, H., High glucose increases expression of cyclooxygenase-2, increases oxidative stress and decreases the generation of nitric oxide in mouse microvessel endothelial cells. *Journal of cellular physiology* **2010**, *222* (3), 669-75.
38. Xing, C.; Xiang, D.; Caiying, L., Effects of troxerutin on vascular inflammatory mediators and expression of microRNA-146a/NF- κ B signaling pathway in aorta of healthy and diabetic rats. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* **2020**, *24* (5), 395-402.
39. Tsai, S. J.; Chao, C. Y.; Yin, M. C., Preventive and therapeutic effects of caffeic acid against inflammatory injury in striatum of MPTP-treated mice. *Eur J Pharmacol* **2011**, *670* (2-3), 441-7.
40. Rozentsvit, A.; Vinokur, K.; Samuel, S.; Li, Y.; Gerdes, A. M.; Carrillo-Sepulveda, M. A., Ellagic Acid Reduces High Glucose-Induced Vascular Oxidative Stress Through ERK1/2/NOX4 Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem* **2017**, *44* (3), 1174-1187.
41. Park, C. S.; Lee, J. Y.; Choi, H. Y.; Lee, K.; Heo, Y.; Ju, B. G.; Choo, H. P.; Yune, T. Y., Gallic acid attenuates blood-spinal cord barrier disruption by inhibiting Jmjd3 expression and activation after spinal cord injury. *Neurobiol Dis* **2020**, *145*, 105077.
42. Fratantonio, D.; Speciale, A., Low nanomolar caffeic acid attenuates high glucose-induced endothelial dysfunction in primary human umbilical-vein endothelial cells by affecting NF- κ B and Nrf2 pathways. **2017**, *43* (1), 54-62.
43. Ahmed, S. M.; Luo, L.; Namani, A.; Wang, X. J.; Tang, X., Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* **2017**, *1863* (2), 585-597.
44. 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.
45. Gear, A. R.; Camerini, D., Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* **2003**, *10* (3-4), 335-50.
46. Kamei, M.; Carman, C. V., New observations on the trafficking and diapedesis of monocytes. *Current opinion in hematology* **2010**, *17* (1), 43-52.
47. Vestweber, D., How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature Reviews Immunology* **2015**, *15*, 692-704.
48. Blankenberg, S.; Barbaux, S.; Tiret, L., Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **2003**, *170* (2), 191-203.

49. Dejana, E., Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2004**, *5* (4), 261-70.
50. Yan, J.; Zhang, Z.; Shi, H., HIF-1 is involved in high glucose-induced paracellular permeability of brain endothelial cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2012**, *69* (1), 115-28.
51. Salameh, T. S.; Mortell, W. G.; Logsdon, A. F.; Butterfield, D. A.; Banks, W. A., Disruption of the hippocampal and hypothalamic blood-brain barrier in a diet-induced obese model of type II diabetes: prevention and treatment by the mitochondrial carbonic anhydrase inhibitor, topiramate. *Fluids Barriers CNS* **2019**, *16* (1), 1.
52. Zhao, Q.; Zhang, F.; Yu, Z.; Guo, S.; Liu, N.; Jiang, Y.; Lo, E. H.; Xu, Y.; Wang, X., HDAC3 inhibition prevents blood-brain barrier permeability through Nrf2 activation in type 2 diabetes male mice. *Journal of neuroinflammation* **2019**, *16* (1), 103.
53. Srivastava, K.; Shao, B.; Bayraktutan, U., PKC- β exacerbates in vitro brain barrier damage in hyperglycemic settings via regulation of RhoA/Rho-kinase/MLC2 pathway. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **2013**, *33* (12), 1928-36.
54. Song, J.; Yoon, S. R.; Kim, O. Y., miR-Let7A Controls the Cell Death and Tight Junction Density of Brain Endothelial Cells under High Glucose Condition. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, *2017*, 6051874.
55. Zhang, S.; An, Q.; Wang, T.; Gao, S.; Zhou, G., Autophagy- and MMP-2/9-mediated Reduction and Redistribution of ZO-1 Contribute to Hyperglycemia-increased Blood-Brain Barrier Permeability During Early Reperfusion in Stroke. *Neuroscience* **2018**, *377*, 126-137.
56. Rom, S.; Heldt, N. A.; Gajghate, S.; Seliga, A.; Reichenbach, N. L.; Persidsky, Y., Hyperglycemia and advanced glycation end products disrupt BBB and promote occludin and claudin-5 protein secretion on extracellular microvesicles. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 7274.
57. Jin, Z.; Ke, J.; Guo, P.; Wang, Y.; Wu, H., Quercetin improves blood-brain barrier dysfunction in rats with cerebral ischemia reperfusion via Wnt signaling pathway. *American journal of translational research* **2019**, *11* (8), 4683-4695.
58. Lee, K.; Lee, J. S.; Jang, H. J.; Kim, S. M.; Chang, M. S.; Park, S. H.; Kim, K. S.; Bae, J.; Park, J. W.; Lee, B.; Choi, H. Y.; Jeong, C. H.; Bu, Y., Chlorogenic acid ameliorates brain damage and edema by inhibiting matrix metalloproteinase-2 and 9 in a rat model of focal cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* **2012**, *689* (1-3), 89-95.
59. Chien, M. Y.; Chuang, C. H.; Chern, C. M.; Liou, K. T.; Liu, D. Z.; Hou, Y. C.; Shen, Y. C., Salvianolic acid A alleviates ischemic brain injury through the inhibition of inflammation and apoptosis and the promotion of neurogenesis in mice. *Free Radic Biol Med* **2016**, *99*, 508-519.
60. Chen, Y. C.; Wu, J. S.; Tsai, H. D.; Huang, C. Y.; Chen, J. J.; Sun, G. Y.; Lin, T. N., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) and neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol* **2012**, *46* (1), 114-24.
61. Zhao, X.; Strong, R.; Zhang, J.; Sun, G.; Tsien, J. Z.; Cui, Z.; Grotta, J. C.; Aronowski, J., Neuronal PPARgamma deficiency increases susceptibility to brain damage after cerebral ischemia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2009**, *29* (19), 6186-95.
62. Wu, J. S.; Tsai, H. D.; Cheung, W. M.; Hsu, C. Y.; Lin, T. N., PPAR- γ Ameliorates Neuronal Apoptosis and Ischemic Brain Injury via Suppressing NF- κ B-Driven p22phox Transcription. *Mol Neurobiol* **2016**, *53* (6), 3626-3645.
63. Collino, M.; Patel, N. S.; Thiemermann, C., PPARs as new therapeutic targets for the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury. *Therapeutic advances in cardiovascular disease* **2008**, *2* (3), 179-97.
64. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* **1996**, *20* (7), 933-56.
65. Szwajgier, D.; Borowiec, K.; Pustelniak, K., The Neuroprotective Effects of Phenolic Acids: Molecular Mechanism of Action. *Nutrients* **2017**, *9* (5).
66. Ishisaka, A.; Mukai, R.; Terao, J.; Shibata, N.; Kawai, Y., Specific localization of quercetin-3-O-glucuronide in human brain. *Arch Biochem Biophys* **2014**, *557*, 11-7.

67. Spencer, J. P.; Kuhnle, G. G.; Williams, R. J.; Rice-Evans, C., Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem J* **2003**, *372* (Pt 1), 173-81.
68. Mateos, R.; Goya, L.; Bravo, L., Uptake and metabolism of hydroxycinnamic acids (chlorogenic, caffeic, and ferulic acids) by HepG2 cells as a model of the human liver. *J Agric Food Chem* **2006**, *54* (23), 8724-32.
69. Mohos, V.; Fliszár-Nyúl, E.; Ungvári, O.; Kuffa, K.; Needs, P. W.; Kroon, P. A.; Telbisz, Á.; Özvegy-Laczka, C.; Poór, M., Inhibitory Effects of Quercetin and Its Main Methyl, Sulfate, and Glucuronic Acid Conjugates on Cytochrome P450 Enzymes, and on OATP, BCRP and MRP2 Transporters. *Nutrients* **2020**, *12* (8).
70. Kaur, M.; Badhan, R. K., Phytochemical mediated-modulation of the expression and transporter function of breast cancer resistance protein at the blood-brain barrier: An in-vitro study. *Brain research* **2017**, *1654* (Pt A), 9-23.
71. Li, W.; Chen, Z.; Yan, M.; He, P.; Chen, Z.; Dai, H., The protective role of isorhamnetin on human brain microvascular endothelial cells from cytotoxicity induced by methylglyoxal and oxygen-glucose deprivation. *J Neurochem* **2016**, *136* (3), 651-9.
72. Yokozawa, T.; Kim, H. Y.; Cho, E. J.; Choi, J. S.; Chung, H. Y., Antioxidant effects of isorhamnetin 3,7-di-O-beta-D-glucopyranoside isolated from mustard leaf (*Brassica juncea*) in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Agric Food Chem* **2002**, *50* (19), 5490-5.
73. Bainor, A.; Chang, L.; McQuade, T. J.; Webb, B.; Gestwicki, J. E., Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. *Analytical biochemistry* **2011**, *410* (2), 310-2.
74. Iwashima, T.; Kudome, Y.; Kishimoto, Y.; Saita, E.; Tanaka, M.; Taguchi, C.; Hirakawa, S.; Mitani, N.; Kondo, K.; Iida, K., Aronia berry extract inhibits TNF- α -induced vascular endothelial inflammation through the regulation of STAT3. *Food & nutrition research* **2019**, *63*.
75. Milenkovic, D.; Berghe, W. V.; Morand, C.; Claude, S.; van de Sandt, A.; Gorressen, S.; Monfoulet, L. E., A systems biology network analysis of nutri(epi)genomic changes in endothelial cells exposed to epicatechin metabolites. **2018**, *8* (1), 15487.

V.3. Résultat 3 : “Protective effects of antioxidant polyphenols against hyperglycemia-mediated alterations in cerebral endothelial cells and a mouse stroke model.”

(Arcambal A., **Tailé J.**, Couret D., Planesse C., Veeren B., Diotel N., Gauvin-Bialecki A., Meilhac O., Gonthier M-P., *Molecular Nutrition & Food Research*, 64 (13), 2020).

Les données de la littérature rapportent que l’hyperglycémie aggrave les complications cérébrovasculaires causées par un accident vasculaire cérébral, en particulier chez les patients diabétiques. En effet, le stress oxydatif et l’état pro-inflammatoire induits par l’hyperglycémie favorisent l’altération fonctionnelle et structurale de la BHE, entraînant ainsi une perte d’intégrité de l’endothélium cérébral. Ce dysfonctionnement de la BHE engendre un accroissement du risque de transformation hémorragique, de déficit neurologique et de l’inflammation retrouvés lors d’un AVC. De manière intéressante, les polyphénols dotés de propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires pourraient exercer des effets protecteurs, susceptibles de réduire les dommages cérébrovasculaires engendrés lors du diabète de type 2.

Notre troisième étude avait pour but d’évaluer les effets protecteurs des polyphénols de la plante médicinale *A. borbonica* et de l’acide caféique contre les complications cérébrovasculaires, chez un modèle de souris en hyperglycémie aiguë et exposées à une ischémie cérébrale-reperfusion. Une exploration d’ordre mécanistique a été menée en parallèle sur les cellules endothéliales cérébrales.

Pour ce faire, l’étude *in vitro* a été réalisée sur les cellules endothéliales cérébrales murines bEnd3 exposées à une condition hyperglycémique (33 mM de glucose) en présence ou non des polyphénols d’*A. borbonica* ou d’acide caféique (10 µM) durant 1 à 24 h de traitement. En parallèle une étude *in vivo* a été menée sur un modèle d’ischémie-reperfusion chez des souris C57BL/6 en situation d’hyperglycémie aiguë. En effet, les souris ont reçu par voie intrapéritonéale une dose de glucose (30%, 2,2 g/kg) dilué dans du NaCl 0,9% en présence ou non des polyphénols d’*A. borbonica* ou d’acide caféique. Une dose de 50 mg de polyphénols/kg a été appliquée, au regard de son utilisation fréquente dans des études bibliographiques pour une exposition aiguë aux polyphénols. La dose de glucose utilisée a été choisie pour provoquer une élévation

de la glycémie basale de 60 à 380 mg/dL au bout de 15 minutes, avec un retour à l'état basal après 6 h. Puis, une ischémie-reperfusion a été réalisée par une occlusion de l'artère cérébrale moyenne durant 90 min suivie d'une reperfusion de 20 h. A la fin de l'expérimentation, le déficit neurologique a été évalué. Le cerveau a été prélevé pour évaluer le volume de l'infarctus, la transformation hémorragique et pour séparer les hémisphères ischémié et non ischémié. Le sang a été collecté pour l'obtention du plasma. De manière générale, sur les deux modèles d'études, nous avons évalué des marqueurs redox (ROS, Nox4, Cu/ZnSOD, Nrf2), inflammatoires (voie NFκB-SEAP, IL-6, MPO et GFAP) et vasoactifs (NO). La présence de polyphénols au niveau cérébral a été mesurée.

Les résultats obtenus *in vitro* ont démontré que la viabilité cellulaire n'a pas été affectée par les conditions expérimentales. Les polyphénols ont protégé contre le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie sur les cellules endothéliales cérébrales, via la modulation des niveaux intracellulaires de ROS, de l'activité enzymatique de la Cu/ZnSOD, de l'expression génique de Nox4 et de la translocation nucléaire du facteur de transcription redox-sensible Nrf2. Les polyphénols ont diminué l'activité transcriptionnelle de NFκB et l'augmentation de la sécrétion d'IL-6 induites par la condition hyperglycémique. Ils ont aussi protégé les cellules contre la baisse de production du facteur vasodilatateur NO causée par l'hyperglycémie. Concernant l'étude *in vivo*, les polyphénols extraits d'*A. borbonica* et l'acide caféique n'ont pas eu d'effet sur le déficit neurologique aggravé par l'hyperglycémie aiguë chez les souris en situation d'ischémie-reperfusion. Cependant, l'acide caféique a réduit de manière significative le volume de la zone cérébrale ischémiée. Les polyphénols d'*A. borbonica* et l'acide caféique ont réduit l'effet délétère de l'hyperglycémie sur l'aggravation de (i) la transformation hémorragique, (ii) de la diminution du taux de VE-Cadhérine marqueur d'intégrité de la BHE, (iii) des altérations redox et neuro-inflammatoires lors de l'ischémie-reperfusion. Par ailleurs, l'acide caféique et son métabolite méthylé circulant majoritaire, l'acide férulique, ont été détectés dans l'hémisphère cérébral ischémié, montrant leur capacité des polyphénols à atteindre le cerveau.

En conclusion, cette troisième étude a montré les effets protecteurs des polyphénols sur les cellules endothéliales cérébrales en condition hyperglycémique et contre les dommages cérébrovasculaires aggravés par une hyperglycémie aiguë lors d'un AVC

expérimental chez des souris. Leurs effets protecteurs relevés *in vivo* étaient en adéquation avec leur détection au niveau de l'hémisphère cérébral ischémié.

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

Angélique Arcambal, Janice Tailé, David Couret, Cynthia Planesse, Bryan Veeren, Nicolas Diotel, Anne Gauvin-Bialecki, Olivier Meilhac, and Marie-Paule Gonthier*

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 NADPH 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- κ 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.

disability. Insulin-independent (type 2) diabetes accounts for the majority of cases and constitutes a major risk factor for cardiovascular diseases established as the first cause of death worldwide.^[1,2] Diabetic patients also have a higher risk of experiencing stroke than non-diabetic individuals and it was estimated that 25% of all ischemic strokes are attributable to diabetes.^[3] Concordantly, hyperglycemia was associated with hemorrhagic transformation and poor clinical outcome in acute ischemic stroke.^[4,5]

Blood-brain barrier (BBB) disruption is a key process during stroke. Hyperglycemic conditions such as those observed during diabetes impair BBB integrity and transport functions.^[6] BBB is a very selectively permeable interface that maintains cerebral homeostasis, by separating brain from blood compartment. Among major BBB constituents comprising astrocytes, pericytes, neurons and basal membrane, the core anatomical element remains the cerebral blood vessel formed by endothelial cells. Endothelial cells from BBB are unique compared with those from the peripheral region, by having continuous intercellular tight junctions, lacking fenestrations, and


undergoing low rates of transcytosis that limit movement of molecules through BBB. Consequently, cerebral endothelial cell dysfunction may lead to a loss of brain homeostasis.^[7] Of note, glucose-mediated endothelial dysfunction involves redox

1. Introduction

Diabetes mellitus characterized by high blood glucose levels is recognized as an important cause of premature death and

Dr. A. Arcambal, Dr. J. Tailé, Dr. D. Couret, C. Planesse, Dr. B. Veeren, Dr. N. Diotel, Dr. O. Meilhac, Prof. M.-P. Gonthier
Université de La Réunion, INSERM
UMR 1188 Diabète athéromatose
Thérapies Réunion Océan Indien (DéTROI)
Saint-Denis, La Réunion 97490, France
E-mail: marie-paule.gonthier@univ-reunion.fr

Dr. D. Couret, Dr. O. Meilhac
CHU de La Réunion
Saint-Pierre, La Réunion 97410, France
Prof. A. Gauvin-Bialecki
Université de La Réunion
EA 2212 Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des
Sciences des Aliments (LCSNSA)
Saint-Denis, La Réunion 97490, France

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900779>

DOI: 10.1002/mnfr.201900779

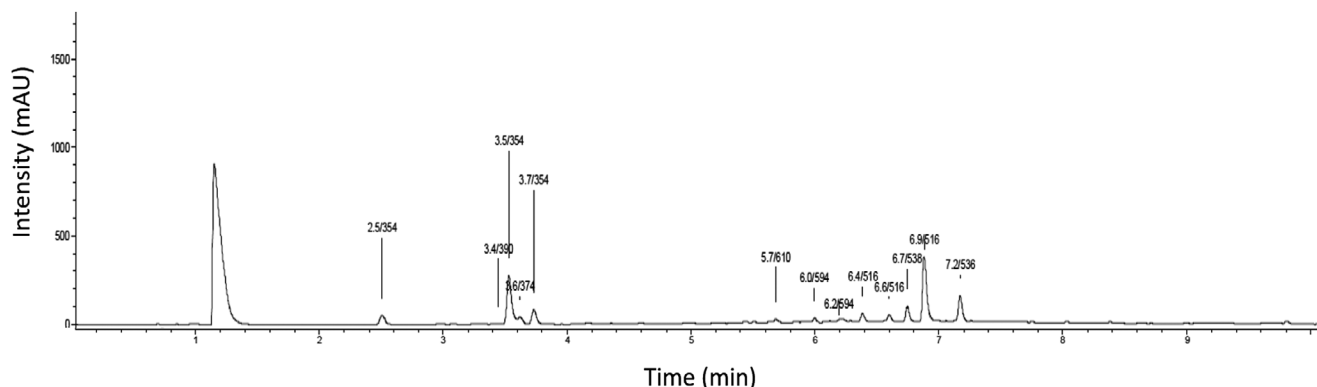


Figure 1. UPLC-MS identification of *A. borbonica* polyphenols. Polyphenols extracted from *A. borbonica* medicinal plant were identified by UPLC-MS. Chlorogenic acids (2.5/354; 3.5/354; 3.7/354), quercetin-O-hexoside-O-rhamnoside (5.7/610), kaempferol-O-hexoside-O-rhamnoside (6.0/594; 6.2/594), and dicafeoylquinic acids (6.4/516; 6.6/516; 6.9/516) were detected.

changes generated by metabolic pathways that promote oxidative stress. Indeed, in endothelial cells, hyperglycemia induces the overproduction of reactive oxygen species (ROS) from different sources such as mitochondrial electron-transport chain and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidases (Nox).^[7,8] ROS deeply affect BBB integrity and permeability, in particular through alteration of expression and distribution of molecules such as the tight junction protein zonula occludens-1 (ZO-1) and the adherens junction protein vascular endothelial-Cadherin (VE-Cadherin). ROS also lead to a down-regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene expression and reduction of nitric oxide (NO) bioavailability that decreases vasodilation and increases blood flow resistance.^[9] Moreover, ROS trigger a pro-inflammatory environment by increasing the production of mediators such as interleukin-6 (IL-6) and leukocyte adhesion molecules via the activation of nuclear factor-kappa B (NFκB) signaling pathway.^[10] Enzymes from the Nox family and more particularly Nox4 were described as an important source of ROS production damaging BBB and exerting detrimental effects in stroke.^[11,12] Conversely, normalizing hyperglycemia-mediated production of ROS like superoxide anion may limit glucose-induced vascular damage, highlighting the crucial role of ROS-detoxifying enzymes such as the superoxide dismutase (SOD).^[10]

Considering that oxidative stress is a key player of BBB breakdown, antioxidant strategies may be relevant to improve neurovascular damage.^[9,13] Interestingly, plant polyphenols constitute the most abundant antioxidants provided by the human diet.^[14] Numerous data showed that polyphenols such as those from tea, cocoa, grape, berries, and turmeric improve the vascular function by targeting the endothelium. The underlying mechanisms are pleiotropic, including ROS scavenging, reduction of Nox production, increase in antioxidant enzyme gene expression by enhancing the key redox-sensitive transcription factor Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), inhibition of pro-inflammatory response and activation of eNOS and NO release.^[15–18] Although several studies have demonstrated the beneficial effects of polyphenols on peripheral endothelial cells, there is still a lack of data regarding their impact on BBB endothelial cells and on cerebral ischemia, in particular in hyperglycemic

conditions. Caffeic acid, a major phenolic acid consumed by humans,^[14] protects animal models after cerebral ischemia, preventing neuronal death and decreasing memory deficits.^[19,20] However, these biological activities have been poorly assessed in diabetic conditions. Previously, we showed that polyphenols extracted from *Antirhea borbonica* medicinal plant, referred to the French pharmacopeia for antidiabetic properties, exerted antioxidant and anti-inflammatory effects on adipocytes and we identified caffeic acid as the major phenolic acid in the plant extract.^[21,22]

This study aimed to determine the protective role of *A. borbonica* polyphenol-rich extract and its predominant constituent caffeic acid on cerebral endothelial cells and in an ischemia-reperfusion mouse model during high glucose condition used to experimentally mimic hyperglycemia. Polyphenol effects on redox, inflammatory, and vasoactive markers as well as on neurological deficit, infarct volume, and hemorrhagic transformation were evaluated.

2. Results

2.1. Identification and Quantification of *A. borbonica* Polyphenols

UPLC-MS analysis of *A. borbonica* plant extract allowed the detection of chlorogenic and dicafeoylquinic acids corresponding to esterified derivatives of caffeic acid (**Figure 1**). Moreover, two flavonoids, namely quercetin and kaempferol, were identified as quercetin-O-hexoside-O-rhamnoside and kaempferol-O-hexoside-O-rhamnoside forms, respectively. The quantitative analysis of *A. borbonica* polyphenols indicated that dicafeoylquinic acids were the most abundant compounds detected (1171.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$), followed by chlorogenic acids (1135.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and both kaempferol (40.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and quercetin (32.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) derivatives. We found that the total polyphenol content reached 3.4% (w/w) GAE. Considering that caffeic acid was the predominant phenolic acid present in the plant extract, its biological activity was compared to that of *A. borbonica* polyphenol-rich extract in the following experiments.

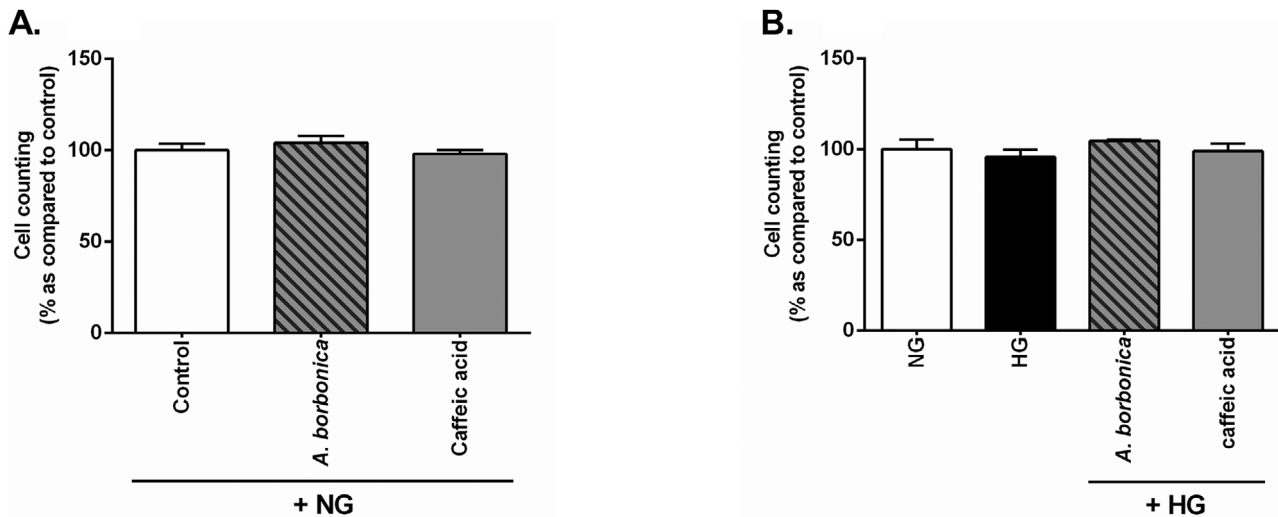


Figure 2. Effect of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid on the viability of cerebral endothelial cells exposed to hyperglycemic conditions. Murine bEnd.3 cerebral endothelial cells were exposed to normoglycemic (5.5 mM glucose, NG) or hyperglycemic conditions (33 mM glucose, HG) with or without *A. borbonica* polyphenols (10 μ M GAE) or caffeic acid (10 μ M) for 24 h. Cell viability in A) NG or B) HG conditions was explored by counting viable cells using the Trypan blue exclusion method. Data were expressed as means \pm SEM of three independent experiments.

2.2. Effect of *A. borbonica* Polyphenols and Caffeic Acid on the Viability of Cerebral Endothelial Cells Exposed to Hyperglycemic Conditions

The impact of *A. borbonica* polyphenol-rich extract and caffeic acid on cell viability in hyperglycemic conditions was evaluated by quantifying viable cells. Results show that neither *A. borbonica* polyphenols nor caffeic acid did alter cell viability in normoglycemic (Figure 2A) or hyperglycemic conditions (Figure 2B).

2.3. Effect of *A. borbonica* Polyphenols and Caffeic Acid on Redox Markers in Cerebral Endothelial Cells Exposed to Hyperglycemic Conditions

A. borbonica polyphenols and caffeic acid effects on intracellular ROS levels during normoglycemic or hyperglycemic conditions were determined. We found an increase in ROS levels after 3 h of exposure to high glucose concentration, suggesting an induction of oxidative stress (Figure 3A). From 6 to 24 h of exposure to hyperglycemic conditions, intracellular ROS levels returned to baseline. *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid exerted antioxidant properties by decreasing ROS levels. Consistently, total SOD activity was significantly enhanced at 3 h in cells exposed to hyperglycemic condition-mediated oxidative stress (Figure 3B). Both *A. borbonica* polyphenol-rich extract and caffeic acid counteracted high glucose concentration action by lowering total SOD activity. More particularly, polyphenols protected against hyperglycemic condition-induced Cu/ZnSOD activation (Figure 3C) without modulating MnSOD activity (Figure 3D). Additionally, data show that *A. borbonica* polyphenols decreased the expression of the gene encoding the ROS-producing enzyme Nox4 during the normoglycemic condition while caffeic acid did not (Figure 4A). The hyperglycemic condition led to an up-regulation

of Nox4 gene expression and both *A. borbonica* polyphenol-rich extract and caffeic acid blocked this effect (Figure 4B). Nrf2 is a major transcription factor regulating redox enzyme production. Its gene expression remained unchanged in cells exposed to the normoglycemic condition with or without polyphenols (Figure 4C), but it was down-regulated in cells exposed to the hyperglycemic condition (Figure 4D). *A. borbonica* polyphenols as well as caffeic acid abrogated this action of high glucose concentration. Interestingly, the nuclear translocation of Nrf2 (Figure 4E) was increased in cells exposed to the hyperglycemic condition, and decreased during the co-exposition with *A. borbonica* polyphenols or caffeic acid. Altogether, these results suggest that polyphenols exerted antioxidant effects on cerebral endothelial cells by improving redox markers in the hyperglycemic condition.

2.4. Effect of *A. borbonica* Polyphenols and Caffeic Acid on the Inflammatory Response and the Production of Vasoactive Markers in Cerebral Endothelial Cells Exposed to Hyperglycemic Conditions

Results described above show that ROS production was elevated after 3 h of exposure to a high glucose concentration. In order to examine the effect of polyphenols on the inflammatory profile, cells were exposed to the hyperglycemic condition for 3–24 h and NF κ B pathway activation was monitored by measuring SEAP activity in bEnd.3-Blue cell medium. Results indicate that the hyperglycemic condition led to an increased SEAP activity related to NF κ B activity, suggesting a pro-inflammatory response (Figure 5A). *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid prevented high glucose concentration effects. Moreover, polyphenols reduced IL-6 secretion elevated after 8 h of exposure to the hyperglycemic condition (Figure 5B). These findings

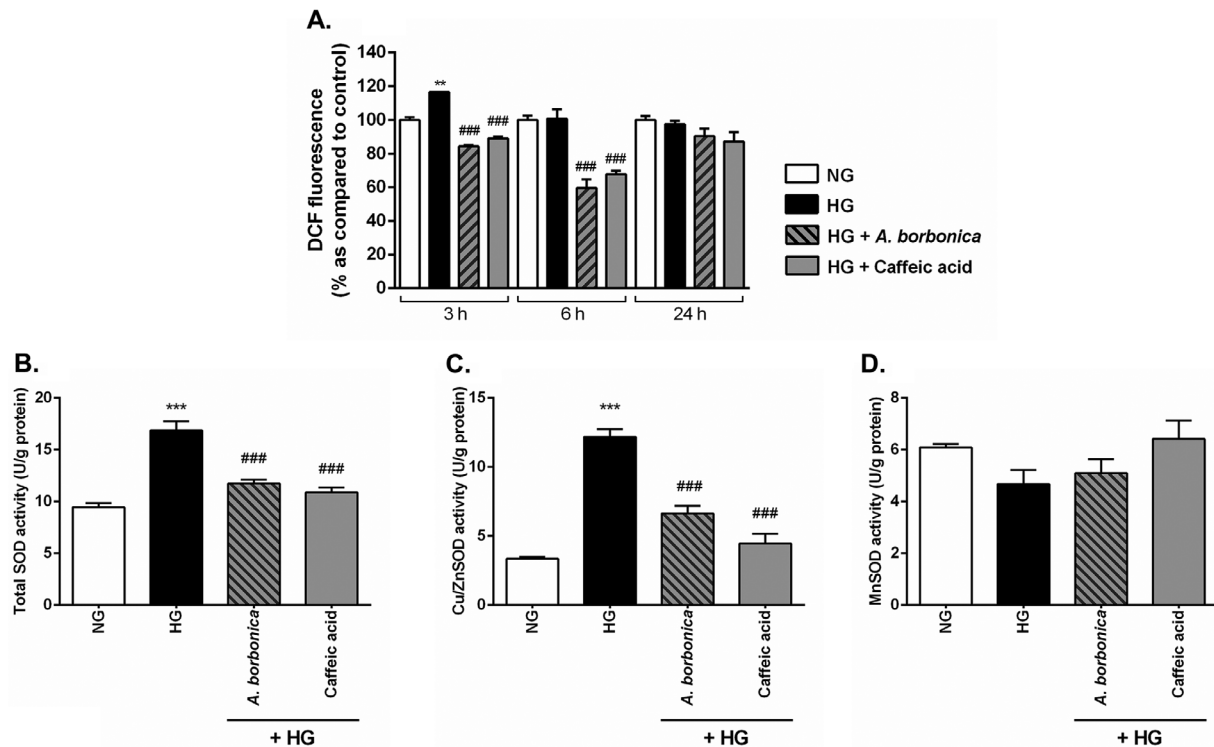


Figure 3. Effect of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid on ROS levels and SOD activities in cerebral endothelial cells exposed to hyperglycemic conditions. Murine bEnd.3 cerebral endothelial cells were exposed to normoglycemic (5.5 mM glucose, NG) or hyperglycemic conditions (33 mM glucose, HG) with or without *A. borbonica* polyphenols (10 μ M GAE) or caffeic acid (10 μ M) for 3–24 h. Intracellular ROS levels were measured at 3, 6, and 24 h in cells exposed to *A. borbonica* polyphenols or A) caffeic acid by using DCFH-DA assay. B) Total SOD activity comprising C) Cu/ZnSOD and D) MnSOD activities were measured at 3 h. Data were expressed as means \pm SEM of three independent experiments. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$ as compared to NG, and ###: $p < 0.005$ as compared to HG at the same time.

suggest that polyphenols exhibited anti-inflammatory properties by counteracting the action of the hyperglycemic condition in cerebral endothelial cells. Endothelial cells are a main source of NO vasodilator factor. During oxidative stress and pro-inflammatory conditions, the alteration of NO production is a key marker of the endothelial dysfunction. We found that NO levels decreased after 3 h of exposure to the hyperglycemic condition (Figure 5C). Interestingly, *A. borbonica* polyphenol-rich extract and caffeic acid protected cerebral endothelial cells against the deleterious action of high glucose concentration, by inhibiting the reduction of NO levels. Concordantly, the hyperglycemic condition induced a down-regulation of eNOS gene expression (Figure 5D) and an up-regulation of the expression of ET-1 gene (Figure 5E). Of note, *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid exerted a protective action against the hyperglycemic condition effects on the production of vasoactive markers from cerebral endothelial cells.

2.5. Effect of *A. borbonica* Polyphenols and Caffeic Acid on Blood Glucose Levels of Mice Exposed to Hyperglycemia

To assess the effect of i.p. injection of glucose in the presence or not of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid on the glycemetic status of mice, blood glucose levels were measured before i.p. injection, 15 min after injection, just before the surgery time, at

reperfusion time, 1 h after reperfusion and 2 h after reperfusion. In SHAM mice receiving an i.p. injection of saline solution before surgery, blood glucose levels increased from 63 to 94 mg dL⁻¹ after 15 min and decreased over time (Figure 6A). A similar result was found in MCAO group receiving an i.p. injection of saline solution (Figure 6B). This may result from the stressful condition of injection. Conversely, mice from HG-MCAO group receiving an i.p. glucose administration, exhibited an elevation of blood glucose levels from 65 to 383 mg dL⁻¹ after 15 min (Figure 6C). Then, glycemia decreased but did not return to baseline. In both HG-MCAO groups receiving an i.p. administration of glucose and *A. borbonica* (Figure 6D) or caffeic acid (Figure 6E), glycemia also peaked after 15 min. Measurements of area under curve index show that polyphenols did not impact on the glycemetic status of animals (Figure 6F).

2.6. Effect of *A. borbonica* Polyphenols and Caffeic Acid on Cerebral Infarct Volume, Neurological Deficit Score, and Hemorrhagic Transformation in an Ischemia-Reperfusion Mouse Model Exposed to Hyperglycemia

To evaluate the effect of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid on cerebral infarct volume, TTC vital staining was performed. The infarct volume was calculated and expressed in percentage of the infarcted hemisphere. TTC staining showed an increase in

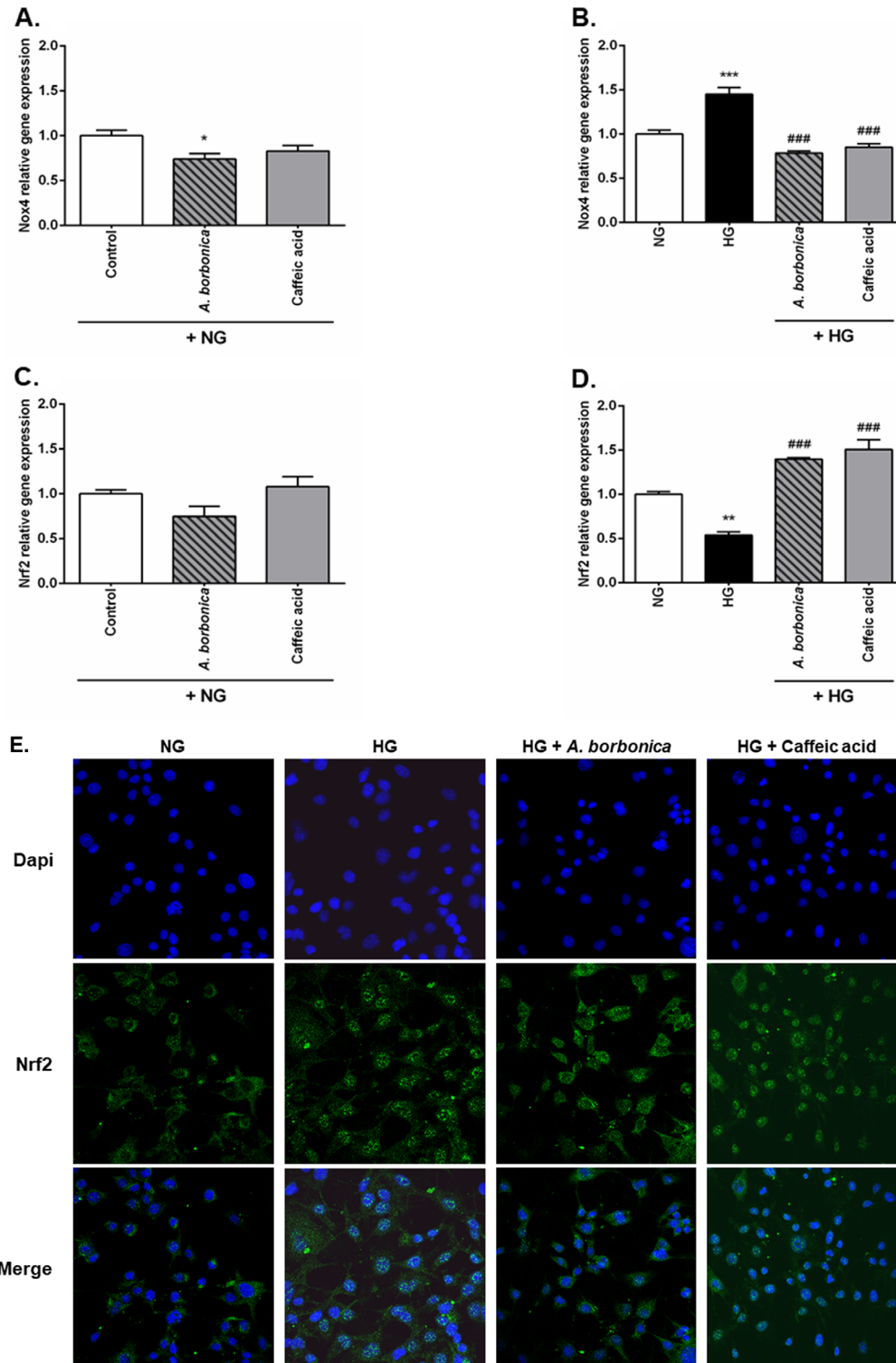


Figure 4. Effect of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid on Nox4 gene expression, and Nrf2 gene expression and nuclear translocation in cerebral endothelial cells exposed to hyperglycemic conditions. Murine bEnd.3 cerebral endothelial cells were exposed to normoglycemic (5.5 mM glucose, NG) or hyperglycemic conditions (33 mM glucose, HG) with or without *A. borbonica* polyphenols (10 μ M GAE) or caffeic acid (10 μ M) for 3 h. The expression of genes encoding Nox4 in A) NG or B) HG conditions, and Nrf2 in C) NG or D) HG conditions were determined by RT-qPCR. The nuclear translocation of Nrf2 after 3 h of exposure to HG condition was evaluated by immunocytofluorescence, and E) nuclei were counterstained by using DAPI. Bar: 50 μ m. Data were expressed as means \pm SEM of three independent experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$ as compared to NG, and ###: $p < 0.005$ as compared to HG.

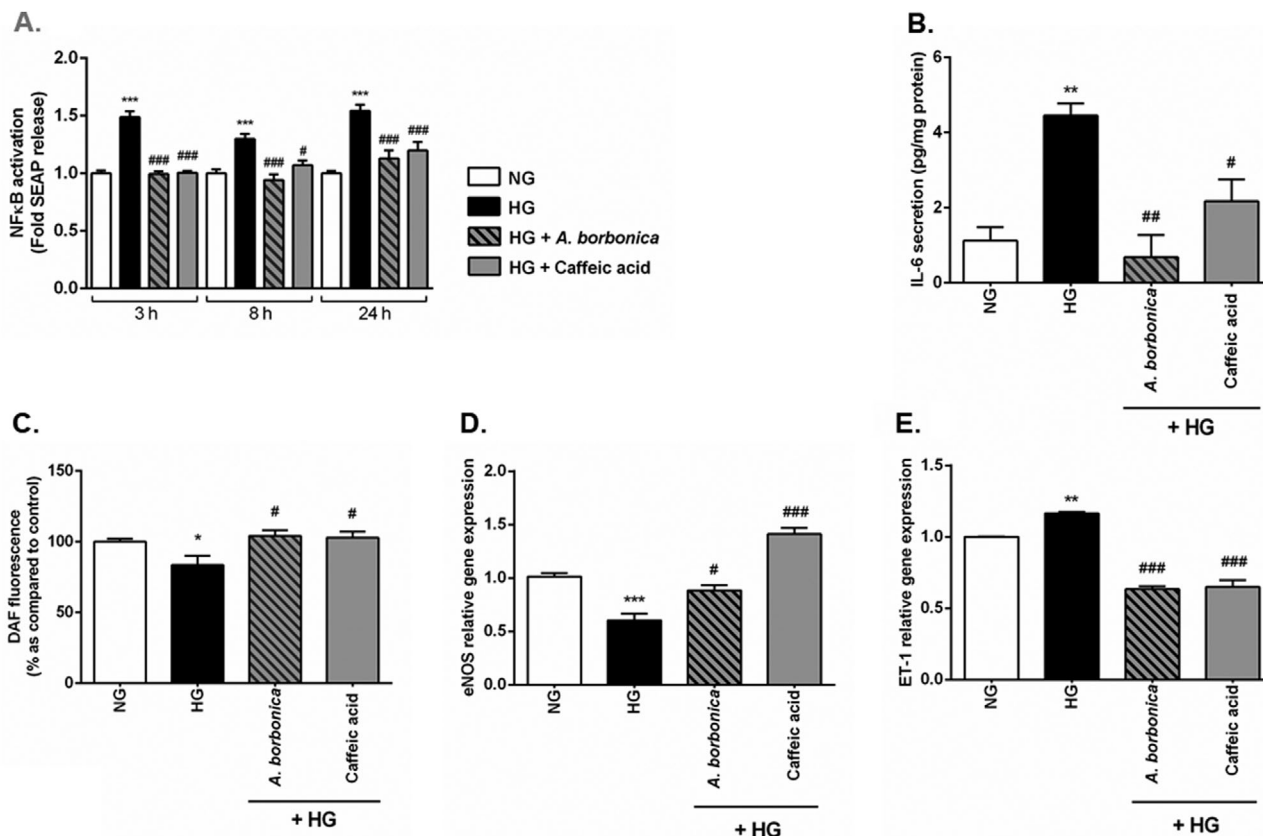


Figure 5. Effect of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid on the inflammatory response and the production of vasoactive markers in cerebral endothelial cells exposed to hyperglycemic conditions. Murine bEnd.3 cerebral endothelial cells were exposed to normoglycemic (5.5 mm glucose, NG) or hyperglycemic conditions (33 mm glucose, HG) with or without *A. borbonica* polyphenols (10 μ M GAE) or caffeic acid (10 μ M) during 3–24 h. The SEAP activity from 3–24 h was evaluated using A) Quanti-Blue assay and B) IL-6 levels at 8 h were measured by ELISA kit. Intracellular NO levels at 3 h were quantified using C) DAF-FM assay. The expression of genes encoding D) eNOS and E) ET-1 on cells exposed to HG conditions for 3 h was measured by RT-qPCR. Data were expressed as means \pm SEM of three independent experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$ as compared to NG, and #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$, ###: $p < 0.005$ as compared to HG.

cerebral infarct volume (white area) in HG-MCAO group compared to saline-injected MCAO mice (Figure 7A). Quantitative analysis indicates that the cerebral infarct volume increased from 35.7% in MCAO mice to 57.0% in HG-MCAO group, suggesting that hyperglycemia aggravated brain infarct volume (Figure 7B). Importantly, caffeic acid exerted a neuroprotective effect by decreasing the cerebral infarct volume to 46.4% while *A. borbonica* polyphenols did not significantly reduce it (50.1%). A neurological deficit score was measured after 20 h of ischemia-reperfusion, according to the score table described by Menzies et al.^[23] Results show that MCAO procedure induced an increase in the neurological deficit score from 0 to 2.6 ± 0.31 (Figure 7C). Hyperglycemia exerted a deleterious effect by significantly increasing the neurological deficit score from 2.6 ± 0.31 to 3.7 ± 0.24 . Polyphenols did not counteract hyperglycemia action. To assess a potential protective effect of polyphenols on hemorrhagic transformation, hemoglobin content was measured in the infarcted hemisphere. Data show that cerebral hemoglobin content was increased in MCAO mice (Figure 7D) and exacerbated in HG-MCAO group, suggesting that hyperglycemia aggravated hemorrhagic transformation mediated by ischemia-reperfusion. Importantly, both *A. borbonica* polyphenol-rich extract and caffeic acid

exerted a protective role against hyperglycemia action, by limiting stroke-associated hemorrhagic transformation.

2.7. Effect of *A. borbonica* Polyphenols and Caffeic Acid on Brain and Plasma Inflammatory Status in an Ischemia-Reperfusion Mouse Model Exposed to Hyperglycemia

In order to evaluate the inflammatory profile of ischemic mice exposed to hyperglycemia and polyphenols, cerebral, and plasma levels of IL-6 were determined. Results show that MCAO markedly increased brain IL-6 levels and that hyperglycemia enhanced this MCAO-mediated pro-inflammatory effect (Figure 8A). Of note, at the systemic level, hyperglycemia did not aggravate MCAO-induced IL-6 level increase (Figure 8B). This suggests that hyperglycemia deleterious action was limited to the brain compartment, leading to neuro-inflammation. Interestingly, *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid exerted anti-inflammatory properties, by counteracting the elevation of IL-6 levels in both brain and plasma. Given that astrocyte activation has been associated with neuro-inflammation during

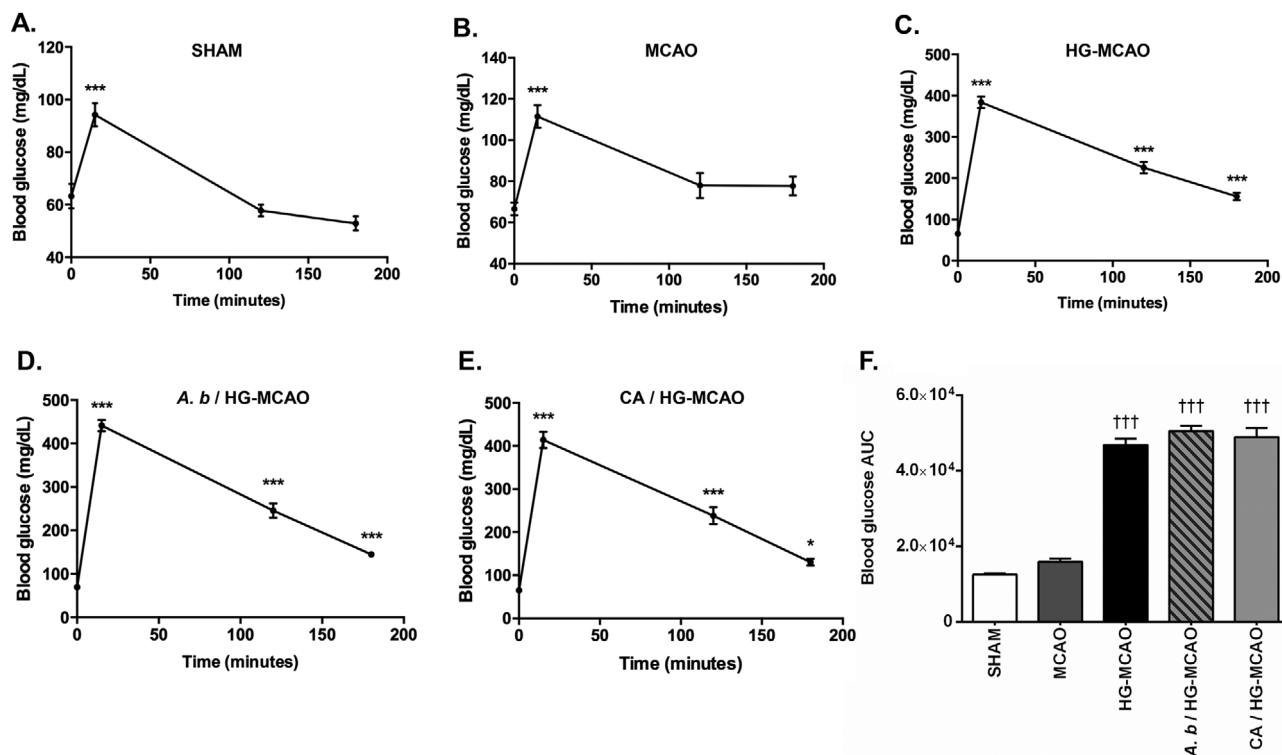


Figure 6. Effect of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid on blood glucose levels of mice exposed to hyperglycemia. A) C57BL/6 control mice (SHAM) and B) mice exposed to ischemia-reperfusion (MCAO) were i.p.-administered with saline solution (0.9% NaCl), 15 min before surgery. Mice received an i.p. injection of glucose (HG-MCAO group, 2.2 g per kg body weight) C) without or D) with *A. borbonica* polyphenols (*A. b* / HG-MCAO, 50 mg per kg body weight) or E) caffeic acid (CA / HG-MCAO, 50 mg per kg body weight), 15 min before cerebral ischemia. Blood collected from the tail was sampled and glycemia measured by hemoglucotest before i.p. injection, 15 min after injection, just before the surgery time, at reperfusion time, 1 h after reperfusion and 2 h after reperfusion. F) Area under curve index (AUC) was calculated. Data were expressed as means \pm SEM of $n \geq 3$. $p < 0.05$, ***: $p < 0.005$ as compared to blood glucose levels at time 0 min. †††: $p < 0.005$ as compared to MCAO group.

cerebral ischemia, an immunohistochemical analysis of GFAP used as an astrocyte morphology marker, was performed. Hyperglycemia induced an increased GFAP staining in the corpus callosum of the infarcted hemisphere, suggesting an alteration of astrocyte reactivity (Figure 8C). Interestingly, *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid limited this effect of hyperglycemia.

2.8. Effect of *A. borbonica* Polyphenols and Caffeic Acid on Markers of Cerebral Redox Status, BBB Structural Composition, and Neutrophil Recruitment in an Ischemia-Reperfusion Mouse Model Exposed to Hyperglycemia

Results described above indicate that hyperglycemia aggravated cerebral hemorrhagic transformation and neuro-inflammation mediated by ischemia-reperfusion. Polyphenols exerted a protective effect against hyperglycemia action. To elucidate the possible molecular mechanisms involved, markers of oxidative stress, BBB disruption and neutrophil infiltration were explored. Data show that hyperglycemia caused an up-regulation of Cu/ZnSOD and Nrf2 protein levels that may reflect an alteration of cerebral redox status (Figure 9A). Hyperglycemia also led to a decrease in the level of VE-Cadherin adherens junction protein that constitutes a crucial component of BBB structure. Moreover, hyper-

glycemia induced an elevation of the level of MPO, used as an indicator for neutrophil recruitment (Figure 9B). Noticeably, *A. borbonica* polyphenol-rich extract and caffeic acid abrogated all these deleterious effects of hyperglycemia. Importantly, caffeic acid (Figure 9C) and its methylated metabolite ferulic acid (Figure 9D) were detected at higher concentrations ranging 8–10 nM in the infarcted hemisphere of mice exposed to polyphenols, suggesting their ability to reach and to protect the brain.

3. Discussion

The present study provides evidence that a polyphenol-rich extract from *A. borbonica* medical plant and its predominant constituent caffeic acid, exerted a protective role on cerebral endothelial cells and in an ischemia-reperfusion mouse model exposed to high glucose condition. In this context, MCAO procedure was performed in mice as a model widely used to mimic biochemical and pathological features related to stroke in humans. Several studies described the use of MCAO model to evaluate the neuroprotective action of polyphenols.^[19,24–27] Nevertheless, to our knowledge, few data reported polyphenol benefits during cerebral ischemia under hyperglycemic conditions. Here, for our in vivo study, an i.p. administration of glucose was performed in mice to induce an acute

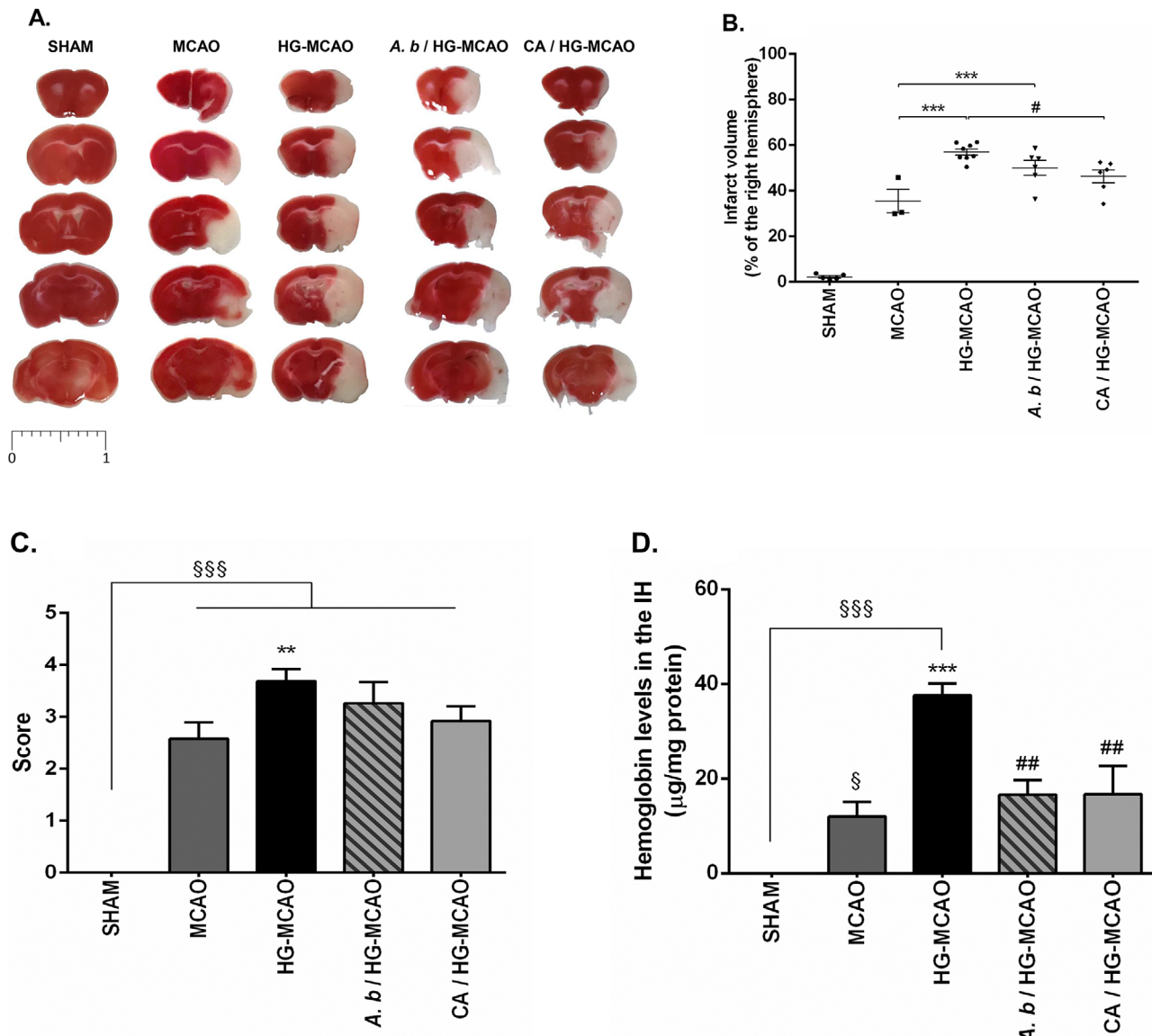
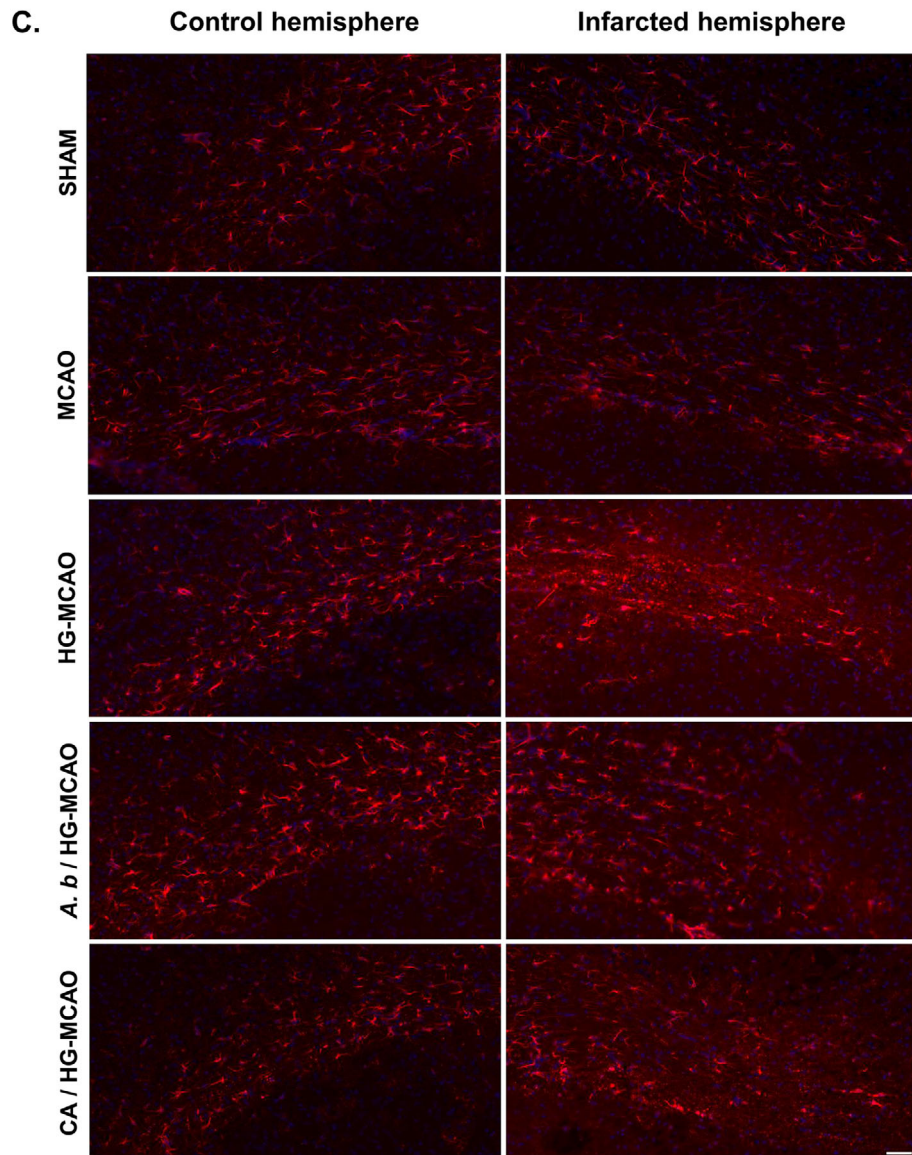
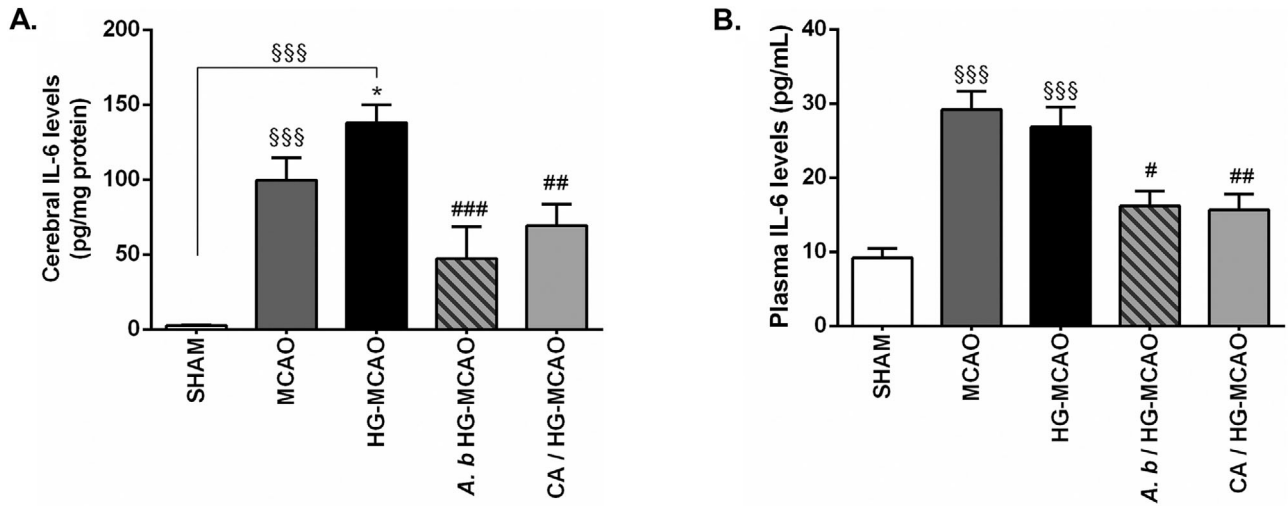


Figure 7. Effect of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid on cerebral infarct volume, neurological deficit and hemorrhagic transformation in an ischemia-reperfusion mouse model exposed to hyperglycemia. C57BL/6 control mice (SHAM) and mice exposed to ischemia-reperfusion (MCAO) were i.p.-administered with saline solution (0.9% NaCl), 15 min before surgery. Alternatively, mice received an i.p. injection of glucose (HG-MCAO group, 2.2 g per kg body weight) without or with *A. borbonica* polyphenols (A. b / HG-MCAO, 50 mg per kg body weight) or caffeic acid (CA / HG-MCAO, 50 mg per kg body weight), 15 min before cerebral ischemia. After 90 min of ischemia and reperfusion for 20 h, the cerebral infarct volume (white area) was A) measured on brain sections by TTC vital staining and B) quantified as a percentage of the infarcted hemisphere. The neurological deficit was evaluated and C) expressed as a score ranging from 0 to 5. D) Hemoglobin content in the infarcted hemisphere (IH) was quantified by ELISA kit. Data were expressed as means \pm SEM of $n \geq 3$. §: $p < 0.05$, §§§: $p < 0.005$ as compared to SHAM group, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$ as compared to MCAO group, and #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ as compared to HG-MCAO group.

hyperglycemia characterized by blood glucose levels ranging from 300 to 400 mg dL⁻¹, in agreement with our published data.^[28] Regarding our in vitro study conducted on cerebral endothelial cells, an experimental hyperglycemic condition was mimicked by exposing cells to a high glucose concentration (33 mM) after a glucose starvation (5.5 mM). Although the limitation of this experimental hyperglycemic condition warrants mention, several authors reported a similar treatment of in vitro cellular models to mimic hyperglycemia and showed high glucose-induced endothelial damages including oxidative stress,

pro-inflammatory response as well as altered permeability and vasoactive marker production.^[7,8,10]

First, both our in vitro and in vivo studies demonstrate the ability of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid to attenuate the alteration of redox markers aggravated by the hyperglycemic condition in cerebral endothelial cells and in ischemic brain of mice. Indeed, we found that high glucose concentration promoted oxidative stress by deregulating ROS levels, Nox4 gene expression, Cu/ZnSOD protein amount and enzymatic activity as well as Nrf2 gene expression and activation explored through its



nuclear translocation. Endothelial cells constituting cerebral blood vessels are rich in mitochondria and NADPH oxidases that are two major ROS sources.^[9] Moreover, brain is not well equipped with antioxidant defenses and overproduction of free radicals is known to alter lipids, proteins, and nucleic acids, leading to cellular damage and risk of death in cerebral ischemia-reperfusion injury, due to the large oxygen consumption by brain.^[29] Thus, therapeutic strategies aiming to decrease ROS production are of high interest. Nox4 is the most abundant vascular NADPH oxidase isoform with high expression in endothelial cells.^[30] Here, our results show an increase in ROS production associated with an up-regulated Nox4 gene expression in bEnd.3 cerebral endothelial cells exposed to high glucose concentration. This agrees with results showing a persistent increase in Nox4 mRNA levels in human aortic endothelial cells exposed to hyperglycemic conditions during 24–72 h. This effect was

related to an induction of NF κ B/p65 phosphorylation, nuclear translocation, and binding to Nox4 gene promoter.^[31] Consistently, our present data indicate an activation of NF κ B pathway in cerebral endothelial cells under hyperglycemic conditions. It was reported an elevation of Nox4 protein levels in cerebral endothelial cells and neurons of ischemic brains in MCAO-exposed mice and samples from stroke patients. Additionally, a link between Nox4 protein level, infarct size, and neurological score improvement was established in Nox4^{-/-} mice.^[12] Of note, bEnd.3 cell treatment with Nox inhibitor apocynin reduced ROS levels and the polyphenol resveratrol protected bEnd.3 cells via inhibition of the hyperglycemic condition-mediated Nox activation and ROS production.^[32] Our data demonstrate that *A. borbonica* polyphenol-rich extract and caffeic acid counteracted hyperglycemic condition-induced Nox4 gene expression and decreased ROS levels in bEnd.3 cells. In an ischemia-reperfusion

Figure 8. Effect of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid on brain and plasma inflammatory status in an ischemia-reperfusion mouse model exposed to hyperglycemia. C57BL/6 control mice (SHAM) and mice exposed to ischemia-reperfusion (MCAO) were i.p.-administered with saline solution (0.9% NaCl), 15 min before surgery. Alternatively, mice received an i.p. injection of glucose (HG-MCAO group, 2.2 g per kg body weight) without or with *A. borbonica* polyphenols (*A. b* / HG-MCAO, 50 mg per kg body weight) or caffeic acid (CA / HG-MCAO, 50 mg per kg body weight), 15 min before cerebral ischemia. After 90 min of ischemia and reperfusion for 20 h, IL-6 levels were quantified in A) brain and in B) plasma by ELISA kit. The evaluation of the neuro-inflammation was completed by labeling in brain sections the GFAP astrogliosis marker by immunohistochemistry. C) DAPI staining was used for nuclei staining. Bar: 50 μ m. Data were expressed as means \pm SEM of $n \geq 4$. $\text{\textcircled{S}}$: $p < 0.005$ as compared to SHAM group, *: $p < 0.005$ as compared to MCAO group, and #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$, ###: $p < 0.005$ as compared to HG-MCAO group.

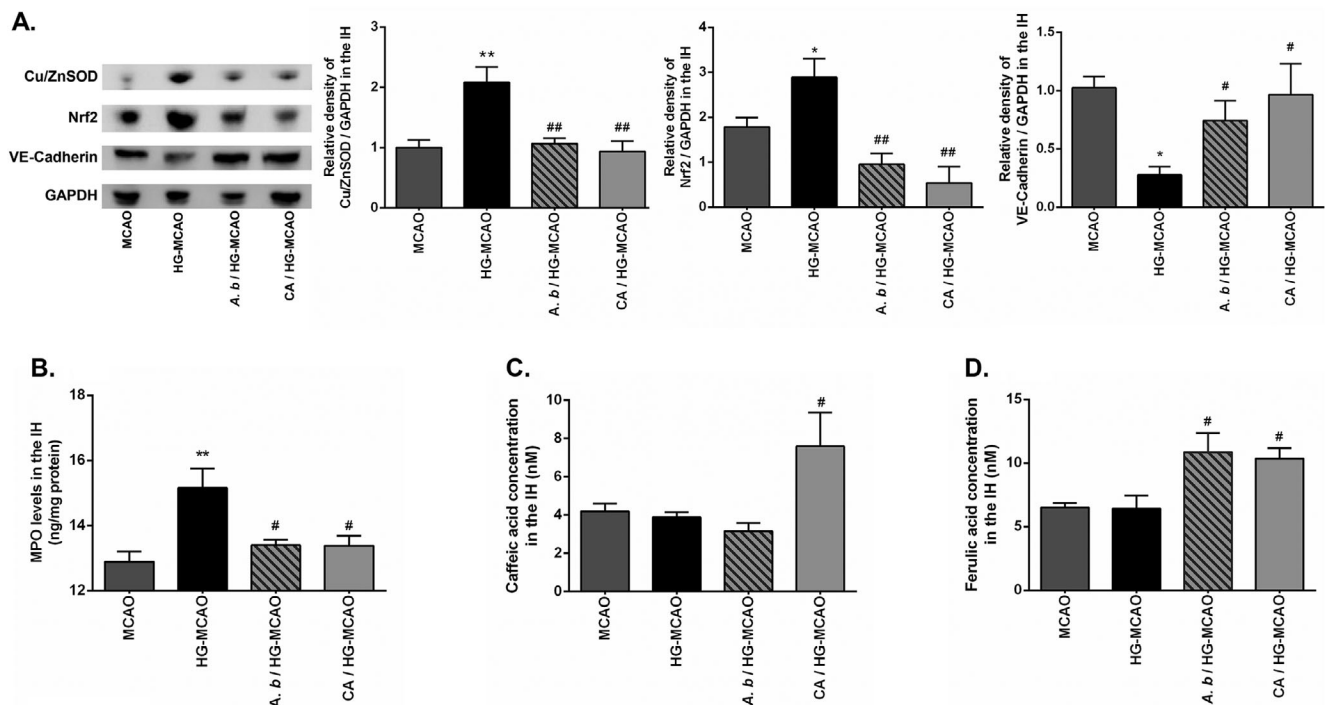


Figure 9. Effect of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid on markers of cerebral redox status, BBB structural composition and neuro-inflammation in an ischemia-reperfusion mouse model exposed to hyperglycemia. C57BL/6 control mice (SHAM) and mice exposed to ischemia-reperfusion (MCAO) were i.p.-administered with saline solution (0.9% NaCl), 15 min before surgery. Alternatively, mice received an i.p. injection of glucose (HG-MCAO group, 2.2 g per kg body weight) without or with *A. borbonica* polyphenols (*A. b* / HG-MCAO, 50 mg per kg body weight) or caffeic acid (CA / HG-MCAO, 50 mg per kg body weight), 15 min before cerebral ischemia. A) After 90 min of ischemia and reperfusion for 20 h, levels of Cu/ZnSOD, Nrf2, and VE-Cadherin proteins were determined by western-blotting and normalized against GAPDH housekeeping protein level in the infarcted hemisphere (IH). B) MPO levels in the IH were quantified by ELISA kit. C) Levels of caffeic acid and D) ferulic acid in the IH were measured by ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Data were expressed as means \pm SEM of $n = 2$ for western-blotting analysis and $n \geq 5$ for the other experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ as compared to MCAO group, and #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ as compared to HG-MCAO group.

mouse model, Tang et al.^[33] reported the ability of salvianolic acid-rich extract from *Salvia miltiorrhiza* Chinese medicinal plant, to reduce Nox subunit membrane translocation by modulating AMP-activated protein kinase/protein kinase B pathway activation in ischemic brain. Oxidative stress occurs due to an imbalance between ROS generation and antioxidant defense system. Our results show an increased activity of Cu/ZnSOD in cerebral endothelial cells and a higher level of Cu/ZnSOD protein in the infarcted hemisphere of MCAO mice in hyperglycemic conditions. A similar modulation of Cu/ZnSOD and catalase activities was observed in cerebral and peripheral endothelial cells exposed to chronic hyperglycemia for 7–14 days.^[34,35] Recently, we reported an elevation of Cu/ZnSOD and catalase activities as well as a modulation of Cu/ZnSOD, catalase, and heme oxygenase-1 (HO-1) gene expression in bEnd.3 cells exposed to an acute hyperglycemic condition for 3–6 h. Cell preconditioning with inhibitors targeting NFκB, c-Jun N-terminal kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, or phosphoinositide 3-kinase signaling molecules, partly blocked hyperglycemic condition-induced redox changes, suggesting their causal role in high glucose concentration deleterious action.^[36] Among the transcriptional factors involved in redox homeostasis, Nrf2 is key player by regulating the expression of genes encoding antioxidant enzymes. During physiological conditions, in the unstressed cells, Nrf2 is bound to Kelch-like ECH associated protein 1 (Keap 1) in the cytoplasm. During oxidative stress, the overproduction of ROS promotes Keap 1 oxidation, leading to the dissociation of the Keap 1/Nrf2 complex and thus to Nrf2 release and nuclear translocation, in order to activate the expression of genes coding for antioxidant enzymes. Our results show that the hyperglycemic condition caused an activation of Nrf2 transcriptional factor through its nuclear translocation and a down-regulation of its gene expression in cerebral endothelial cells in vitro. Noteworthy, we found an increase in Nrf2 protein levels in the infarcted hemisphere of a mouse stroke model. This discrepancy may be related to the diversity of cells inside the brain tissue that could behave differently than endothelial cells and also to the duration of the hyperglycemic condition exposure in our experimental models. Indeed, we previously reported a time-dependent regulation of Nrf2 gene expression in cerebral endothelial cells exposed to hyperglycemia. Whereas Nrf2 gene expression decreased and correlated with ROS production in cells exposed to hyperglycemic conditions for 3 h, it increased after 6 h of high glucose exposure and was associated with reduced ROS levels. Furthermore, we observed a nuclear translocation of Nrf2 in cells exposed to hyperglycemia for 6 h.^[36] Interestingly, this study demonstrates that *A. borbonica* polyphenols as well as caffeic acid limited Nrf2 nuclear translocation and its gene expression reduction mediated by the hyperglycemic condition. Literature data reported that polyphenols such as quercetin, ferulic acid, or caffeic acid are able to regulate Nrf2 production.^[37,38] Sirota et al.^[39] showed that caffeic acid induced Nrf2 translocation into the nucleus and consequently its transcription in ovarian carcinoma cell lines. Here, in mice from HG-MCAO group receiving an i.p. glucose administration, blood glucose levels increased after 15 min, then decreased but did not return to baseline after 6 h. This could contribute to explain the elevation of Nrf2 protein level in brain exposed to hyperglycemia and ischemia during 90 min, followed by reperfusion for 20 h.

Consistently, we found an increase in Cu/ZnSOD protein level in the infarcted hemisphere of HG-MCAO mice, demonstrating an activation of the antioxidant system during hyperglycemia. This result agrees with data reporting Nrf2 protein overproduction caused by hyperglycemic conditions in peripheral endothelial cells.^[40] Nrf2 activation was found to improve vascular function and to reduce vasoconstriction in diabetic mice or Nrf2^{-/-} rat models.^[41,42] Importantly, several studies showed the activation of Nrf2 following an experimental stroke, to protect brain from pro-inflammatory response and oxidative stress at the reperfusion as well as BBB integrity.^[43,44] Indeed, Nrf2 is known to maintain angiogenic capacity of microvascular endothelial cells.^[45] Our study demonstrates the ability of *A. borbonica* polyphenol-rich extract and caffeic acid to improve Cu/ZnSOD and Nrf2 protein levels deregulated by the hyperglycemic condition in cerebral endothelial cells and the infarcted hemisphere of a mouse stroke model. Caffeic acid was also reported to attenuate high glucose concentration-induced redox changes in other cellular types including human retinal endothelial cells and human umbilical vein endothelial cells through regulation of SOD and Nrf2.^[46,47] The antioxidant capacity of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid may also result from their ability to directly scavenge ROS, as we previously showed using in vitro free radical-scavenging assays.^[21,22] Moreover, polyphenols such as caffeic acid are able to improve mitochondrial metabolism during oxidative stress.^[48] Such events may promote the decrease in ROS levels and thus the reduction of Nrf2 nuclear translocation observed in this study. Ashafaq et al.^[27] nicely demonstrated that protective antioxidant effects of polyphenols such as catechin during cerebral ischemia in mice could be attributed to increased levels of glutathione in frontal cortex and striatum. Catechin antioxidant action correlated with an improvement of antioxidant enzyme activities and a limited cerebral inflammatory response through down-regulation of NFκB and inducible NO synthase in ischemic brain. This provides evidence for a crosstalk between oxidative stress and inflammation, and highlights benefits of polyphenols exhibiting both antioxidant and anti-inflammatory activities. Our previous studies showed that *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid exerted antioxidant and anti-inflammatory effects on adipose cells exposed to various pro-inflammatory mediators comprising hydrogen peroxide, tumor necrosis factor-α (TNF-α) and bacterial lipopolysaccharides (LPS).^[21,22] Of note, protective effects of *A. borbonica* polyphenols depicted here in cerebral endothelial cells could also be attributed to other polyphenols identified in the plant extract such as quercetin and chlorogenic acid. Both polyphenols were found to induce Nrf2 upregulation and antioxidant enzyme activation in human aortic endothelial cells during LPS-mediated oxidative stress^[49] and to improve ROS and SOD levels decreased in TNFα-treated human umbilical vein endothelial cells.^[50] During hyperglycemia, the crosstalk between oxidative stress and inflammation leads to endothelial dysfunction, through an alteration of eNOS activity and NO vasodilator production.^[51] Noticeably, our results demonstrate that *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid abrogated the reduction of eNOS gene expression and NO levels as well as the up-regulation of ET-1 gene expression in cerebral endothelial cells exposed to the hyperglycemic condition. These results suggest the possible capacity of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid to improve vasodilation and to reduce

vasoconstriction. Other polyphenols such as chlorogenic acid and quercetin were reported to protect endothelial cells against HOCl-mediated oxidative stress and to ameliorate ex vivo aortic vessel function by inducing eNOS phosphorylation and NO generation.^[52,53]

The present study demonstrates the anti-inflammatory properties of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid. Indeed, polyphenols counteracted NF κ B pathway activation and IL-6 secretion exacerbated by the hyperglycemic condition in cerebral endothelial cells. In parallel, polyphenol administration led to a reduction of cerebral IL-6 levels raised in ischemic mice exposed to hyperglycemia. Accordingly, literature data demonstrated that caffeic acid inhibited the nuclear translocation of NF κ B in human umbilical vein endothelial cells exposed to a high glucose concentration.^[46] In addition, caffeic acid decreased striatum inflammatory injury by reducing the levels of cytokines such as IL-6 and TNF- α as well as inducible NO synthase, cyclooxygenase-2, and GFAP in mice.^[54] Astrocytes represent the major glial cells within the brain and are key players of the BBB function. Production of GFAP intermediate filament is increased during astrocyte hypertrophy and constitutes a hallmark of reactive astrogliosis in a wide range of neuro-inflammatory conditions.^[55] Interestingly, *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid limited GFAP increased production within the infarcted hemisphere of mice exposed to hyperglycemia. This result underlines the possibility that the protective action of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid against neuro-inflammation may also result from a down-regulation of astrocyte reactivity aggravated by hyperglycemia during ischemia-reperfusion. Similarly, the polyphenol catechin down-regulated GFAP production in rat ischemic brain and its protective anti-inflammatory action correlated with an improvement of cerebral antioxidant enzyme activities and a reduction of infarct volume, neuronal loss, and neurological deficits.^[27] In our study, only caffeic acid significantly reduced cerebral infarct volume but both caffeic acid and *A. borbonica* polyphenols did not modulate neurological deficit aggravated by hyperglycemia. It would be relevant to assess a dose-dependent effect of *A. borbonica* polyphenols on cerebral infarct volume in order to understand the lack of effect detected in this study. Moreover, considering that the neurological deficit was estimated according to the method of Menzies et al.^[23] using a global score table, it would be of high interest to assess polyphenol effects during a chronic exposure and through more specific behavioural studies including the assessment of sensorimotor and cognitive deficits as well as muscular coordination skill. Our findings indicating that *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid down-regulated MPO levels in the infarcted hemisphere of mice exposed to hyperglycemia also raise the possibility that polyphenols counteracted neuro-inflammatory injury by attenuating neutrophil infiltration through BBB. Neutrophils are known to be recruited in ischemic brain and to produce proteases and ROS, damaging BBB integrity.^[56] According to Desilles et al.,^[5] cerebral levels of both MPO and matrix metalloproteinase protein-9 used as indicators of neutrophil recruitment, were elevated by hyperglycemia in a streptozotocin-induced diabetes rat model. Moreover, neutrophils isolated from hyperglycemic diabetic patients exhibited increased adhesion to endothelial cells as compared to neutrophils from normoglycemic subjects.^[5] Thus, hyperglycemia may aggravate cerebrovascular damage during ischemia-

reperfusion by exacerbating neutrophil infiltration through BBB and subsequent neuro-inflammatory injury. BBB integrity depends on the expression and distribution of tight junctions and adherens junction proteins like VE-Cadherin. During diabetes, hyperglycemia impairs BBB integrity and transport functions.^[6] VE-Cadherin is a strictly endothelial specific protein located at junctions between endothelial cells, playing a crucial role in cell contact integrity, and vascular permeability.^[57] Interestingly, our data demonstrate the ability of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid to counteract hyperglycemia-mediated reduction of VE-Cadherin protein level in the infarcted hemisphere of ischemic mice. Concomitantly, polyphenols decreased the cerebral content of hemoglobin that was elevated in hyperglycemic mice, suggesting their ability to attenuate hemorrhagic transformation aggravated by hyperglycemia by preserving BBB structure. Considering the importance of BBB integrity for brain homeostasis, it will be essential to evaluate *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid action on the production of other key proteins involved in BBB junctional complex such as ZO-1, claudin-5, and occludin. Literature data already support the capacity of some polyphenols to improve the production of tight junction proteins in endothelial cells or astrocytes exposed to pro-inflammatory condition or oxidative stress.^[58-60] Our study shows that *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid exerted antioxidant and anti-inflammatory properties at the brain level. Importantly, these effects were associated with the detection of higher levels of caffeic acid and its methylated metabolite ferulic acid in the brain. Previously, we identified ferulic acid as one major circulating metabolite in rats fed caffeic acid.^[61] Similarly to caffeic acid, ferulic acid was shown to exert a neuroprotective role in cerebral ischemic injury.^[20,62] Although it is assumed that the transport of polyphenols through the BBB is limited, more and more evidence are provided concerning the presence of caffeic and ferulic acids in the brain.^[54,63] Cerebral concentrations of caffeic and ferulic acids detected in our study are in agreement with those reported in literature data which indicate that absorbed phenolic acids can accumulate in the brain at pharmacologically-relevant nanomolar concentrations.^[63] Further studies will be needed to elucidate the mechanism involved in polyphenol transport through the BBB.

To conclude, this study provides evidence for the protective effects of *A. borbonica* polyphenols and caffeic acid on cerebral endothelial cells and in an ischemia-reperfusion mouse model exposed to a hyperglycemic condition. Polyphenols counteracted oxidative stress, attenuated the alteration of the production of vasoactive markers, and reduced cerebral infarct volume, hemorrhagic transformation and neuro-inflammation aggravated by hyperglycemia, suggesting a protective action against BBB disruption and loss of brain homeostasis. It will be of high interest to evaluate the benefits of polyphenol-based therapeutic approaches in order to attenuate cerebrovascular damage and to improve stroke recovery during type 2 diabetes.

4. Experimental Section

Materials: All chemicals, including glucose and standard caffeic, ferulic, chlorogenic, and syringic acids, were obtained from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA).

Identification and Quantification of Polyphenols Extracted from *A. borbonica*: *A. borbonica* medicinal plant was collected in La Réunion (France) and botanically identified (Rubiaceae, RUN052-F voucher number). Leaf and stem were dried by airflow at 45 °C then reduced to powder. *A. borbonica* polyphenol-rich extract was prepared from 6 g of powder dissolved in 30 mL of an aqueous acetone solution (70%, v/v). The mixture obtained was placed for 90 min at 4 °C, then centrifuged at 1400 g at 4 °C for 20 min. The polyphenol-rich plant extract supernatant was collected and stored at –80 °C until analysis. Identification and quantification of polyphenols were performed by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem array detection (280 nm) and electrospray ionization-mass spectrometry (UPLC-MS, Agilent Technologies, Les Ulis, France), according to the method previously published.^[22] Measurement of total polyphenol content was achieved using Folin–Ciocalteu assay as described previously,^[22] and expressed as g gallic acid equivalent (GAE) per 100 g plant.

Cell Culture: Murine immortalized brain endothelial cell (bEnd.3) cerebral endothelial cells were obtained from the American Type Culture Collections (ATCC-CRL-2299, VA, USA). bEnd.3-Blue cell line resulted from the transfection of bEnd.3 cells with the plasmid pNiFty2-secreted alkaline phosphatase (pNiFty2-SEAP, Invivogen, Toulouse, France) using lipofectamine 3000 (ThermoFischer Scientific, Les Ulis, France) and obtained after three weeks of selection with zeocin at 200 µg mL⁻¹ (Invivogen, Toulouse, France). pNiFty2-SEAP plasmid is composed of an endothelial cell-leukocyte adhesion molecule proximal promoter, five specific NFκB repeated transcription factor binding sites and a SEAP reporter gene. The culture medium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Pan Biotech, Dutscher, Brumath, France) was used for the cell culture and contained 25 mM glucose, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Pan Biotech, Dutscher, Brumath, France), 5 mM L-glutamine (Pan Biotech, Dutscher, Brumath, France), 2 µg mL⁻¹ streptomycin (Pan Biotech, Dutscher, Brumath, France) and 50 µU mL⁻¹ penicillin (Pan Biotech, Dutscher, Brumath, France). bEnd.3-Blue cells were cultured in complete DMEM containing 200 µg mL⁻¹ zeocin. Cells were kept in a humidified atmosphere at 5% CO₂, 37 °C.

Animal Procedures and Experimental Design: Experiments were conducted in accordance with the French and European Community Guidelines for the Use of animals in Research (86/609/EEC and 2010/63/EU), after the approval of the local Ethics Committee for animal experimentation (APAFIS#10949-2017070616078287v1). Ten-week C57BL/6 male mice purchased from Charles River Laboratory (Saint-Germain Nuelles, France), were fed a standard diet ad libitum and maintained under standard conditions of temperature, light, and humidity.^[64] For the experiment, 12 h fasted mice (25 g) were assigned to different groups comprising sham-operated mice (SHAM group, *n* = 9), ischemia-reperfusion mouse model exposed to middle cerebral artery occlusion (MCAO group, *n* = 15), ischemia-reperfusion mouse model subjected to MCAO after induction of hyperglycemia (HG-MCAO group, *n* = 20), with or without intraperitoneal (i.p.) injection of *A. borbonica* polyphenol-rich extract (*A. b*/HG-MCAO, *n* = 15) or caffeic acid (CA/HG-MCAO, *n* = 15). A single i.p. injection of a mix of 200 µL saline solution (NaCl 0.9%) and 70 µL distilled water was performed in both SHAM and MCAO groups after anesthesia, by using a 25G needle. HG-MCAO, *A. b*/HG-MCAO and CA/HG-MCAO groups received through i.p. administration a mix of 200 µL glucose 30% (2.2 g per kg body weight) and 70 µL distilled water or *A. borbonica* polyphenols (50 mg per kg body weight) or caffeic acid standard (50 mg per kg body weight) prepared in distilled water, respectively. After 15 min, blood from the tail was sampled and glycemia measured. Mice were considered to exhibit acute hyperglycemia when blood glucose levels ranged from 300 to 400 mg dL⁻¹. Mice were anesthetized with Isoflurane (isoFlo Centravet, Maisons-Alfort, France) under the control of their body temperature, maintaining at 34 °C with a heating pad. MCAO procedure was performed for 90 min in all animals except SHAM group by advancing a 7-0 silicon-coated monofilament (Doccol Corporation, Sharon, MA, USA) from the external carotid into the lumen of the right common carotid to reduce cerebral flow at the bifurcation of the right internal carotid and the right middle cerebral artery.^[65,28] Analgesic administration was achieved by subcutaneous injection of Buprenorphine

(0.05–0.1 mg per kg) (Buprecare Centravet, Maisons-Alfort, France). After the removal of the monofilament under anesthesia, the reperfusion procedure was conducted for 20 h. To prevent dehydration, saline solution was injected subcutaneously after anesthesia. During the reperfusion period, mice were placed in individual cages with water, food and refinement. After reperfusion procedure, animals were anesthetized, and euthanized by intracardiac blood puncture, followed by an intracardiac perfusion of 20 mL saline solution. Plasma samples obtained after blood centrifugation were stored at –20 °C until analysis. Brains were collected, frozen in nitrogen and stored at –80 °C or cut in a brain matrix mold into 1 mm coronal slices for measuring cerebral infarct volume. Alternatively, brains were also fixed in 4% paraformaldehyde-phosphate buffer saline (PBS) for immunohistochemistry studies. The operator was unaware of the animal group assignment during surgery and the experiments were blinded. Animals were excluded for analysis if a subarachnoid hemorrhage was found or if the time of surgery exceeded 30 min. No death caused by anesthesia or surgery occurred within 4 h following MCAO procedure.

Cell Viability Assay: Murine bEnd.3 cerebral endothelial cells were cultured in 24-well plates at a density of 7.5 × 10⁴ cells per well and allowed to grow until 100% confluence in DMEM containing 5.5 mM glucose for 24 h of glucose starvation. Then, the culture medium was removed and cells exposed to a normoglycemic (5.5 mM glucose) or hyperglycemic conditions (33 mM glucose) in presence or not of *A. borbonica* polyphenols (10 µM GAE) or caffeic acid standard (10 µM) for 24 h. After removing culture medium and washing with PBS, cells were detached using trypsin-EDTA and centrifuged (500 g, 4 min, 25 °C). After staining with Trypan blue solution, cells were counted in a Malassez chamber.

Measurement of Intracellular ROS Levels: The intracellular ROS levels were performed by the quantification of the oxidation of the fluorogenic probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), according to the method previously described.^[22] Briefly, bEnd.3 cells were seeded in 96-well black plates at a density of 1.8 × 10⁴ cells per well and allowed to grow until 100% confluence in DMEM containing 5.5 mM glucose for 24 h. Then, the culture medium was removed and cells maintained in PBS containing 10 µM of DCFH-DA, in a humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C for 45 min. Next, bEnd.3 cells were exposed to normoglycemic or hyperglycemic conditions in the presence or not of *A. borbonica* polyphenols (10 µM GAE) or caffeic acid (10 µM) from 3 to 24 h. Fluorescence intensity was measured at an excitation wavelength of 492 nm and an emission wavelength of 520 nm (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Cambridge, UK).

Protein Extraction and Quantification: Murine bEnd.3 cells were washed with PBS, scrapped and pooled before resuspension in phosphate buffer (KH₂PO₄ (100 mM), DTT (1 mM), pH 7.4). Cells were lysed and proteins extracted using the freeze-thaw method achieved through four cycles of fast freezing in liquid nitrogen and subsequent thawing in 37 °C water bath. Total protein contents were measured by the bicinchoninic acid assay (BCA) using bovine serum albumin (BSA) calibration curve. Concerning protein extraction from brain collected in ischemia-reperfusion mice model, cerebral hemispheres were separated and homogenized in lysis buffer (Tris-HCl (20 mM) pH 8.5, EDTA (1 mM), Triton X-100 (0.05%), pH 7.4) by TissueLyser II (Qiagen, Courtaboeuf, France) with two tungsten carbide balls per tube (cerebellum was removed). Brain homogenates were lysed at 25 Hz for 1 min then centrifuged at 14000 g for 10 min at 4 °C. Supernatants were collected for protein quantification by BCA assay and stored at –80 °C until western-blotting was performed.

Measurement of SOD Activity: Total SOD activity from bEnd.3 cell protein lysates was determined by measuring the rate of acetylated cytochrome C reduction by superoxide radicals generated via xanthine/xanthine oxidase system, according to a method previously published.^[36] Briefly, total SOD activity was assessed in a reagent buffer containing xanthine oxidase (1–2 U mg⁻¹ protein), xanthine (0.5 mM), KH₂PO₄ (50 mM), cytochrome C (0.2 mM), and EDTA (2 mM), pH 7.8. For manganese superoxide dismutase (MnSOD) activity measurement, NaCN (1 mM) was added to induce a specific inhibition of copper/zinc superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) activity from total SOD activity. SOD activity was calculated by measuring the absorbance at 550 nm (FLUOstar

Optima, BMG Labtech, Cambridge, UK) every 5 sec for 3 min at 25 °C, and expressed as U g⁻¹ protein.

Evaluation of Relative Gene Expression: Murine bEnd.3 cells were exposed to normoglycemic (5.5 mm glucose) or hyperglycemic conditions (33 mm glucose) in the presence or not of *A. borbonica* polyphenols (10 μM GAE) or caffeic acid standard (10 μM) for 3 h. Then, total RNA was extracted by using TRIzol (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France) and a total amount of 4 μg was reverse-transcribed (RT) by using Random hexamer primers (Eurogentec, Liège, Belgium) with Superscript II (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France). The quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed using SYBR green master Mix (Eurogentec, Liège, Belgium) and data analyzed by the 7500 system SDS software (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France). Relative expression of genes coding for Nox4 (Forward: GAT-CAC-AGA-AGG-TCC-CTA-GCA-G and Reverse: GTT-GAG-GGC-ATT-CAC-CAA-GT), Nrf2 (Forward: TTG-GCA-GAG-ACATTC-CCAT and Reverse: GCT-GCC-ACC-GTC-ACT-GGG), eNOS (Forward: CTG-TGG-TCT-GGT-GCT-GGT-C and Reverse: TGG-GGC-AAC-TTG-AAG-AGT-GTG) and ET-1 (Forward: CCC-TTT-GCAGAA-TGG-ATT-AT and Reverse: CTG-TAG-TCA-ATG-TGC-TCC-GT) was normalized against the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) housekeeping gene (Forward: TTC-ACC-ACC-ATG-GAG-AAG-GC and Reverse: GGC-ATG-GAC-TGT-GGT-CAT-GA).

Evaluation of Nrf2 Nuclear Translocation: To evaluate the activation of Nrf2 through its nuclear translocation, murine bEnd.3 cells were seeded on coverslips in 24-well tissue culture plates (7.5 × 10⁴ cells per well at 100% confluence) in DMEM containing 5.5 mm glucose for 24 h. Then, cells were exposed to normoglycemic (5.5 mm glucose) or hyperglycemic conditions (33 mm glucose) in the presence or not of *A. borbonica* polyphenols (10 μM GAE) or caffeic acid standard (10 μM) for 3 h. Media were removed, cells washed with PBS and fixed in frozen ethanol for 10 min at -20 °C. Then, cells were washed and permeabilized in Triton X-100 (0.2%) for 10 min before being blocked in PBS/Triton X-100 0.2%/BSA 1% for 45 min at room temperature. Cells were incubated at 4 °C with the anti-Nrf2 antibody (1:500, Abcam, Paris, France) in PBS/Triton X-100 0.2%/BSA 1% overnight. The next day, cells were washed and incubated at room temperature for 2 h with the Donkey-Anti-Rabbit IgG H&L (1:1000, Abcam, Paris, France) and with the 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 100 ng mL⁻¹, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Then, cells were washed three times with PBS and twice with distilled water and the coverslips were mounted on slides with mounting medium. Lastly, a fluorescent analysis of Nrf2 translocation was performed by using confocal microscopy (Confocal Nikon C2si) and NIS elements software.

Evaluation of NFκB/SEAP Activity: Murine bEnd.3-Blue cells expressing NFκB/SEAP reporter gene, were cultured in 96-well black plates (1.8 × 10⁴ cells per well at 100% confluence) in DMEM containing 5.5 mm glucose for 24 h. Next, cells were exposed to normoglycemic (5.5 mm glucose) or hyperglycemic (33 mm glucose) conditions in the presence or not of *A. borbonica* polyphenols (10 μM GAE) or caffeic acid standard (10 μM) for 3–24 h. NFκB/SEAP activity was monitored by using Quanti-Blue assay (Invivogen, Toulouse, France), with absorbance measurement at 620–655 nm (NanoQuant infinite M200PRO, Tecan, Männedorf, Switzerland).

Measurement of IL-6 Secretion: Murine bEnd.3 cells were cultured in 6-well plates (3.5 × 10⁵ cells per well at 100% confluence) in DMEM with 5.5 mm glucose for 24 h. After removing the culture medium, cells were exposed to normoglycemic (5.5 mm glucose) or hyperglycemic (33 mm glucose) conditions in the presence or not of *A. borbonica* polyphenols (10 μM GAE) or caffeic acid (10 μM) for 3–24 h. Then, culture media were collected and IL-6 levels measured by using Mouse IL-6 ELISA kit (eBioscience, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France). IL-6 levels from brain homogenates were also quantified as well as plasma IL-6 levels (1:1). The absorbance was measured at 450–570 nm (NanoQuant infinite M200PRO, Tecan, Männedorf, Switzerland). We normalized values obtained to total protein content measured in protein lysates extracted from bEnd.3 cells and brain homogenates by BCA assay.

Measurement of Intracellular NO Levels: Intracellular NO levels were measured by using the cell membrane permeable probe 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM) diacetate, according

to a method previously published.^[66] Briefly, murine bEnd.3 cells were cultured in 96-well black plates at a density of 1.8 × 10⁴ cells per well and allowed to grow until 100% confluence in DMEM containing 5.5 mm glucose for 24 h. Then, the culture medium was removed and cells were exposed to PBS containing DAF-FM (5 μM) for 45 min in a humidified atmosphere (5% CO₂, 37 °C). After washing with PBS, cells were exposed to normoglycemic (5.5 mm glucose) or hyperglycemic (33 mm glucose) conditions in the presence or not of *A. borbonica* polyphenols (10 μM GAE) or caffeic acid standard (10 μM) for 3 h. Next, cells were rinsed with PBS and treated for 2 h with insulin (1 μg mL⁻¹) prepared in PBS. Fluorescence intensity was determined at an excitation wavelength of 492 nm and an emission wavelength of 520 nm (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Cambridge, UK).

Measurement of Blood Glucose Levels: Blood collected from the tail was sampled and glycemia measured by hemoglucotest (Accu-Chek, Roche, Meylan, France) before i.p. injection, 15 min after injection, just before the surgery time, at reperfusion time, 1 h after reperfusion and 2 h after reperfusion. Blood glucose levels were expressed as mg dL⁻¹.

Evaluation of Neurological Deficit Score: Twenty-four hours after MCAO, a neurological deficit evaluation was performed according to score table described by Menzies et al.^[23] Briefly, score 0 for “no apparent deficit”, score 1 for “contralateral forelimb flexion when suspended by the tail”, score 2 for “decreased grip of the contralateral forelimb while tail pulled”, score 3 for “spontaneous movement in all directions; contralateral circling only if pulled by the tail”, score 4 for “spontaneous contralateral circling” and score 5 for “death after recovery from the anesthesia”.

Measurement of Cerebral Infarct Volume: Cerebral infarct volume was measured on brain slice sections stained with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 2% (TTC) at room temperature for 20 min. TTC colorless solution is reduced to red 1,3,5-triphenylformazan by mitochondrial dehydrogenases, leading to stain viable tissues. Tissues that remain unstained correspond to infarcted area with dead cells. Brain was placed in mouse brain matrix and five slices of 1 mm thickness were cut and stained. After TTC staining, pictures of coronal brain sections allowed measurement of the infarct volume via Image J software following Swanson formula and Morris analysis.^[67,68]

$$\text{Infarct volume (\% of the control hemisphere)} = \frac{V_{\text{CH}} - V_{\text{IC}}}{V_{\text{CH}}} \times 100$$

where V_{CH} is the volume of the control hemisphere (contralateral hemisphere) in all brain sections and V_{IC} is the volume of the viable area in the infarcted hemisphere (ipsilateral hemisphere) in all brain sections.

Measurement of Cerebral Hemoglobin and Myeloperoxidase Levels: Hemoglobin and myeloperoxidase (MPO) levels in homogenates of infarcted hemispheres were quantified by using mouse hemoglobin and MPO ELISA kits (Abcam, Paris, France), respectively. The absorbance was measured at 450–570 nm (NanoQuant infinite M200PRO, Tecan, Männedorf, Switzerland). Values were normalized against total protein contents measured in ischemic hemispheres by BCA assay.

Western-Blotting: Proteins extracted from brain homogenates (20 μg) were separated using sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% acrylamide) and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France). Then, membranes were blocked with 5% (w/v) non-fat dry milk in Tris balanced salt solution (TBS) containing 0.1% (v/v) Tween 20 for 1 h at room temperature and incubated with the primary rabbit anti-mouse antibodies (Abcam, Paris, France) against Cu/ZnSOD, Nrf2, VE-Cadherin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), overnight at 4 °C. Membranes were washed with TBS/0.1% Tween 20 and incubated with the corresponding goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Detection of protein/antibody complexes was performed by using enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France). The signal was developed using Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) and normalized against GAPDH housekeeping protein level.

Immunohistochemistry on Brain Sections: Brain was dissected by using a mouse brain matrix and 1 mm-thick coronal brain slices were obtained.

Then, brain sections were fixed overnight with 4% paraformaldehyde-PBS before being cryoprotected in 30% sucrose-PBS for 48 h. Next, they were embedded in Tissue-Tek O.C.T. (VWR, Briare, France) compound and frozen at -80°C . Twelve μm -thick coronal brain sections were cut using the cryostat (Shandon cryotome FE, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France) and dried for 1 h on a warming plate before rehydration twice in PBS 1X for 5 min. Antigen retrieval was performed in a sodium-citrate buffer (pH 6) using a microwave at 750 W for 2 min (until boiling). Then, tissue samples were rehydrated twice with PBS-T (PBS 0.05% triton X100) for 5 min. Non-specific antigens on brain sections were blocked for 45 min in PBS-T/1% BSA) and incubated overnight in humidified chamber with the primary antibody Rabbit anti-gliial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:1000, Dako, Les Ulis, France). Brain sections were washed twice with PBS-0.05% T for 10 min and co-incubated with the secondary antibody Alexa-Fluor 594 Goat anti-Rabbit (1:200, ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) at room temperature for 1.5 h, and cell nuclei were counterstained with the DAPI. Next, brain sections were washed twice for 10 min before being mounted with the antifading medium Vectashield (H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Finally, brain sections were scanned by NanoZoomer S60 Digital slide scanner C13210 (Hamamatsu Photonics, Massy, France).

Detection of Polyphenols in Brain: Polyphenols were extracted from brain homogenates according to the method previously described,^[69] with slight modifications. Briefly, 87.5 μL of brain homogenates were spiked with 2.5 μL of the internal standard syringic acid (1 μM). Then, 10 μL of 0.58 M acetic acid and *Helix pomatia* extract containing sulfatase and β -glucuronidase (5 μL , Sigma, St. Louis, MO, USA) were added. After incubation at 37°C for 45 min, 250 μL of methanol/HCl (200 mM) were added. Samples were centrifuged (14000 g, 4°C , 4 min) and supernatants containing polyphenols were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and Heated Electrospray Ionization (HESI)-Orbitrap mass spectrometer (Q Exactive Plus, ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France). Samples (10 μL) were injected using a Thermo Fisher Ultimate 3000 series WPS-3000 RS autosampler and separated on a pentafluorophenyl column (2.6 μm , 100 mm \times 2.1 mm, Phenomenex, Le Pecq, France). 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^{-1} , with 5% B at 0–0.1 min, 35% B at 0.1–7.1 min, 95% B at 7.1–7.2 min, 95% B at 7.2–7.9 min, 5% B at 7.9–8 min and 5% B at 8–10 min. The column temperature was held at 30°C and the detection wavelength was set to 280 nm. For the mass spectrometer conditions, a HESI source (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, auxiliary 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 7×10^4 FWHM at m/z 400. The automatic gain control was set at 1×10^6 . Orbitrap performance in negative ionization mode was evaluated weekly and external calibration of the mass spectrometer was performed with a LTQ ESI negative ion calibration solution (Pierce, ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France). Identification of polyphenols was based on their exact mass, retention time and MS/MS analysis. Data were acquired and processed by XCalibur 4.0 software (Thermo Fisher Scientific Inc., Les Ulis, France). To build calibration curves, a mix of standard solutions of caffeic, ferulic, chlorogenic, and syringic acids prepared in methanol was diluted in 0.1% formic acid in water in order to obtain concentrations ranging 0.001–5 μM . Two quality control samples were analyzed in duplicate within each batch, together with two blank samples (methanol). Peak intensities were plotted against the corresponding standard concentrations to generate the calibration curves. The recovery of the internal standard was determined similarly. Calibration curves were established according to the method previously published.^[69]

Statistical Analysis: Results were expressed as means \pm SEM. Analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test was assessed using Graph-Pad Prism 6 program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgements

This work was supported by the European Regional Development Funds RE0001897 (EU- Région Réunion - French State national counterpart), the University of La Réunion and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. A.A. is a recipient of a fellowship from the Région Réunion.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions

A.A., O.M., and M.P.G. contributed to the conception and design of the study. A.A., J.T., D.C., C.P., B.V., N.D., A.G.B., and M.P.G. were involved in the acquisition of data. A.A. and M.P.G. contributed to the analysis and interpretation of data. All authors were involved in drafting the manuscript and gave final approval for the submission of the manuscript.

Keywords

antioxidant polyphenols, cerebral endothelial cells, hyperglycemia, neuro-inflammation, oxidative stress

Received: July 19, 2019

Revised: March 8, 2020

Published online: June 16, 2020

- [1] World Health Organization, Global Report on Diabetes **2016**, ISBN 978 92 4 156525 7.
- [2] A. Rawshani, A. Rawshani, S. Franzen, B. Eliasson, A. M. Svensson, M. Miftaraj, D. K. McGuire, N. Sattar, A. Rosengren, S. Gudbjornsdottir, *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1407.
- [3] B. M. Kissela, J. Khoury, D. Kleindorfer, D. Woo, A. Schneider, K. Alwell, R. Miller, I. Ewing, C. J. Moomaw, J. P. Szaflarski, J. Gebel, R. Shukla, J. P. Broderick, *Diabetes Care* **2005**, *28*, 355.
- [4] M. Arnold, S. Mattle, A. Galimans, L. Kappeler, U. Fischer, S. Jung, G. M. De Marchis, J. Gralla, M. L. Mono, C. Brekenfeld, N. Meier, K. Nedeltchev, G. Schroth, H. P. Mattle, *Int J Stroke* **2014**, *9*, 985.
- [5] J. P. Desilles, V. Syvannarath, V. Ollivier, C. Journe, S. Delbosc, C. Ducroux, W. Boisseau, L. Louedec, L. Di Meglio, S. Loyau, M. Jandrot-Perrus, L. Potier, J. B. Michel, M. Mazighi, B. Ho-Tin-Noe, *Stroke* **2017**, *48*, 1932.
- [6] S. Prasad, R. K. Sajja, P. Naik, L. Cucullo, *J. Pharmacovigil.* **2014**, *2*, 125.
- [7] B. Obermeier, R. Daneman, R. M. Ransohoff, *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1584.
- [8] M. Brownlee, *Nature* **2001**, *414*, 813.
- [9] C. Carvalho, P. I. Moreira, *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 806.
- [10] T. Nishikawa, D. Edelstein, X. L. Du, S. Yamagishi, T. Matsumura, Y. Kaneda, M. A. Yorek, D. Beebe, P. J. Oates, H. P. Hammes, I. Giardino, M. Brownlee, *Nature* **2000**, *404*, 787.
- [11] T. Kahles, P. Luedike, M. Endres, H. J. Galla, H. Steinmetz, R. Busse, T. Neumann-Haefelin, R. P. Brandes, *Stroke* **2007**, *38*, 3000.
- [12] C. Kleinschnitz, H. Grund, K. Winger, M. E. Armitage, E. Jones, M. Mittal, D. Barit, T. Schwarz, C. Geis, P. Kraft, K. Barthel, M. K. Schuhmann, A. M. Herrmann, S. G. Meuth, G. Stoll, S. Meurer, A. Schrewe, L. Becker, V. Gailus-Durner, H. Fuchs, T. Klopstock, M. H. de Angelis,

- K. Jandeleit-Dahm, A. M. Shah, N. Weissmann, H. H. Schmidt, *PLoS Biol.* **2010**, *8*, e1000479.
- [13] P. B. Pun, J. Lu, S. Mochhala, *Free Radical Res.* **2009**, *43*, 348.
- [14] A. Scalbert, G. Williamson, *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073S.
- [15] Z. Ungvari, Z. Bagi, A. Feher, F. A. Recchia, W. E. Sonntag, K. Pearson, R. de Cabo, A. Csiszar, *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* **2010**, *299*, H18.
- [16] X. H. Zhang, H. Yokoo, H. Nishioka, H. Fujii, N. Matsuda, T. Hayashi, Y. Hattori, *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *159*, 928.
- [17] L. E. Monfoulet, S. Mercier, D. Bayle, R. Tamaian, N. Barber-Chamoux, C. Morand, D. Milenkovic, *Free Radical Biol. Med.* **2017**, *112*, 109.
- [18] M. H. Oak, C. Auger, E. Belcastro, S. H. Park, H. H. Lee, V. B. Schinik-Kerth, *Free Radical Biol. Med.* **2018**, *122*, 161.
- [19] M. Khan, C. Elango, M. A. Ansari, I. Singh, A. K. Singh, *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 365.
- [20] F. D. Pinheiro Fernandes, A. P. Fontenele Menezes, J. C. de Sousa Neves, A. A. Fonteles, A. T. da Silva, P. de Araujo Rodrigues, M. R. Santos do Carmo, C. M. de Souza, G. M. de Andrade, *Behav. Pharmacol.* **2014**, *25*, 637.
- [21] M. Marimoutou, F. Le Sage, J. Smadja, C. Lefebvre d'Hellencourt, M.-P. Gonthier, C. Robert-Da Silva, *J. Inflammation* **2015**, *12*, 10.
- [22] F. Le Sage, O. Meilhac, M.-P. Gonthier, *Pharmacol. Res.* **2017**, *119*, 303.
- [23] S. A. Menzies, J. T. Hoff, A. L. Betz, *Neurosurgery* **1992**, *31*, 100.
- [24] H. Wei, S. Wang, L. Zhen, Q. Yang, Z. Wu, X. Lei, J. Lv, L. Xiong, R. Xue, *J. Mol. Neurosci.* **2015**, *55*, 872.
- [25] J. W. Park, J. S. Hong, K. S. Lee, H. Y. Kim, J. J. Lee, S. R. Lee, *J. Nutr. Biochem.* **2010**, *21*, 1038.
- [26] A. A. Fonteles, C. M. de Souza, J. C. d. S. Neves, A. P. F. Menezes, M. R. Santos do Carmo, F. D. P. Fernandes, P. R. de Araújo, G. M. de Andrade, *Behav. Brain Res.* **2016**, *297*, 91.
- [27] M. Ashafaq, S. S. Raza, M. M. Khan, A. Ahmad, H. Javed, M. E. Ahmad, R. Tabassum, F. Islam, M. S. Siddiqui, M. M. Safhi, F. Islam, *Neurochem. Res.* **2012**, *37*, 1747.
- [28] D. Couret, S. Bourane, A. Catan, B. Nativel, C. Planesse, A. C. Dorse-mans, I. Ait-Arsa, M. Cournot, P. Rondeau, J. Patche, A. Tran-Dinh, G. Lambert, N. Diotel, O. Meilhac, *J. Comp. Neurol.* **2018**, *526*, 1006.
- [29] P. H. Chan, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2001**, *21*, 2.
- [30] K. Wingler, J. J. Hermans, P. Schiffrs, A. Moens, M. Paul, H. H. Schmidt, *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *164*, 866.
- [31] C. R. Williams, X. Lu, R. L. Sutliff, C. M. Hart, *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* **2012**, *303*, C213.
- [32] F. Chen, L. H. Qian, B. Deng, Z. M. Liu, Y. Zhao, Y. Y. Le, *CNS Neurosci. Ther.* **2013**, *19*, 675.
- [33] H. Tang, C.-S. Pan, X.-W. Mao, Y.-Y. Liu, L. Yan, C.-M. Zhou, J.-Y. Fan, S.-Y. Zhang, J.-Y. Han, *Microcirculation* **2014**, *21*, 615.
- [34] A. Ceriello, P. d. Russo, P. Amstad, P. Cerutti, *Diabetes* **1996**, *45*, 471.
- [35] P. Weidig, D. McMaster, U. Bayraktutan, *Diabetes, Obes. Metab.* **2004**, *6*, 432.
- [36] A. Arcambal, J. Taile, P. Rondeau, W. Viranaicken, O. Meilhac, M.-P. Gonthier, *Free Radical Biol. Med.* **2019**, *130*, 59.
- [37] Y. Zhou, Z. Jiang, H. Lu, Z. Xu, R. Tong, J. Shi, G. Jia, *Chem. Biodiversity* **2019**, *16*, e1900400.
- [38] F. Arredondo, C. Echeverry, J. A. Abin-Carriquiry, F. Blasina, K. Antúnez, D. P. Jones, Y.-M. Go, Y.-L. Liang, F. Dajas, *Free Radical Biol. Med.* **2010**, *49*, 738.
- [39] R. Sirota, D. Gibson, R. Kohen, *Redox Biol.* **2015**, *4*, 48.
- [40] H. Patel, J. Chen, K. C. Das, M. Kavdia, *Cardiovasc. Diabetol.* **2013**, *12*, 142.
- [41] A. Sharma, L. Rizky, N. Stefanovic, M. Tate, R. H. Ritchie, K. W. Ward, J. B. de Haan, *Cardiovasc. Diabetol.* **2017**, *16*, 33.
- [42] J. R. Priestley, K. E. Kautenburg, M. C. Casati, B. T. Endres, A. M. Geurts, J. H. Lombard, *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* **2016**, *310*, H478.
- [43] N. Tanaka, Y. Ikeda, Y. Ohta, K. Deguchi, F. Tian, J. Shang, T. Matsuura, K. Abe, *Brain Res.* **2011**, *1370*, 246.
- [44] Y. Hou, Y. Wang, Q. He, L. Li, H. Xie, Y. Zhao, J. Zhao, *Behav. Brain Res.* **2018**, *336*, 32.
- [45] M. N. Valcarcel-Ares, T. Gautam, J. P. Warrington, L. Bailey-Downs, D. Sosnowska, R. de Cabo, G. Losonczy, W. E. Sonntag, Z. Ungvari, A. Csiszar, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2012**, *67*, 821.
- [46] D. Fratantonio, A. Speciale, R. Canali, L. Natarelli, D. Ferrari, A. Saija, F. Virgili, F. Cimino, *BioFactors* **2017**, *43*, 54.
- [47] A. Ohashi, H. Yasuda, T. Kamiya, H. Hara, T. Adachi, *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2017**, *61*, 6.
- [48] P. Baret, A. Septembre-Malaterre, M. Rigoulet, C. Lefebvre d'Hellencourt, M. Priault, M.-P. Gonthier, A. Devin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 167.
- [49] C. Li, W.-J. Zhang, B. Frei, *Redox Biol.* **2016**, *9*, 104.
- [50] W.-Y. Huang, L. Fu, C.-Y. Li, L.-P. Xu, L.-X. Zhang, W.-M. Zhang, *J. Food Sci. Nutr.* **2017**, *82*, 1239.
- [51] X. L. Du, D. Edelman, S. Dimmeler, Q. Ju, C. Sui, M. Brownlee, *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 1341.
- [52] R. Jiang, J. M. Hodgson, E. Mas, K. D. Croft, N. C. Ward, *J. Clin. Nutr. Biochem.* **2016**, *27*, 53.
- [53] Y. Shen, K. D. Croft, J. M. Hodgson, R. Kyle, I. L. E. Lee, Y. Wang, R. Stocker, N. C. Ward, *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 1036.
- [54] S.-J. Tsai, C.-Y. Chao, M.-C. Yin, *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *670*, 441.
- [55] L. F. Eng, R. S. Ghirnikar, *Brain Pathol.* **1994**, *4*, 229.
- [56] S. F. D. Meyer, F. Denorme, F. Langhauser, E. Geuss, F. Fluri, C. Kleinschnitz, *Stroke* **2016**, *47*, 1165.
- [57] D. Vestweber, *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 223.
- [58] M. Wachtel, M. F. Bolliger, H. Ishihara, K. Frei, H. Bluethmann, S. M. Gloor, *J. Neurochem.* **2001**, *78*, 155.
- [59] S. Chuenkityanon, T. Pengsuparp, S. Jianmongkol, *Int. J. Toxicol.* **2010**, *29*, 418.
- [60] S. Wu, Y. Yue, J. Li, Z. Li, X. Li, Y. Niu, J. Xiang, H. Ding, *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 1930.
- [61] M.-P. Gonthier, M. A. Verna, C. Besson, C. Remesy, A. Scalbert, *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1853.
- [62] P.-O. Koh, *Neurosci. Lett.* **2015**, *588*, 18.
- [63] D. Sz wajgier, K. Borowiec, K. Pustelniak, *Nutrients* **2017**, *9*, 477.
- [64] J. Richmond, *ILARJ.* **2002**, *43*, S63.
- [65] R. Hata, G. Mies, C. Wiessner, K. Fritze, D. Hesselbarth, G. Brinker, K. A. Hossmann, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1998**, *18*, 367.
- [66] S. O. Jeong, Y. Son, J. H. Lee, Y. K. Cheong, S. H. Park, H. T. Chung, H.-O. Pae, *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 937.
- [67] R. A. Swanson, M. T. Morton, G. Tsao-Wu, R. A. Savalos, C. Davidson, F. R. Sharp, *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* **1990**, *10*, 290.
- [68] G. P. Morris, A. L. Wright, R. P. Tan, A. Gladbach, L. M. Ittner, B. Vissel, *PLoS One* **2016**, *11*, e0148503.
- [69] M.-P. Gonthier, L. Y. Rios, M.-A. Verna, C. Rémésy, A. Scalbert, *J. Chromatogr. B* **2003**, *789*, 247.

V.4. Résultat 4 : “Polyphenols improve cerebrovascular and metabolic disorders aggravated by high fat diet-induced obesity in a mouse stroke model via reduction of blood-brain barrier disruption, inflammation and oxidative stress.”

(**Taïlé J.**, Bringart M., Planesse C., Patché J., Rondeau P., Veeren B., Gauvin-Bialecki A., Meilhac O., Bourane S., Couret D., Gonthier M-P., *Pharmacological Research*, En préparation).

L'étude précédente a démontré les effets protecteurs des polyphénols extraits de la plante médicinale *A. borbonica* et de l'acide caféique chez un modèle de souris en situation d'ischémie cérébrale-reperfusion en condition d'hyperglycémie aiguë. Compte tenu des résultats intéressants de cette étude, il était pertinent d'évaluer dans une nouvelle étude, les effets de ces mêmes polyphénols chez un modèle de souris en hyperglycémie chronique liée à une insulino-résistance développée au cours d'une obésité, pour mimer les conditions physiopathologiques du diabète de type 2.

Cette quatrième étude avait donc pour but d'évaluer les effets protecteurs des polyphénols contre les complications cérébrovasculaires chez un modèle de souris en situation d'ischémie cérébrale-reperfusion en condition d'hyperglycémie chronique.

Pour ce faire, nous avons développé un modèle d'ischémie cérébrale-reperfusion chez des souris C57BL/6 en situation d'obésité et d'insulino-résistance conduisant à une hyperglycémie chronique. Les souris ont été nourries soit avec un régime standard « Normal Diet » (ND) soit avec un régime riche en graisses « High Fat Diet » (HFD), en présence ou non d'une supplémentation en polyphénols d'*A. borbonica* ou en acide caféique pendant 12 semaines. La dose de 35 mg/kg de polyphénols que nous avons testée était en accord avec celle utilisée dans des études bibliographiques visant un traitement chronique aux polyphénols sur plusieurs semaines. Ces polyphénols ont été administrés dilués dans de l'eau, et par gavage à une fréquence de 3 fois par semaine. Durant cette période expérimentale de 3 mois, des mesures de la consommation alimentaire et du poids des souris ont été réalisées de manière hebdomadaire, la glycémie à jeun mesurée tous les 15 jours, un test de tolérance au glucose (OGTT) effectué une fois par mois. A la fin des 3 mois, la procédure d'ischémie-reperfusion a

été réalisée par occlusion de l'artère cérébrale moyenne durant 90 min suivie d'une reperfusion de 20 h, comme décrit dans l'étude précédente. Les tissus prélevés étaient le cerveau, le cœur, le foie, le tissu adipeux viscéral épидидymal, le tissu adipeux sous-cutané et le sang. Globalement, nous avons évalué le volume de l'infarctus cérébral, le déficit neurologique, la transformation hémorragique, l'état métabolique (adiposité, glycémie, insulïnémie, triglycéridémie, cholestérolémie), les altérations redox (Nrf2, PPAR γ , catalase, GPx, SOD), l'état pro-inflammatoire systémique et tissulaire (IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α , GFAP, leptine, adiponectine), les altérations de la perméabilité de la BHE (ZO-1, hémoglobine, S100 β) ainsi que les taux plasmatiques des polyphénols. En parallèle, une étude *in vitro* a été réalisée sur des cellules endothéliales cérébrales murines bEnd3 en condition hyperglycémique (33 mM de glucose), et en présence ou non des polyphénols d'*A. borbonica*, de quercétine, d'acide caféique ou d'acide chlorogénique (10 μ M), dans le but d'évaluer les activités des MMP-2 et -9 sécrétées, et de les corrélér à des marqueurs du stress oxydatif (ROS) et de l'inflammation MCP-1.

Concernant l'étude *in vivo*, nos résultats ont montré l'induction d'un état d'obésité par le régime riche en graisses qui a entraîné un doublement du poids des souris passant de 25 g chez les souris ND à 50 g chez les souris HFD ; sans impact des polyphénols ni sur la prise de masse grasse ni sur la consommation alimentaire des souris. L'adiposité développée était associée à une accumulation de gras préférentiellement au niveau des tissus adipeux viscéraux et sous-cutanés, du foie et du cœur. Les souris rendues obèses présentaient une élévation de la glycémie à jeun, de l'insulïnémie, un index HOMA-IR plus important marquant une insulïnorésistance ainsi qu'une augmentation de la triglycéridémie, de la cholestérolémie, de la leptinémie et du taux plasmatique de CRP. L'administration des polyphénols d'*A. borbonica* ou de l'acide caféique a réduit plusieurs de ces désordres métaboliques et inflammatoires, excepté la leptinémie. De plus, les polyphénols ont augmenté le taux plasmatique d'adiponectine établie comme adipokine antioxydante, anti-inflammatoire et insulïnosenibilisante. Les polyphénols d'*A. borbonica* et l'acide caféique ont réduit le volume de l'infarctus cérébral, la transformation hémorragique et la perte d'intégrité de la BHE aggravés par l'état d'obésité et d'hyperglycémie chronique associée à l'insulïnorésistance. L'acide caféique a également protégé contre l'aggravation de la diminution du taux protéique de ZO-1 dans l'hémisphère cérébral ischémié. Les polyphénols d'*A. borbonica* et l'acide

caféique ont réduit les taux de marqueurs inflammatoires du cerveau et du tissu adipeux viscéral dont IL-1 β , IL-6, MCP-1 et TNF- α . Au niveau de l'hémisphère cérébral ischémié, les polyphénols ont modulé la GFAP, dont la détection par immunohistochimie était plus marquée sous l'effet de l'AVC combiné aux désordres métaboliques induits par l'état d'obésité et d'insulinorésistance, suggérant une régulation de la morphologie et/ou de la fonctionnalité des astrocytes. Au niveau du tissu adipeux viscéral, les polyphénols ont réduit le taux de leptine et augmenté le taux d'adiponectine, en faveur d'un statut anti-inflammatoire. Concernant les marqueurs redox évalués, les polyphénols ont corrigé l'altération des taux protéiques de Nrf2 et de PPAR γ plus élevés dans l'hémisphère cérébral ischémié des souris HFD, témoignant de leur capacité à épargner la sollicitation de ces deux facteurs de la défense antioxydante endogène. Parallèlement, les polyphénols ont augmenté le taux protéique de la GPx sans moduler ceux de la catalase qui étaient effondrés chez les souris HFD en ischémie-reperfusion combinée à l'état d'obésité et d'hyperglycémie chronique. Les polyphénols ont réduit la suractivation de la SOD induite chez les souris HFD en ischémie-reperfusion. Cette protection antioxydante des polyphénols à l'égard de l'épargne de la SOD a été également détectée dans le cœur, le foie et le tissu adipeux viscéral, témoignant de leur capacité à exercer des effets protecteurs au niveau cérébral et périphérique. De manière concordante, nous avons détecté la quercétine et l'acide caféique au niveau plasmatique, en lien avec leur apport parmi les polyphénols administrés par gavage. La détection d'un taux plasmatique plus élevé de l'acide hippurique, dérivant du métabolisme microbien des polyphénols, révèle l'existence d'un métabolisme effectif des polyphénols d'*A. borbonica* et de l'acide caféique ainsi que la capacité de leurs métabolites à atteindre la circulation sanguine *in vivo*. Concernant l'étude *in vitro*, nos résultats ont montré que l'hyperglycémie augmente l'activité enzymatique de la MMP-2 sécrétée par les cellules endothéliales cérébrales. Nous avons également relevé des corrélations positives entre les taux de MMP-2 et ceux de MCP-1, et entre les taux de MMP-2 et les niveaux de ROS. Ce résultat suggère que l'inflammation et le stress oxydatif causés par l'hyperglycémie sont associées à l'activation des MMP susceptibles d'aggraver la perte d'étanchéité de la BHE. De manière intéressante, les polyphénols d'*A. borbonica*, l'acide caféique et la quercétine ont exercé un effet protecteur en contrecarrant l'élévation de l'activité de la MMP-2 médiée par l'hyperglycémie.

En conclusion, cette étude a montré que les polyphénols d'*A. borbonica* et l'acide caféique protègent contre les désordres métaboliques et cérébrovasculaires aggravés par un état d'obésité et d'hyperglycémie chronique durant un AVC expérimental, en réduisant la perte d'intégrité de la BHE, l'inflammation et le stress oxydatif.

VII. Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont mis en évidence l'action délétère de l'hyperglycémie sur la fonctionnalité des cellules endothéliales cérébrales. Nos données ont plus précisément montré qu'une condition hyperglycémique provoque un stress oxydatif, une réponse pro-inflammatoire associée à un recrutement monocytaire, une altération de la production de marqueurs vasoactifs et une perte d'étanchéité des cellules endothéliales cérébrales.

Les extraits riches en polyphénols des plantes médicinales *A. borbonica*, *A. triplinervis*, *D. viscosa* et *T. bentzoe* de La Réunion ont réduit l'action délétère de l'hyperglycémie, en exerçant des effets antioxydants et anti-inflammatoires protégeant les marqueurs de fonctionnalité endothéliale altérés. Des effets protecteurs similaires ont été relevés pour la quercétine, l'acide caféique, l'acide chlorogénique et l'acide gallique utilisés comme polyphénols de référence dans nos travaux de par leur détection en tant que polyphénols majoritaires des plantes étudiées. Il est donc possible que ces polyphénols aient contribué à la bioactivité des extraits de plantes médicinales. Pour prendre en compte l'impact du métabolisme des polyphénols sur leur devenir et leurs propriétés biologiques dans l'organisme, nous avons évalué les effets de 6 métabolites circulants connus des polyphénols étudiés, incluant l'acide férulique, l'acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique, l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique, l'acide 3-hydroxyphénylacétique, l'acide 3-hydroxybenzoïque et l'acide hippurique. De manière innovante, nos résultats ont montré que ces composés exercent également un rôle protecteur contre l'altération de certains marqueurs redox, inflammatoires et vasoactifs médiée par l'hyperglycémie dans les cellules endothéliales cérébrales. L'exploration des effets des polyphénols extraits d'*A. borbonica* et de l'acide caféique dans des modèles de souris en hyperglycémie aiguë ou chronique a mis en évidence leur capacité à réduire le volume de l'infarctus cérébral, la transformation hémorragique, la perte d'intégrité de la BHE, la neuroinflammation et le stress oxydatif causés par l'AVC expérimental. De manière originale, nous avons montré que les polyphénols sont captés par les cellules endothéliales cérébrales ou liés à leurs membranes plasmiques, et qu'ils sont détectés aux niveau cérébral et plasmatique. Il est important de noter que les cibles moléculaires

des polyphénols identifiées dans les cellules endothéliales cérébrales en condition *in vitro*, corrèlent globalement avec celles détectées dans le cerveau des souris et qui sont relatives à la régulation de la perméabilité de la BHE et de la neuroinflammation. De plus, les polyphénols administrés chez les souris ont protégé des tissus périphériques clés dont le cœur, le foie et le tissu adipeux viscéral, contre le stress oxydatif induit par l'AVC expérimental et exacerbé par l'état d'obésité et d'hyperglycémie chronique liée à l'insulinorésistance. Ce constat souligne l'intérêt du développement de stratégies nutritionnelles ou pharmacologiques innovantes utilisant des polyphénols, pour réduire les complications métaboliques et vasculaires associées au diabète de type 2.

Si nous dressons un bilan des principales cibles modulées par les polyphénols en condition hyperglycémique dans nos modèles d'étude *in vitro* et *in vivo*, nous pouvons retenir différentes classes de marqueurs biologiques avec :

- des biomarqueurs du statut redox incluant les ROS, NOX4, Cu/ZnSOD, MnSOD, catalase, GPx et HO-1 ;
- des biomarqueurs de l'état inflammatoire comprenant IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1, E-sélectine ainsi que les protéines iNOS, COX-2, CRP, leptine, adiponectine, MPO et GFAP ;
- des biomarqueurs vasoactifs dont NO, eNOS et ET-1 ;
- des biomarqueurs de la perméabilité de la BHE comme les protéines de jonctions serrées occludine, claudine-5, ZO1 et ZO-2, la VE-cadhérine, la MMP-2 et la S100 β .
- des biomarqueurs de voies de signalisation cellulaire impliquées dans le « crosstalk » entre stress oxydatif et inflammation comme NF κ B, Nrf2, AMPK et PPAR γ ;
- des biomarqueurs de dommages cérébrovasculaires incluant le volume de l'infarctus cérébral, le déficit neurologique et la transformation hémorragique.

Ainsi, nous pouvons conclure que l'objectif du travail de thèse a été atteint. Les principales perspectives que nous pourrions envisager à plus ou moins long terme sont :

➤ A l'échelle *in vitro* :

- Renforcer l'exploration des aspects mécanistiques relatifs aux effets des polyphénols sur les cellules endothéliales cérébrales, comme leur impact sur le métabolisme

mitochondrial, leur mode de captation, la nature des récepteurs membranaires potentiellement impliqués et les voies de signalisation associées.

- Evaluer les effets de l'hyperglycémie et des polyphénols sur d'autres types cellulaires constitutifs de l'unité neurovasculaire comme les astrocytes et les péricytes qui jouent aussi un rôle clé dans l'homéostasie de la BHE ; et sur les cellules neuronales.
- Viser à une purification des polyphénols des plantes médicinales les plus efficaces par des étapes de fractionnement et de bioguidage afin de préciser leur effet cellulaire *in vitro* et leur impact *in vivo*, et en vue d'une description de leur bioactivité et sécurité pour une valorisation clinique à plus long terme comme « molécules-médicaments ».

➤ A l'échelle *in vivo* :

- Mettre en place des études sur modèles animaux diabétiques pour évaluer les effets protecteurs des plantes *A. triplinervis*, *D. viscosa* et *T. bentzoe* contre l'apparition du diabète de type 2 et les dommages cérébrovasculaires aggravés par l'hyperglycémie, comme réalisé pour la plante *A. borbonica*.
- Evaluer la capacité des polyphénols des plantes médicinales à réduire les conséquences d'un AVC en termes de réparation cérébrale et de récupération de la fonction d'organes périphériques comme le cœur.
- Evaluer la biodisponibilité et la biodistribution tissulaire des polyphénols, en incluant notamment l'exploration de leur métabolisme par la microflore intestinale.
- Rechercher un rôle prébiotique des polyphénols pour améliorer la dysbiose du microbiote intestinal qui est de plus en plus mise en cause dans le développement du diabète de type 2 et des complications vasculaires.

L'ensemble de ces investigations aideraient à mieux maîtriser l'impact possible des polyphénols dans le cadre d'une étude clinique, qui pourrait être envisagée, uniquement si la sécurité de la molécule ou de l'extrait végétal, a été vérifiée en amont. A plus long terme, ces investigations pourraient contribuer à faire progresser les connaissances en recherche biomédicale sur deux aspects : (i) un aspect fondamental relatif à la meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques reliant le diabète de type 2 et la santé vasculaire ; (ii) un aspect appliqué relatif au développement de stratégies thérapeutiques innovantes basées sur l'utilisation des polyphénols. Cet aspect de recherche appliquée devra s'intégrer dans une démarche de la valorisation raisonnée et éco-responsable de la biodiversité végétale de La Réunion

pour éviter l'épuisement des ressources naturelles et en faveur d'un développement économique de filières agricoles locales.

Références bibliographiques

- Abbott, N. J., A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R. Yusof and D. J. Begley (2010). "Structure and function of the blood-brain barrier." Neurobiol Dis **37**(1): 13-25.
- Abbott, N. J. and I. A. Romero (1996). "Transporting therapeutics across the blood-brain barrier." Mol Med Today **2**(3): 106-113.
- Abbott, N. J., L. Rönnbäck and E. Hansson (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." Nat Rev Neurosci **7**(1): 41-53.
- Ahmad, M. A., A. K. Najmi, M. Mujeeb and M. Akhtar (2016). "Protective Effect of Guggulipid in High Fat Diet and Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) Induced Ischemic Cerebral Injury in Rats." Drug Res (Stuttg) **66**(8): 407-414.
- Ahmed, S. M., L. Luo, A. Namani, X. J. Wang and X. Tang (2017). "Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation." Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis **1863**(2): 585-597.
- Aikens, J. and T. A. Dix (1993). "Hydrodioxyl (perhydroxyl), peroxy, and hydroxyl radical-initiated lipid peroxidation of large unilamellar vesicles (liposomes): comparative and mechanistic studies." Arch Biochem Biophys **305**(2): 516-525.
- Ajami, B., J. L. Bennett, C. Krieger, W. Tetzlaff and F. M. Rossi (2007). "Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life." Nat Neurosci **10**(12): 1538-1543.
- Alemany, M. (2011). "Utilization of dietary glucose in the metabolic syndrome." Nutr Metab (Lond) **8**(1): 74.
- Ali, M. K., K. M. V. Narayan and N. Tandon (2010). "Diabetes & coronary heart disease: current perspectives." The Indian journal of medical research **132**(5): 584-597.
- Aljada, A., R. Saadeh, E. Assian, H. Ghanim and P. Dandona (2000). "Insulin inhibits the expression of intercellular adhesion molecule-1 by human aortic endothelial cells through stimulation of nitric oxide." J Clin Endocrinol Metab **85**(7): 2572-2575.
- Aljofan, M. and H. Ding (2010). "High glucose increases expression of cyclooxygenase-2, increases oxidative stress and decreases the generation of nitric oxide in mouse microvessel endothelial cells." J Cell Physiol **222**(3): 669-675.
- Alsaffar, H., N. Martino, J. P. Garrett and A. P. Adam (2018). "Interleukin-6 promotes a sustained loss of endothelial barrier function via Janus kinase-mediated STAT3 phosphorylation and de novo protein synthesis." American Journal of Physiology-Cell Physiology **314**(5): C589-C602.
- Alvarez, J. I., A. Dodelet-Devillers, H. Kebir, I. Ifergan, P. J. Fabre, S. Terouz, M. Sabbagh, K. Wosik, L. Bourbonnière, M. Bernard, J. van Horssen, H. E. de Vries, F. Charron and A. Prat (2011). "The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence." Science **334**(6063): 1727-1731.

Alves-Santos, A. M., C. S. A. Sugizaki, G. C. Lima and M. M. V. Naves (2020). "Prebiotic effect of dietary polyphenols: A systematic review." Journal of Functional Foods **74**: 104169.

American_Diabetes (2018). "Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. Diabetes Care." **41** **S13-S27**.

American_Stroke_Association. (2020). from <https://www.stroke.org/>.

Andjelkovic, A. V., S. M. Stamatovic, C. M. Phillips, G. Martinez-Revollar and R. F. Keep (2020). "Modeling blood–brain barrier pathology in cerebrovascular disease in vitro: current and future paradigms." Fluids and Barriers of the CNS **17**(1): 44.

Anik, A., G. Çatlı, A. Abacı and E. Böber (2015). "Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update." J Pediatr Endocrinol Metab **28**(3-4): 251-263.

APLAMEDOM "Association pour les Plantes Aromatiques et Médicinales de La Réunion."

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

Arcambal, A., J. Tailé, P. Rondeau, W. Viranaïcken, O. Meilhac and M. P. Gonthier (2019). "Hyperglycemia modulates redox, inflammatory and vasoactive markers through specific signaling pathways in cerebral endothelial cells: Insights on insulin protective action." Free Radic Biol Med **130**: 59-70.

Aronson, D. and E. R. Edelman (2014). "Coronary artery disease and diabetes mellitus." Cardiology clinics **32**(3): 439-455.

Aronson, D. and E. J. Rayfield (2002). "How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms." Cardiovasc Diabetol **1**: 1.

Arroja, M. M. C., E. Reid and C. McCabe (2016). "Therapeutic potential of the renin angiotensin system in ischaemic stroke." Experimental & Translational Stroke Medicine **8**(1): 8.

Ashafaq, M., S. S. Raza, M. M. Khan, A. Ahmad, H. Javed, M. E. Ahmad, R. Tabassum, F. Islam, M. S. Siddiqui, M. M. Safhi and F. Islam (2012). "Catechin hydrate ameliorates redox imbalance and limits inflammatory response in focal cerebral ischemia." Neurochem Res **37**(8): 1747-1760.

Ashton, A. W. and J. A. Ware (2004). "Thromboxane A2 receptor signaling inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell differentiation and migration." Circ Res **95**(4): 372-379.

Athar, M., J. H. Back, X. Tang, K. H. Kim, L. Kopelovich, D. R. Bickers and A. L. Kim (2007). "Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention." Toxicology and applied pharmacology **224**(3): 274-283.

Austin, S. and J. St-Pierre (2012). "PGC1 α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders." J Cell Sci **125**(Pt 21): 4963-4971.

Avruch, J. (1998). "Insulin signal transduction through protein kinase cascades." Mol Cell Biochem **182**(1-2): 31-48.

- Baba, S., T. Furuta, M. Horie and H. Nakagawa (1981). "Studies on drug metabolism by use of isotopes XXVI: Determination of urinary metabolites of rutin in humans." J Pharm Sci **70**(7): 780-782.
- Babizhayev, M. A., I. A. Stokov, V. V. Nosikov, E. L. Savel'yeva, V. F. Sitnikov, Y. E. Yegorov and V. Z. Lankin (2015). "The Role of Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: Generation of Free Radical Species in the Glycation Reaction and Gene Polymorphisms Encoding Antioxidant Enzymes to Genetic Susceptibility to Diabetic Neuropathy in Population of Type I Diabetic Patients." Cell Biochem Biophys **71**(3): 1425-1443.
- Bagul, P. K., N. Deepthi, R. Sultana and S. K. Banerjee (2015). "Resveratrol ameliorates cardiac oxidative stress in diabetes through deacetylation of NFkB-p65 and histone 3." J Nutr Biochem **26**(11): 1298-1307.
- Ballabh, P., A. Braun and M. Nedergaard (2004). "The blood–brain barrier: an overview: Structure, regulation, and clinical implications." Neurobiology of Disease **16**(1): 1-13.
- Baret, P., A. Septembre-Malaterre, M. Rigoulet, C. Lefebvre d'Hellencourt, M. Priault, M. P. Gonthier and A. Devin (2013). "Dietary polyphenols preconditioning protects 3T3-L1 preadipocytes from mitochondrial alterations induced by oxidative stress." Int J Biochem Cell Biol **45**(1): 167-174.
- Barrett-Connor, E. and K. T. Khaw (1988). "Diabetes mellitus: an independent risk factor for stroke?" Am J Epidemiol **128**(1): 116-123.
- Barton, M., C. C. Haudenschild, L. V. d'Uscio, S. Shaw, K. Münter and T. F. Lüscher (1998). "Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14367-14372.
- Bauer, A. T., H. F. Bürgers, T. Rabie and H. H. Marti (2010). "Matrix metalloproteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement." Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism **30**(4): 837-848.
- Baudeux, J. L., J. Peynet, D. Bonnefont-Rousselot, P. Therond, J. Delattre and A. Legrand (2006). "[Cellular sources of reactive oxygen and nitrogen species. Roles in signal transcription pathways]." Ann Pharm Fr **64**(6): 373-381.
- Becker, F. (1985). "Exploration of arterial function with noninvasive technics. Results in chronic arterial occlusive disease of the lower limbs according to Leriche and Fontaine classification." Int Angiol **4**(3): 311-322.
- Behrendt, D. and P. Ganz (2002). "Endothelial function. From vascular biology to clinical applications." Am J Cardiol **90**(10c): 40I-48I.
- Bellien, J., M. Iacob, C. Monteil, I. Rémy-Jouet, C. Roche, T. DufLOT, C. Vendeville, L. Gutierrez, C. Thuillez, V. Richard and R. Joannidès (2017). "Physiological role of endothelin-1 in flow-mediated vasodilatation in humans and impact of cardiovascular risk factors." J Hypertens **35**(6): 1204-1212.
- Beltowski, J. (2006). "Leptin and atherosclerosis." Atherosclerosis **189**(1): 47-60.
- Benarroch, E. E. (2012). "Blood–brain barrier." Recent developments and clinical correlations **78**(16): 1268-1276.

- Benedetti E, C. L., Antonosante A, D'Angelo M, D'Angelo B, Selli S, Castelli V, Ippoliti R, Giordano A, Cimini A (2018). "PPARs in Neurodegenerative and Neuroinflammatory Pathways." Current Alzheimer Research **15**(4): 336-344.
- Berger, J. and D. E. Moller (2002). "The mechanisms of action of PPARs." Annu Rev Med **53**: 409-435.
- Bhandary, B., A. Marahatta, H.-R. Kim and H.-J. Chae (2012). "An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases." International journal of molecular sciences **14**: 434-456.
- Birk, P., D. Jürgen, K. Stephan, H. Jörg and G. Heike (2010). "Regulation of BCRP (ABCG2) and P-Glycoprotein (ABCB1) by Cytokines in a Model of the Human Blood–Brain Barrier." Cellular & Molecular Neurobiology **30**(1): 63-70.
- Biswas, S., A. S. Chida and I. Rahman (2006). "Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling." Biochem Pharmacol **71**(5): 551-564.
- Blanchard, V., M. Croyal, I. Khantalin, S. Ramin-Mangata, K. Chemello, B. Nativel, D. J. Blom, A. D. Marais and G. Lambert (2019). "Reduced Lipoprotein(a) Associated With the Apolipoprotein E2 Genotype Confers Cardiovascular Protection in Familial Hypercholesterolemia." JACC. Basic to translational science **4**(3): 425-427.
- Blankenberg, S., S. Barbaux and L. Tiret (2003). "Adhesion molecules and atherosclerosis." Atherosclerosis **170**(2): 191-203.
- Bojić, M., Ž. Maleš, A. Antolić, I. Babić and M. Tomičić (2019). "Antithrombotic activity of flavonoids and polyphenols rich plant species." Acta Pharm **69**(4): 483-495.
- Bondonno, N. P., C. P. Bondonno, L. C. Blekkenhorst, M. J. Considine, G. Maghzal, R. Stocker, R. J. Woodman, N. C. Ward, J. M. Hodgson and K. D. Croft (2018). "Flavonoid-Rich Apple Improves Endothelial Function in Individuals at Risk for Cardiovascular Disease: A Randomized Controlled Clinical Trial." Mol Nutr Food Res **62**(3).
- Boquist, L., B. Hellman, A. Lernmark and I. B. Täljedal (1974). "Influence of the mutation "diabetes" on insulin release and islet morphology in mice of different genetic backgrounds." J Cell Biol **62**(1): 77-89.
- Bouloumié, A., J. Bauersachs, W. Linz, B. A. Schölkens, G. Wiemer, I. Fleming and R. Busse (1997). "Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production." Hypertension **30**(4): 934-941.
- Bravard, A., C. Bonnard, A. Durand, M. A. Chauvin, R. Favier, H. Vidal and J. Rieusset (2011). "Inhibition of xanthine oxidase reduces hyperglycemia-induced oxidative stress and improves mitochondrial alterations in skeletal muscle of diabetic mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **300**(3): E581-591.
- Brazil, R. (2017). The Pharmaceutical Journal.
- Busiello, R. A., S. Savarese and A. Lombardi (2015). "Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism." Frontiers in Physiology **6**(36).
- Cadet, J., T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J.-P. Pouget, J.-L. Ravanat and S. Sauvaigo (1999). "Hydroxyl radicals and DNA base damage." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **424**(1): 9-21.

- Cai, H. and D. G. Harrison (2000). "Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress." Circulation Research **87**(10): 840-844.
- Cardillo, C., C. M. Kilcoyne, R. O. Cannon, 3rd, A. A. Quyyumi and J. A. Panza (1997). "Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients." Hypertension **30**(1 Pt 1): 57-63.
- Cardona, F., C. Andrés-Lacueva, S. Tulipani, F. J. Tinahones and M. I. Queipo-Ortuño (2013). "Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health." J Nutr Biochem **24**(8): 1415-1422.
- Carvalho, C. and P. I. Moreira (2018). "Oxidative Stress: A Major Player in Cerebrovascular Alterations Associated to Neurodegenerative Events." Front Physiol **9**: 806.
- Cassidy, A., B. Hanley and R. M. Lamuela-Raventós (2000). "Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventós RM. Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. J Sci Food Agr 80, 1044-1062." Journal of the Science of Food and Agriculture **80**: 1044-1062.
- Ceriello, A., P. dello Russo, P. Amstad and P. Cerutti (1996). "High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress." Diabetes **45**(4): 471-477.
- Cerutti, C. and A. J. Ridley (2017). "Endothelial cell-cell adhesion and signaling." Exp Cell Res **358**(1): 31-38.
- Chakraborty, C., S. Roy, M. Hsu and G. Agoramoorthy (2011). "Landscape Mapping of Functional Proteins in Insulin Signal Transduction and Insulin Resistance: A Network-Based Protein-Protein Interaction Analysis." PloS one **6**: e16388.
- Chan, P. H. (2001). "Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain." J Cereb Blood Flow Metab **21**(1): 2-14.
- Chang, H. Y., S. Singh, O. Mansour, S. Baksh and G. C. Alexander (2018). "Association Between Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors and Lower Extremity Amputation Among Patients With Type 2 Diabetes." JAMA Intern Med **178**(9): 1190-1198.
- Chen, D., V. Milacic, M. S. Chen, S. B. Wan, W. H. Lam, C. Huo, K. R. Landis-Piwowar, Q. C. Cui, A. Wali, T. H. Chan and Q. P. Dou (2008). "Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets." Histology and histopathology **23**(4): 487-496.
- Chen, F., L. H. Qian, B. Deng, Z. M. Liu, Y. Zhao and Y. Y. Le (2013). "Resveratrol protects vascular endothelial cells from high glucose-induced apoptosis through inhibition of NADPH oxidase activation-driven oxidative stress." CNS Neurosci Ther **19**(9): 675-681.
- Chen, G. and D. V. Goeddel (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." Science **296**(5573): 1634-1635.
- Chen, Y. C., J. S. Wu, H. D. Tsai, C. Y. Huang, J. J. Chen, G. Y. Sun and T. N. Lin (2012). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) and neurodegenerative disorders." Mol Neurobiol **46**(1): 114-124.
- Cheng, F., W. Jiang, X. Xiong, J. Chen, Y. Xiong and Y. Li (2020). "Ethanol Extract of Chinese Hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) Fruit Reduces Inflammation and Oxidative Stress in Rats with Doxorubicin-Induced Chronic Heart Failure." Med Sci Monit **26**: e926654.

- Cheng, G., Z. Cao, X. Xu, E. G. van Meir and J. D. Lambeth (2001). "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5." Gene **269**(1-2): 131-140.
- Cheng, Y., S. C. Austin, B. Rocca, B. H. Koller, T. M. Coffman, T. Grosser, J. A. Lawson and G. A. FitzGerald (2002). "Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2." Science **296**(5567): 539-541.
- Cheung, N., P. Mitchell and T. Y. Wong (2010). "Diabetic retinopathy." Lancet **376**(9735): 124-136.
- Chi, Z. and A. J. Melendez (2007). "Role of cell adhesion molecules and immune-cell migration in the initiation, onset and development of atherosclerosis." Cell adhesion & migration **1**(4): 171-175.
- Chien, M. Y., C. H. Chuang, C. M. Chern, K. T. Liou, D. Z. Liu, Y. C. Hou and Y. C. Shen (2016). "Salvianolic acid A alleviates ischemic brain injury through the inhibition of inflammation and apoptosis and the promotion of neurogenesis in mice." Free Radic Biol Med **99**: 508-519.
- Cho, J. Y., I. S. Kim, Y. H. Jang, A. R. Kim and S. R. Lee (2006). "Protective effect of quercetin, a natural flavonoid against neuronal damage after transient global cerebral ischemia." Neurosci Lett **404**(3): 330-335.
- Clifford, M. N. (1999). "Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden." Journal of the Science of Food and Agriculture **79**(3): 362-372.
- Coban, D., D. Milenkovic, A. Chanet, J. Khallou-Laschet, L. Sabbe, A. Palagani, W. Vanden Berghe, A. Mazur and C. Morand (2012). "Dietary curcumin inhibits atherosclerosis by affecting the expression of genes involved in leukocyte adhesion and transendothelial migration." Mol Nutr Food Res **56**(8): 1270-1281.
- Cohen-Salmon, M., L. Slaoui, N. Mazaré, A. Gilbert, M. Oudart, R. Alvear Perez, X. Elorza-Vidal, O. Chever and A.-C. Boulay (2020). "Astrocytes in the regulation of cerebrovascular functions." Glia.
- Cole, S. P., G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. Duncan and R. G. Deeley (1992). "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line." Science **258**(5088): 1650-1654.
- Cordon-Cardo, C., J. P. O'Brien, D. Casals, L. Rittman-Grauer, J. L. Biedler, M. R. Melamed and J. R. Bertino (1989). "Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(2): 695-698.
- Couret, D., S. Bourane, A. Catan, B. Nativel, C. Planesse, A. C. Dorsemans, I. Ait-Arsa, M. Cournot, P. Rondeau, J. Patche, A. Tran-Dinh, G. Lambert, N. Diotel and O. Meilhac (2018). "A hemorrhagic transformation model of mechanical stroke therapy with acute hyperglycemia in mice." J Comp Neurol **526**(6): 1006-1016.
- Cournot, M., E. Burillo, P.-J. Saulnier, C. Planesse, E. Gand, M. Rehman, S. Ragot, P. Rondeau, A. Catan, M.-P. Gonthier, E. Feigerlova, O. Meilhac and S. Hadjadj (2018). "Circulating Concentrations of Redox Biomarkers Do Not Improve the Prediction of Adverse Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus." Journal of the American Heart Association **7**(5): e007397.
- Coyne, D. W., M. Nickols, W. Bertrand and A. R. Morrison (1992). "Regulation of mesangial cell cyclooxygenase synthesis by cytokines and glucocorticoids." Am J Physiol **263**(1 Pt 2): F97-102.

- Cremonini, E., C. G. Fraga and P. I. Oteiza (2019). "(-)-Epicatechin in the control of glucose homeostasis: Involvement of redox-regulated mechanisms." Free Radic Biol Med **130**: 478-488.
- Croft, K. D. (2016). "Dietary polyphenols: Antioxidants or not?" Arch Biochem Biophys **595**: 120-124.
- D'Archivio, M., C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini and R. Masella (2007). "Polyphenols, dietary sources and bioavailability." Ann Ist Super Sanita **43**(4): 348-361.
- Dandona, P., A. Aljada and A. Bandyopadhyay (2004). "Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes." Trends Immunol **25**(1): 4-7.
- Daneman, R. and A. Prat (2015). "The blood-brain barrier." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(1): a020412.
- Daneman, R., L. Zhou, A. A. Kebede and B. A. Barres (2010). "Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis." Nature **468**(7323): 562-566.
- Danielsen, E. T. and E. M. Danielsen (2017). "Glycol chitosan: A stabilizer of lipid rafts in the intestinal brush border." Biochim Biophys Acta Biomembr **1859**(3): 360-367.
- de Oliveira, M. R., S. M. Nabavi, N. Braidly, W. N. Setzer, T. Ahmed and S. F. Nabavi (2015). "Quercetin and the mitochondria: A mechanistic view." Biotechnol Adv **34**(5): 532-549.
- Delbosc, S., M. Glorian, A. S. Le Port, G. Béréziat, M. Andréani and I. Limon (2008). "The benefit of docosahexanoic acid on the migration of vascular smooth muscle cells is partially dependent on Notch regulation of MMP-2/-9." Am J Pathol **172**(5): 1430-1440.
- Delveaux, J., C. Turpin, B. Veeren, N. Diotel, S. B. Bravo, F. Begue, E. Álvarez, O. Meilhac, E. Bourdon and P. Rondeau (2020). "Antirhea borbonica Aqueous Extract Protects Albumin and Erythrocytes from Glycoxidative Damages." Antioxidants (Basel) **9**(5).
- Desilles, J. P., V. Syvannarath, V. Ollivier, C. Journé, S. Delbosc, C. Ducroux, W. Boisseau, L. Louedec, L. Di Meglio, S. Loyau, M. Jandrot-Perrus, L. Potier, J. B. Michel, M. Mazighi and B. Ho-Tin-Noé (2017). "Exacerbation of Thromboinflammation by Hyperglycemia Precipitates Cerebral Infarct Growth and Hemorrhagic Transformation." Stroke **48**(7): 1932-1940.
- Dimmeler, S., I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse and A. M. Zeiher (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." Nature **399**(6736): 601-605.
- Domínguez Avila, J. A., J. Rodrigo García, G. A. González Aguilar and L. A. de la Rosa (2017). "The Antidiabetic Mechanisms of Polyphenols Related to Increased Glucagon-Like Peptide-1 (GLP1) and Insulin Signaling." Molecules **22**(6).
- Doyle, L. A., W. Yang, L. V. Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao, A. K. Rishi and D. D. Ross (1998). "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15665-15670.
- Du, X., T. Matsumura, D. Edelstein, L. Rossetti, Z. Zsengellér, C. Szabó and M. Brownlee (2003). "Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells." J Clin Invest **112**(7): 1049-1057.

- Egan, K. and G. A. FitzGerald (2006). "Eicosanoids and the vascular endothelium." Handb Exp Pharmacol(176 Pt 1): 189-211.
- Egan, K. M., J. A. Lawson, S. Fries, B. Koller, D. J. Rader, E. M. Smyth and G. A. Fitzgerald (2004). "COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice." Science **306**(5703): 1954-1957.
- Ehrlich, P. (1885). "Das sauerstoff-bedarfnis des organismus." Eine farbenanalytische studie.
- Eisenblätter, T., S. Hüwel and H. J. Galla (2003). "Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier." Brain Res **971**(2): 221-231.
- Elias, C. F., C. Aschkenasi, C. Lee, J. Kelly, R. S. Ahima, C. Bjorbaek, J. S. Flier, C. B. Saper and J. K. Elmquist (1999). "Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area." Neuron **23**(4): 775-786.
- Eng, L. and R. Ghirnikar (1994). "GFAP and astrogliosis [Review]." Brain pathology (Zurich, Switzerland) **4**: 229-237.
- Falcetti, E., D. M. Flavell, B. Staels, A. Tinker, S. G. Haworth and L. Clapp (2007). "IP receptor-dependent activation of PPAR gamma by stable prostacyclin analogues." BIOCHEM BIOPH RES CO **360**.
- Favier, F., I. Jausset, N. L. Moullec, X. Debussche, M. C. Boyer, J. C. Schwager and L. Papoz (2005). "Prevalence of Type 2 diabetes and central adiposity in La Reunion Island, the REDIA Study." Diabetes Res Clin Pract **67**(3): 234-242.
- Feldman, E. L., B. C. Callaghan, R. Pop-Busui, D. W. Zochodne, D. E. Wright, D. L. Bennett, V. Bril, J. W. Russell and V. Viswanathan (2019). "Diabetic neuropathy." Nat Rev Dis Primers **5**(1): 41.
- Fenstermacher, J., P. Gross, N. Sposito, V. Acuff, S. Pettersen and K. Gruber (1988). "Structural and functional variations in capillary systems within the brain." Ann N Y Acad Sci **529**: 21-30.
- Fernando, V., X. Zheng, Y. Walia and V. Sharma (2019). "S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling." **8**(9).
- Ferrare, K., L. P. R. Bidel, A. Awwad, P. Poucheret, G. Cazals, F. Lazenec, J. Azay-Milhau, M. Tournier, A. D. Lajoix and D. Tusch (2018). "Increase in insulin sensitivity by the association of chicoric acid and chlorogenic acid contained in a natural chicoric acid extract (NCRAE) of chicory (Cichorium intybus L.) for an antidiabetic effect." J Ethnopharmacol **215**: 241-248.
- Figueira, I., G. Garcia, R. C. Pimpao, A. P. Terrasso, I. Costa, A. F. Almeida, L. Tavares, T. F. Pais, P. Pinto, M. R. Ventura, A. Filipe, G. J. McDougall, D. Stewart, K. S. Kim, I. Palmela, D. Brites, M. A. Brito, C. Brito and C. N. Santos (2017). "Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection." Sci Rep **7**(1): 11456.
- Fingleton, B. (2017). "Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1864**(11, Part A): 2036-2042.
- Fiorani, M., R. De Sanctis, P. Menghinello, L. Cucchiari, B. Cellini and M. Dachà (2001). "Quercetin prevents glutathione depletion induced by dehydroascorbic acid in rabbit red blood cells." Free Radic Res **34**(6): 639-648.
- Fondation_des_maladies_du_coeur_et_de_l'AVC_du_Canada (2020).

- Foretz, M., B. Guigas, L. Bertrand, M. Pollak and B. Viollet (2014). "Metformin: from mechanisms of action to therapies." Cell Metab **20**(6): 953-966.
- Forman, H. J., F. Ursini and M. Maiorino (2014). "An overview of mechanisms of redox signaling." J Mol Cell Cardiol **73**: 2-9.
- Fraga, C. G., P. I. Oteiza and M. Galleano (2018). "Plant bioactives and redox signaling: (-)-Epicatechin as a paradigm." Mol Aspects Med **61**: 31-40.
- Fratantonio, D. and A. Speciale (2017). "Low nanomolar caffeic acid attenuates high glucose-induced endothelial dysfunction in primary human umbilical-vein endothelial cells by affecting NF- κ B and Nrf2 pathways." **43**(1): 54-62.
- Friedman, J. M. and J. L. Halaas (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." Nature **395**(6704): 763-770.
- Friedman, S., F. Khoury-Collado, M. Dalloul, D. M. Sherer and O. Abulafia (2006). "Glucose challenge test threshold values in screening for gestational diabetes among black women." American Journal of Obstetrics & Gynecology **194**(5): e46-e48.
- Fujii, Y., N. Osaki, T. Hase and A. Shimotoyodome (2015). "Ingestion of coffee polyphenols increases postprandial release of the active glucagon-like peptide-1 (GLP-1(7-36)) amide in C57BL/6J mice." Journal of nutritional science **4**: e9-e9.
- Fujiwara, N. and K. Kobayashi (2005). "Macrophages in Inflammation." Current Drug Targets - Inflammation & Allergy **4**(3): 281-286.
- Fulton, D., J. P. Gratton, T. J. McCabe, J. Fontana, Y. Fujio, K. Walsh, T. F. Franke, A. Papapetropoulos and W. C. Sessa (1999). "Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt." Nature **399**(6736): 597-601.
- Furukawa, S., T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda and I. Shimomura (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." J Clin Invest **114**(12): 1752-1761.
- Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita and S. Tsukita (1993). "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." J Cell Biol **123**(6 Pt 2): 1777-1788.
- Gabriel, S. E., L. Jaakkimainen and C. Bombardier (1991). "Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A meta-analysis." Ann Intern Med **115**(10): 787-796.
- Galley, H. F. and N. R. Webster (2004). "Physiology of the endothelium." Br J Anaesth **93**(1): 105-113.
- Ganong, W. F. (2000). "Circumventricular Organs: Definition And Role In The Regulation Of Endocrine And Autonomic Function." Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **27**(5-6): 422-427.
- Gao, Y., R. Yokota, S. Tang, A. W. Ashton and J. A. Ware (2000). "Reversal of angiogenesis in vitro, induction of apoptosis, and inhibition of AKT phosphorylation in endothelial cells by thromboxane A(2)." Circ Res **87**(9): 739-745.

García-Lafuente, A., E. Guillamón, A. Villares, M. A. Rostagno and J. A. Martínez (2009). "Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease." Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.] **58**(9): 537-552.

Gehm, B. D., J. M. McAndrews, P. Y. Chien and J. L. Jameson (1997). "Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(25): 14138-14143.

Geleijnse, J. M., L. J. Launer, D. A. Van der Kuip, A. Hofman and J. C. Witteman (2002). "Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study." Am J Clin Nutr **75**(5): 880-886.

Gero, D. (2018). Hyperglycemia-Induced Endothelial Dysfunction.

Ghaddar, B., B. Veeren, P. Rondeau, M. Bringart, C. Lefebvre d'Hellencourt, O. Meilhac, J. L. Bascands and N. Diotel (2020). "Impaired brain homeostasis and neurogenesis in diet-induced overweight zebrafish: a preventive role from A. borbonica extract." Sci Rep **10**(1): 14496.

Ghisolfi-Marque, A., M.-J. Boyer, B. Vellas, J.-P. Thouvenot, J.-L. Albarède and J. Ghisolfi (1996). "Activité anti-oxydante, lipoperoxydation et vieillissement chez l'homme." Nutrition Clinique et Métabolisme **10**(3): 151-160.

Ghoshal, K. and M. Bhattacharyya (2015). "Adiponectin: Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity." World Journal of Diabetes **6**: 151-166.

Giacco, F. and M. Brownlee (2010). "Oxidative stress and diabetic complications." Circ Res **107**(9): 1058-1070.

Goldmann, E. E. (1913). Vitalfärbung am Zentralnervensystem: Beitrag zur Physio-Pathologie des Plexus chorioideus und der Hirnhäute, Königl. Akademie der Wissenschaften.

Gonthier, M. P., V. Cheynier, J. L. Donovan, C. Manach, C. Morand, I. Mila, C. Lapierre, C. Remesy and A. Scalbert (2003). "Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols." J Nutr **133**(2): 461-467.

Gonthier, M. P., J. L. Donovan, O. Texier, C. Felgines, C. Remesy and A. Scalbert (2003). "Metabolism of dietary procyanidins in rats." Free Radic Biol Med **35**(8): 837-844.

Gonthier, M. P., C. Remesy, A. Scalbert, V. Cheynier, J. M. Souquet, K. Poutanen and A. M. Aura (2006). "Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota in vitro." Biomed Pharmacother **60**(9): 536-540.

Gonthier, M. P., M. A. Verny, C. Besson, C. Remesy and A. Scalbert (2003). "Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats." J Nutr **133**(6): 1853-1859.

González-Sarrías, A., R. García-Villalba, M. Romo-Vaquero, C. Alasalvar, A. Örem, P. Zafrilla, F. A. Tomás-Barberán, M. V. Selma and J. C. Espín (2017). "Clustering according to urolithin metabotype explains the interindividual variability in the improvement of cardiovascular risk biomarkers in overweight-obese individuals consuming pomegranate: A randomized clinical trial." Mol Nutr Food Res **61**(5).

- Gray, S. P., E. D. Marco, J. Okabe, C. Szyndralewicz, F. Heitz, A. C. Montezano, J. B. d. Haan, C. Koulis, A. El-Osta, K. L. Andrews, J. P. F. Chin-Dusting, R. M. Touyz, K. Wingler, M. E. Cooper, H. H. H. W. Schmidt and K. A. Jandeleit-Dahm (2013). "NADPH Oxidase 1 Plays a Key Role in Diabetes Mellitus–Accelerated Atherosclerosis." Circulation **127**(18): 1888-1902.
- Griffith, T. M., A. T. Chaytor and D. H. Edwards (2004). "The obligatory link: role of gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization." Pharmacol Res **49**(6): 551-564.
- Gundimeda, U., T. H. McNeill, A. A. Elhiani, J. E. Schiffman, D. R. Hinton and R. Gopalakrishna (2012). "Green tea polyphenols precondition against cell death induced by oxygen-glucose deprivation via stimulation of laminin receptor, generation of reactive oxygen species, and activation of protein kinase C ϵ ." J Biol Chem **287**(41): 34694-34708.
- Guzik, T. J., S. Mussa, D. Gastaldi, J. Sadowski, C. Ratnatunga, R. Pillai and K. M. Channon (2002). "Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase." Circulation **105**(14): 1656-1662.
- Hacke, W., M. Kaste, E. Bluhmki, M. Brozman, A. Dávalos, D. Guidetti, V. Larrue, K. R. Lees, Z. Medeghri, T. Machnig, D. Schneider, R. von Kummer, N. Wahlgren and D. Toni (2008). "Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke." N Engl J Med **359**(13): 1317-1329.
- Hall, C. N., C. Reynell, B. Gesslein, N. B. Hamilton, A. Mishra, B. A. Sutherland, F. M. O'Farrell, A. M. Buchan, M. Lauritzen and D. Attwell (2014). "Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease." Nature **508**(7494): 55-60.
- Halliwell, B. (1989). "Tell me about free radicals, doctor: a review." J R Soc Med **82**(12): 747-752.
- Hamblin, M., L. Chang, Y. Fan, J. Zhang and Y. Chen (2009). "PPARs and the Cardiovascular System." Antioxidants & redox signaling **11**: 1415-1452.
- Handschin, C. and B. M. Spiegelman (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism." Endocr Rev **27**(7): 728-735.
- Hara, Y. (2011). "Tea catechins and their applications as supplements and pharmaceuticals." Pharmacol Res **64**(2): 100-104.
- Harris, D., P. E. Martin, W. H. Evans, D. A. Kendall, T. M. Griffith and M. D. Randall (2000). "Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor responses and mechanisms of K(+)-relaxation." Eur J Pharmacol **402**(1-2): 119-128.
- Harrison, D., K. K. Griendling, U. Landmesser, B. Hornig and H. Drexler (2003). "Role of oxidative stress in atherosclerosis." Am J Cardiol **91**(3a): 7a-11a.
- Harrison, E. M., S. J. McNally, L. Devey, O. J. Garden, J. A. Ross and S. J. Wigmore (2006). "Insulin induces heme oxygenase-1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in renal cells." Febs j **273**(11): 2345-2356.
- Hatia, S., A. Septembre-Malaterre, F. Le Sage, A. Badiou-Beneteau, P. Baret, B. Payet, C. Lefebvre d'hellencourt and M. P. Gonthier (2014). "Evaluation of antioxidant properties of major dietary polyphenols and their protective effect on 3T3-L1 preadipocytes and red blood cells exposed to oxidative stress." Free Radic Res **48**(4): 387-401.

- Hawkins, B. J., M. Madesh, C. J. Kirkpatrick and A. B. Fisher (2007). "Superoxide flux in endothelial cells via the chloride channel-3 mediates intracellular signaling." Mol Biol Cell **18**(6): 2002-2012.
- Hawkins, B. T. and T. P. Davis (2005). "The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease." Pharmacol Rev **57**(2): 173-185.
- Hawkins, B. T., R. D. Egleton and T. P. Davis (2005). "Modulation of cerebral microvascular permeability by endothelial nicotinic acetylcholine receptors." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(1): H212-219.
- Hazout, A., Y. Menezo, P. Madelenat, C. Yazbeck, J. Selva and P. Cohen-Bacrie (2008). "[Causes and clinical implications of sperm DNA damages]." Gynecol Obstet Fertil **36**(11): 1109-1117.
- Heinonen, S., T. Nurmi, K. Liukkonen, K. Poutanen, K. Wähälä, T. Deyama, S. Nishibe and H. Adlercreutz (2001). "In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol." J Agric Food Chem **49**(7): 3178-3186.
- Hemmrich, K., G. P. L. Thomas, K. M. Abberton, E. W. Thompson, J. A. Rophael, A. J. Penington and W. A. Morrison (2007). "Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Nitric Oxide Promote Adipogenesis in a Model That Mimics Obesity." Obesity **15**(12): 2951-2957.
- Hermes-DeSantis, E. and J. Aranda (2007). "Clinical Experience with Intravenous Ibuprofen Lysine in the Pharmacologic Closure of Patent Ductus Arteriosus." The journal of pediatric pharmacology and therapeutics : JPPT : the official journal of PPAG **12**: 171-182.
- Hertog, M. G., E. J. Feskens, P. C. Hollman, M. B. Katan and D. Kromhout (1993). "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study." Lancet **342**(8878): 1007-1011.
- Hinow, P., A. Radunskaya, S. M. Mackay, J. N. Reynolds, M. Schroeder, E. W. Tan and I. G. Tucker (2016). "Signaled drug delivery and transport across the blood-brain barrier." J Liposome Res **26**(3): 233-245.
- Hirosumi, J., G. Tuncman, L. Chang, C. Z. Görgün, K. T. Uysal, K. Maeda, M. Karin and G. S. Hotamisligil (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." Nature **420**(6913): 333-336.
- Hirst, J. J., F. J. Teixeira, T. Zakar and D. M. Olson (1995). "Prostaglandin endoperoxide-H synthase-1 and -2 messenger ribonucleic acid levels in human amnion with spontaneous labor onset." J Clin Endocrinol Metab **80**(2): 517-523.
- Ho-Tin-Noé, B. and J. B. Michel (2011). "Initiation of angiogenesis in atherosclerosis: smooth muscle cells as mediators of the angiogenic response to atheroma formation." Trends Cardiovasc Med **21**(7): 183-187.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill and B. M. Spiegelman (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.
- Huber, J. D., R. D. Egleton and T. P. Davis (2001). "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier." Trends Neurosci **24**(12): 719-725.
- Hudson, B. I. and M. E. Lippman (2018). "Targeting RAGE Signaling in Inflammatory Disease." Annual Review of Medicine **69**(1): 349-364.

Hulthe, J. and B. Fagerberg (2002). "Circulating Oxidized LDL Is Associated With Subclinical Atherosclerosis Development and Inflammatory Cytokines (AIR Study)." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **22**(7): 1162-1167.

Hultman, K., F. Blomstrand, M. Nilsson, U. Wilhelmsson, K. Malmgren, M. Pekny, T. Kousted, C. Jern and A. Tjärnlund-Wolf (2010). "Expression of plasminogen activator inhibitor-1 and protease nexin-1 in human astrocytes: Response to injury-related factors." J Neurosci Res **88**(11): 2441-2449.

Hunt, C. R., J. E. Sim, S. J. Sullivan, T. Featherstone, W. Golden, C. Von Kapp-Herr, R. A. Hock, R. A. Gomez, A. J. Parsian and D. R. Spitz (1998). "Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress." Cancer Res **58**(17): 3986-3992.

IDF (2016). "Diabetes and cardiovascular disease."

IDF (2017). "Diabetes Atlas of the International Diabetes Federation. 8th edition."

IDF (2019). "Diabetes Atlas of the International Diabetes Federation. 9th edition."

IDF (2020). "Diabetes and cardiovascular disease."

Iqbal, Z., S. Azmi, R. Yadav, M. Ferdousi, M. Kumar, D. J. Cuthbertson, J. Lim, R. A. Malik and U. Alam (2018). "Diabetic Peripheral Neuropathy: Epidemiology, Diagnosis, and Pharmacotherapy." Clin Ther **40**(6): 828-849.

Itoh, M., M. Furuse, K. Morita, K. Kubota, M. Saitou and S. Tsukita (1999). "Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins." J Cell Biol **147**(6): 1351-1363.

Itoh, Y., Y. Kawamata, M. Harada, M. Kobayashi, R. Fujii, S. Fukusumi, K. Ogi, M. Hosoya, Y. Tanaka, H. Uejima, H. Tanaka, M. Maruyama, R. Satoh, S. Okubo, H. Kizawa, H. Komatsu, F. Matsumura, Y. Noguchi, T. Shinohara, S. Hinuma, Y. Fujisawa and M. Fujino (2003). "Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40." Nature **422**(6928): 173-176.

Izumi, Y., T. Hirose, Y. Tamai, S. Hirai, Y. Nagashima, T. Fujimoto, Y. Tabuse, K. J. Kemphues and S. Ohno (1998). "An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3." J Cell Biol **143**(1): 95-106.

Jayaraj, R. L., S. Azimullah, R. Beiram, F. Y. Jalal and G. A. Rosenberg (2019). "Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke." Journal of neuroinflammation **16**(1): 142-142.

Jiang, X., H.-Y. Tan, S. Teng, Y.-T. Chan, D. Wang and N. Wang (2019). "The Role of AMP-Activated Protein Kinase as a Potential Target of Treatment of Hepatocellular Carcinoma." Cancers **11**: 647.

Jin, Z., J. Ke, P. Guo, Y. Wang and H. Wu (2019). "Quercetin improves blood-brain barrier dysfunction in rats with cerebral ischemia reperfusion via Wnt signaling pathway." Am J Transl Res **11**(8): 4683-4695.

Joannides, R., W. E. Haefeli, L. Linder, V. Richard, E. H. Bakkali, C. Thuillez and T. F. Lüscher (1995). "Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo." Circulation **91**(5): 1314-1319.

Jobgen, W., W. J. Fu, H. Gao, P. Li, C. J. Meininger, S. B. Smith, T. E. Spencer and G. Wu (2009). "High fat feeding and dietary l-arginine supplementation differentially regulate gene expression in rat white adipose tissue." Amino Acids **37**(1): 187-198.

Journal_International_de_Médecine (2020

).

Jung, B.-J., H.-S. Yoo, S. Shin, Y.-J. Park and S.-M. Jeon (2018). "Dysregulation of NRF2 in Cancer: from Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities." Biomolecules & therapeutics **26**(1): 57-68.

Kähkönen, M. P., A. I. Hopia, H. J. Vuorela, J. P. Rauha, K. Pihlaja, T. S. Kujala and M. Heinonen (1999). "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds." J Agric Food Chem **47**(10): 3954-3962.

Kany, S., J. T. Vollrath and B. Relja (2019). "Cytokines in Inflammatory Disease." International Journal of Molecular Sciences **20**(23): 6008.

Kassab, A. and A. Piwowar (2012). "Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes." Biochimie **94**(9): 1837-1848.

Kaya, M. and B. Ahishali (2020). "Basic physiology of the blood-brain barrier in health and disease: a brief overview." Tissue Barriers: 1840913.

Kayama, Y., U. Raaz, A. Jagger, M. Adam, I. Schellinger, M. Sakamoto, H. Suzuki, K. Toyama, J. Spin and P. Tsao (2015). "Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress." International journal of molecular sciences **16**: 25234-25263.

Keaney, J. and M. Campbell (2015). "The dynamic blood-brain barrier." Febs j **282**(21): 4067-4079.

Khalil, R. A. (2013). Hypertension and Vascular Dysfunction. Interdisciplinary Concepts in Cardiovascular Health: Volume II: Secondary Risk Factors. I. Wakabayashi and K. Groschner. Cham, Springer International Publishing: 1-37.

Kim, J. A., M. Montagnani, K. K. Koh and M. J. Quon (2006). "Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms." Circulation **113**(15): 1888-1904.

Kim, Y. D., K. G. Park, Y. S. Lee, Y. Y. Park, D. K. Kim, B. Nedumaran, W. G. Jang, W. J. Cho, J. Ha, I. K. Lee, C. H. Lee and H. S. Choi (2008). "Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP." Diabetes **57**(2): 306-314.

King, G. L., K. Park and Q. Li (2016). "Selective Insulin Resistance and the Development of Cardiovascular Diseases in Diabetes: The 2015 Edwin Bierman Award Lecture." Diabetes **65**(6): 1462-1471.

Kirchhofer, D., K. S. Sakariassen, M. Clozel, T. B. Tschopp, P. Hadváry, Y. Nemerson and H. R. Baumgartner (1993). "Relationship between tissue factor expression and deposition of fibrin, platelets, and leukocytes on cultured endothelial cells under venous blood flow conditions." Blood **81**(8): 2050-2058.

Kleinschnitz, C., H. Grund, K. Wingler, M. E. Armitage, E. Jones, M. Mittal, D. Barit, T. Schwarz, C. Geis, P. Kraft, K. Barthel, M. K. Schuhmann, A. M. Herrmann, S. G. Meuth, G. Stoll, S. Meurer, A. Schrewe, L. Becker, V. Gailus-Durner, H. Fuchs, T. Klopstock, M. H. de Angelis, K. Jandeleit-Dahm, A. M. Shah, N. Weissmann and H. H. Schmidt (2010). "Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration." PLoS Biol **8**(9).

Klinge, C. M., K. A. Blankenship, K. E. Risinger, S. Bhatnagar, E. L. Noisin, W. K. Sumanasekera, L. Zhao, D. M. Brey and R. S. Keynton (2005). "Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells." J Biol Chem **280**(9): 7460-7468.

Kniesel, U. and H. Wolburg (2000). "Tight Junctions of the Blood–Brain Barrier." Cellular and Molecular Neurobiology **20**(1): 57-76.

Krga, I., R. Tamaian, S. Mercier, C. Boby, L. E. Monfoulet, M. Glibetic, C. Morand and D. Milenkovic (2018). "Anthocyanins and their gut metabolites attenuate monocyte adhesion and transendothelial migration through nutrigenomic mechanisms regulating endothelial cell permeability." Free Radic Biol Med **124**: 364-379.

Kuchake, V. and C. D. Dr (2011). "Evaluation of protective effect of antioxidant vitamins in patients with diabetic nephropathy." Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research **4**: 52-54.

Kukidome, D., T. Nishikawa, K. Sonoda, K. Imoto, K. Fujisawa, M. Yano, H. Motoshima, T. Taguchi, T. Matsumura and E. Araki (2006). "Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells." Diabetes **55**(1): 120-127.

Kumar, A., G. Negi and S. S. Sharma (2012). "Suppression of NF- κ B and NF- κ B regulated oxidative stress and neuroinflammation by BAY 11-7082 (I κ B phosphorylation inhibitor) in experimental diabetic neuropathy." Biochimie **94**(5): 1158-1165.

Kurth-Kraczek, E. J., M. F. Hirshman, L. J. Goodyear and W. W. Winder (1999). "5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle." Diabetes **48**(8): 1667-1671.

Lage, R., C. Diéguez, A. Vidal-Puig and M. López (2008). "AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis." Trends Mol Med **14**(12): 539-549.

Lamont, B. J. and D. J. Drucker (2008). "Differential antidiabetic efficacy of incretin agonists versus DPP-4 inhibition in high fat fed mice." Diabetes **57**(1): 190-198.

Lavergne, R. (2016). Tisaneurs et plantes médicinales indigènes à la Réunion.

Le Sage, F., O. Meilhac and M. P. Gonthier (2017a). "Anti-inflammatory and antioxidant effects of polyphenols extracted from *Antirhea borbonica* medicinal plant on adipocytes exposed to *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharides." Pharmacol Res **119**: 303-312.

Le Sage, F., O. Meilhac and M. P. Gonthier (2017b). "Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces pro-inflammatory adipokine secretion and oxidative stress by regulating Toll-like receptor-mediated signaling pathways and redox enzymes in adipocytes." Mol Cell Endocrinol **446**: 102-110.

Ledoux, A., M. Cao, O. Jansen, L. Mamede, P. E. Campos, B. Payet, P. Clerc, I. Grondin, E. Girard-Valenciennes, T. Hermann, M. Litaudon, C. Vanderheydt, L. Delang, J. Neyts, P. Leyssen, M. Frédérick and J. Smadja (2018). "Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands." Int J Antimicrob Agents **52**(5): 622-628.

- Lee, K., J. S. Lee, H. J. Jang, S. M. Kim, M. S. Chang, S. H. Park, K. S. Kim, J. Bae, J. W. Park, B. Lee, H. Y. Choi, C. H. Jeong and Y. Bu (2012). "Chlorogenic acid ameliorates brain damage and edema by inhibiting matrix metalloproteinase-2 and 9 in a rat model of focal cerebral ischemia." Eur J Pharmacol **689**(1-3): 89-95.
- Li, W., Z. Chen, M. Yan, P. He, Z. Chen and H. Dai (2016). "The protective role of isorhamnetin on human brain microvascular endothelial cells from cytotoxicity induced by methylglyoxal and oxygen-glucose deprivation." J Neurochem **136**(3): 651-659.
- Li, X., F. W. Bazer, H. Gao, W. Jobgen, G. A. Johnson, P. Li, J. R. McKnight, M. C. Satterfield, T. E. Spencer and G. Wu (2009). "Amino acids and gaseous signaling." Amino Acids **37**(1): 65-78.
- Libby, P. (2017). "Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond." J Am Coll Cardiol **70**(18): 2278-2289.
- Liu, C., J. Wu and M. H. Zou (2012). "Activation of AMP-activated protein kinase alleviates high-glucose-induced dysfunction of brain microvascular endothelial cell tight-junction dynamics." Free Radic Biol Med **53**(6): 1213-1221.
- Liu, C., J. Xie, S. Sun, H. Li, T. Li, C. Jiang, X. Chen, J. Wang, A. Le, J. Wang, Z. Li, J. Wang and W. Wang (2020). "Hemorrhagic Transformation After Tissue Plasminogen Activator Treatment in Acute Ischemic Stroke."
- Liu, D., T. Cheng, H. Guo, J. A. Fernández, J. H. Griffin, X. Song and B. V. Zlokovic (2004). "Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C." Nat Med **10**(12): 1379-1383.
- Liu, J., X. Jin, K. J. Liu and W. Liu (2012). "Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage." J Neurosci **32**(9): 3044-3057.
- Liu, Y., L. Zhang and J. Liang (2015). "Activation of the Nrf2 defense pathway contributes to neuroprotective effects of phloretin on oxidative stress injury after cerebral ischemia/reperfusion in rats." J Neurol Sci **351**(1-2): 88-92.
- Lovshin, J. A. and D. J. Drucker (2009). "Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus." Nat Rev Endocrinol **5**(5): 262-269.
- Lumeng, C. N., J. L. Bodzin and A. R. Saltiel (2007). "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization." J Clin Invest **117**(1): 175-184.
- Luo, J.-L., H. Kamata and M. Karin (2005). "IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy." The Journal of Clinical Investigation **115**(10): 2625-2632.
- Lupsa, B. C. and S. E. Inzucchi (2018). "Use of SGLT2 inhibitors in type 2 diabetes: weighing the risks and benefits." Diabetologia **61**(10): 2118-2125.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-241.
- MacDonald, P. E. and M. B. Wheeler (2003). "Voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets." Diabetologia **46**(8): 1046-1062.

- Mack, L. R. and P. G. Tomich (2017). "Gestational Diabetes: Diagnosis, Classification, and Clinical Care." Obstet Gynecol Clin North Am **44**(2): 207-217.
- Maejima, Y., S. Yokota, S. Horita and K. Shimomura (2020). "Early life high-fat diet exposure evokes normal weight obesity." Nutrition & Metabolism **17**(1): 48.
- Mahesh, T. and V. P. Menon (2004). "Quercetin alleviates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats." Phytother Res **18**(2): 123-127.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy and L. Jimenez (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." Am J Clin Nutr **79**(5): 727-747.
- Mandal (2020). "News Medical Life Sciences."
- Margetic, S. (2012). "Inflammation and haemostasis." Biochem Med (Zagreb) **22**(1): 49-62.
- Marimoutou, M., F. Le Sage, J. Smadja, C. Lefebvre d'Hellencourt, M. P. Gonthier and C. Robert-Da Silva (2015). "Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* and *Gouania mauritiana* protect 3T3-L1 preadipocytes against H₂O₂, TNF α and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismutase and NF-kappaB genes." J Inflamm (Lond) **12**: 10.
- Masschelin, P. M., A. R. Cox, N. Chernis and S. M. Hartig (2020). "The Impact of Oxidative Stress on Adipose Tissue Energy Balance." Frontiers in Physiology **10**(1638).
- Mateos, R., L. Goya and L. Bravo (2006). "Uptake and metabolism of hydroxycinnamic acids (chlorogenic, caffeic, and ferulic acids) by HepG2 cells as a model of the human liver." J Agric Food Chem **54**(23): 8724-8732.
- Mates, J. M. (2000). "Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology." Toxicology **153**(1-3): 83-104.
- Mates, J. M., C. Perez-Gomez and I. Nunez de Castro (1999). "Antioxidant enzymes and human diseases." Clin Biochem **32**(8): 595-603.
- Mayer, A. M. and E. Harel (1979). "Polyphenol oxidases in plants." Phytochemistry **18**(2): 193-215.
- McArdle, M. A., O. M. Finucane, R. M. Connaughton, A. M. McMorrow and H. M. Roche (2013). "Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies." Front Endocrinol (Lausanne) **4**: 52.
- Mey, J. D. and P. M. Vanhoutte (2014). "End o' the line revisited: moving on from nitric oxide to CGRP." Life sciences **118** **2**: 120-128.
- Michel, J. B., S. Delbosc, B. Ho-Tin-Noé, G. Leseche, A. Nicoletti, O. Meilhac and J. L. Martin-Ventura (2012). "From intraplaque haemorrhages to plaque vulnerability: biological consequences of intraplaque haemorrhages." J Cardiovasc Med (Hagerstown) **13**(10): 628-634.
- Milenkovic, D., C. Morand, A. Cassidy, A. Konic-Ristic, F. Tomás-Barberán, J. M. Ordovas, P. Kroon, R. De Caterina and A. Rodriguez-Mateos (2017). "Interindividual Variability in Biomarkers of Cardiometabolic Health after Consumption of Major Plant-Food Bioactive Compounds and the Determinants Involved." Adv Nutr **8**(4): 558-570.

Misra, A. and N. K. Vikram (2003). "Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots." Nutrition **19**(5): 457-466.

Miyamoto, T., N. Ogino, S. Yamamoto and O. Hayaishi (1976). "Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes." J Biol Chem **251**(9): 2629-2636.

Monfoulet, L. E., S. Mercier, D. Bayle, R. Tamaian, N. Barber-Chamoux, C. Morand and D. Milenkovic (2017). "Curcumin modulates endothelial permeability and monocyte transendothelial migration by affecting endothelial cell dynamics." Free Radic Biol Med **112**: 109-120.

Morand, C. and B. De Roos (2020). "Why interindividual variation in response to consumption of plant food bioactives matters for future personalised nutrition." **79**(2): 225-235.

Morand, C. and F. A. Tomás-Barberán (2019). "Contribution of plant food bioactives in promoting health effects of plant foods: why look at interindividual variability?" **58**(Suppl 2): 13-19.

Morioka, T., M. Emoto, Y. Yamazaki, N. Kawano, S. Imamura, R. Numaguchi, H. Urata, K. Motoyama, K. Mori, S. Fukumoto, H. Koyama, T. Shoji and M. Inaba (2014). "Leptin is associated with vascular endothelial function in overweight patients with type 2 diabetes." Cardiovascular diabetology **13**: 10-10.

Morris, G. P., A. L. Wright, R. P. Tan, A. Gladbach, L. M. Ittner and B. Vissel (2016). "A Comparative Study of Variables Influencing Ischemic Injury in the Longa and Koizumi Methods of Intraluminal Filament Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice." PLoS One **11**(2): e0148503.

Motterlini, R., R. Foresti, R. Bassi and C. J. Green (2000). "Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress." Free Radic Biol Med **28**(8): 1303-1312.

Muniyappa, R., M. Montagnani, K. K. Koh and M. J. Quon (2007). "Cardiovascular actions of insulin." Endocr Rev **28**(5): 463-491.

Muniyappa, R. and J. R. Sowers (2013). "Role of insulin resistance in endothelial dysfunction." Rev Endocr Metab Disord **14**(1): 5-12.

Murata, T., F. Ushikubi, T. Matsuoka, M. Hirata, A. Yamasaki, Y. Sugimoto, A. Ichikawa, Y. Aze, T. Tanaka, N. Yoshida, A. Ueno, S. Oh-ishi and S. Narumiya (1997). "Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor." Nature **388**(6643): 678-682.

Nagoya, P. d. (2014). "L'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation relatif à la convention sur la diversité biologique."

Najmanova, I., J. Pourova, M. Voprsalova, V. Pilarova, V. Semecky, L. Novakova and P. Mladenka (2016). "Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats." Mol Nutr Food Res **60**(5): 981-991.

Nakrani, M. N., R. H. Wineland and F. Anjum (2020). Physiology, Glucose Metabolism. StatPearls. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing

Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.

Nathan, C. and Q. W. Xie (1994). "Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls." Cell **78**(6): 915-918.

- Nathan, D. M., J. B. Buse, M. B. Davidson, E. Ferrannini, R. R. Holman, R. Sherwin and B. Zinman (2009). "Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy." A consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes **32**(1): 193-203.
- Niedzwiecki, A., M. W. Roomi, T. Kalinovsky and M. Rath (2016). "Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations." Nutrients **8**(9): 552.
- Nishikawa, T., D. Edelstein, X. L. Du, S. Yamagishi, T. Matsumura, Y. Kaneda, M. A. Yorek, D. Beebe, P. J. Oates, H. P. Hammes, I. Giardino and M. Brownlee (2000). "Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage." Nature **404**(6779): 787-790.
- O'Leary, K. A., A. J. Day, P. W. Needs, F. A. Mellon, N. M. O'Brien and G. Williamson (2003). "Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism." Biochem Pharmacol **65**(3): 479-491.
- Obermeier, B., R. Daneman and R. M. Ransohoff (2013). "Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier." Nat Med **19**(12): 1584-1596.
- Oemar, B. S., M. R. Tschudi, N. Godoy, V. Brovkovich, T. Malinski and T. F. Lüscher (1998). "Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis." Circulation **97**(25): 2494-2498.
- Oldendorf, W. H., M. E. Cornford and W. J. Brown (1977). "The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat." Ann Neurol **1**(5): 409-417.
- OMS (2016). "Rapport mondial sur le diabète."
- ORS (2015). "Le diabète à la Réunion."
- ORS (2017). "Les maladies cardiovasculaires à La Réunion."
- ORS (2018). "Le diabète à La Réunion, Chiffres clés."
- Ouchi, N., S. Kihara, T. Funahashi, Y. Matsuzawa and K. Walsh (2003). "Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease." Curr Opin Lipidol **14**(6): 561-566.
- Ouchi, N., J. L. Parker, J. J. Lugus and K. Walsh (2011). "Adipokines in inflammation and metabolic disease." Nat Rev Immunol **11**(2): 85-97.
- Palama, T. L., A. Khatib, Y. H. Choi, B. Payet, I. Fock, R. Verpoorte and H. Kodja (2009). "Metabolic Changes in Different Developmental Stages of Vanilla planifolia Pods." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(17): 7651-7658.
- Pandey, K. B. and S. I. Rizvi (2009). "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease." Oxid Med Cell Longev **2**(5): 270-278.
- Pardridge, W. M. (1992). "Recent developments in peptide drug delivery to the brain." Pharmacol Toxicol **71**(1): 3-10.

- Pardridge, W. M., R. J. Boado and C. R. Farrell (1990). "Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization." J Biol Chem **265**(29): 18035-18040.
- Park, C. S., J. Y. Lee, H. Y. Choi, K. Lee, Y. Heo, B. G. Ju, H. P. Choo and T. Y. Yune (2020). "Gallic acid attenuates blood-spinal cord barrier disruption by inhibiting Jmjd3 expression and activation after spinal cord injury." Neurobiol Dis **145**: 105077.
- Patel, T. P., K. Rawal, A. K. Bagchi, G. Akolkar, N. Bernardes, D. d. S. Dias, S. Gupta and P. K. Singal (2016). "Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes." Heart Failure Reviews **21**(1): 11-23.
- Patti, M. E. and C. R. Kahn (1998). "The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action." J Basic Clin Physiol Pharmacol **9**(2-4): 89-109.
- Paz, K., R. Hemi, D. LeRoith, A. Karasik, E. Elhanany, H. Kanety and Y. Zick (1997). "A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation." J Biol Chem **272**(47): 29911-29918.
- Persaud, S. J., C. J. Burns, V. D. Belin and P. M. Jones (2004). "Glucose-Induced Regulation of COX-2 Expression in Human Islets of Langerhans." Diabetes **53**(suppl 1): S190-S192.
- Picchi, A., X. Gao, S. Belmadani, B. J. Potter, M. Focardi, W. M. Chilian and C. Zhang (2006). "Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome." Circ Res **99**(1): 69-77.
- Piskula, M. and J. Terao (1998). "Accumulation of (-)-Epicatechin Metabolites in Rat Plasma after Oral Administration and Distribution of Conjugation Enzymes in Rat Tissues." The Journal of nutrition **128**: 1172-1178.
- Plump, A. S., J. D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J. G. Verstuyft, E. M. Rubin and J. L. Breslow (1992). "Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells." Cell **71**(2): 343-353.
- PNNS (2001). "Programme national nutrition santé 2001."
- Poller, B., J. Drewe, S. Krähenbühl, J. Huwyler and H. Gutmann (2010). "Regulation of BCRP (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1) by cytokines in a model of the human blood-brain barrier." Cell Mol Neurobiol **30**(1): 63-70.
- Priestley, J. R., K. E. Kautenburg, M. C. Casati, B. T. Endres, A. M. Geurts and J. H. Lombard (2016). "The NRF2 knockout rat: a new animal model to study endothelial dysfunction, oxidant stress, and microvascular rarefaction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **310**(4): H478-487.
- Qin, B., H. D. Dawson, N. W. Schoene, M. M. Polansky and R. A. Anderson (2012). "Cinnamon polyphenols regulate multiple metabolic pathways involved in insulin signaling and intestinal lipoprotein metabolism of small intestinal enterocytes." Nutrition **28**(11-12): 1172-1179.
- Rajesh, M., P. Mukhopadhyay, S. Bátkai, G. Haskó, L. Liaudet, V. R. Drel, I. G. Obrosova and P. Pacher (2007). "Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(1): H610-619.

- RE-CONSAL (2002). "Comportements alimentaires et activité physique des Réunionnais."
- Remesar, X. and M. Alemany (2020). "Dietary Energy Partition: The Central Role of Glucose." **21**(20).
- Ren, X., X. Guo, L. Chen, M. Guo, N. Peng and R. Li (2014). "Attenuated migration by green tea extract (-)-epigallocatechin gallate (EGCG): involvement of 67 kDa laminin receptor internalization in macrophagic cells." Food Funct **5**(8): 1915-1919.
- Ricci P., B. P. O., Weill A., Simon D., Tuppin P., Ricordeau P., Allemand H. (2010). "Diabète traité : quelles évolutions entre 2000 et 2009 en France ?" Bulletin épidémiologique hebdomadaire **N° 42-43**: 425-431.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller and G. Paganga (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." Free Radic Biol Med **20**(7): 933-956.
- Richey, J. M. (2013). "The Vascular Endothelium, a Benign Restrictive Barrier? NO! Role of Nitric Oxide in Regulating Insulin Action." Diabetes **62**(12): 4006-4008.
- Robb, E. L., A. R. Hall, T. A. Prime, S. Eaton, M. Szibor, C. Viscomi, A. M. James and M. P. Murphy (2018). "Control of mitochondrial superoxide production by reverse electron transport at complex I." **293**(25): 9869-9879.
- Röder, P., B. Wu, Y. Liu and W. Han (2016). "Pancreatic regulation of glucose homeostasis." Experimental & Molecular Medicine **48**: e219.
- Rolo, A. P. and C. M. Palmeira (2006). "Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress." Toxicol Appl Pharmacol **212**(2): 167-178.
- Rorsman, P. and E. Renström (2003). "Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells." Diabetologia **46**(8): 1029-1045.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.
- Rossi, M. and A. Carpi (2004). "Skin microcirculation in peripheral arterial obliterative disease." Biomed Pharmacother **58**(8): 427-431.
- Ruan, H. and L. Dong (2016). "Adiponectin signaling and function in insulin target tissues." Journal of Molecular Cell Biology **8**: mju014.
- Rummun, N., P. Rondeau, E. Bourdon, E. Pires, J. McCullagh, T. Claridge, T. Bahorun, W.-W. Li and V. Neergheen (2020). "Terminalia bentoë, a Mascarene Endemic Plant, Inhibits Human Hepatocellular Carcinoma Cells Growth In Vitro via G0/G1 Phase Cell Cycle Arrest." Pharmaceuticals **13**: 303.
- Ruskovska, T., M. Massaro, M. A. Carluccio and A. Arola-Arnal (2020). "Systematic bioinformatic analysis of nutrigenomic data of flavanols in cell models of cardiometabolic disease." **11**(6): 5040-5064.
- Ryan, C. M., W. Khoo, A. C. Stewart, S. F. O'Keefe, J. D. Lambert and A. P. Neilson (2017). "Flavanol concentrations do not predict dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activities of four cocoas with different processing histories." **8**(2): 746-756.
- Saija, A., M. Scalese, M. Lanza, D. Marzullo, F. Bonina and F. Castelli (1995). "Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes." Free Radic Biol Med **19**(4): 481-486.

- Salminen, A., J. M. T. Hyttinen and K. Kaarniranta (2011). "AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan." Journal of molecular medicine (Berlin, Germany) **89**(7): 667-676.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**(6865): 799-806.
- Scalbert, A. and G. Williamson (2000). "Dietary intake and bioavailability of polyphenols." J Nutr **130**(8S Suppl): 2073S-2085S.
- Schimmack, G., R. A. Defronzo and N. Musi (2006). "AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications." Diabetes Obes Metab **8**(6): 591-602.
- Schinkel, A. H. and J. W. Jonker (2003). "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview." Adv Drug Deliv Rev **55**(1): 3-29.
- Schmidt-Arras, D. and S. Rose-John (2016). "IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy." J Hepatol **64**(6): 1403-1415.
- Schottelius, A. J., M. W. Mayo, R. B. Sartor and A. S. Baldwin, Jr. (1999). "Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding." J Biol Chem **274**(45): 31868-31874.
- Schrier, R. W. (2007). "Aquaporin-related disorders of water homeostasis." Drug News Perspect **20**(7): 447-453.
- Sedlakova, R., R. R. Shivers and R. F. Del Maestro (1999). "Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit." J Submicrosc Cytol Pathol **31**(1): 149-161.
- Sena, C. M., A. M. Pereira and R. Seica (2013). "Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease." Biochim Biophys Acta **1832**(12): 2216-2231.
- Septembre-Malaterre, A., F. Le Sage, S. Hatia, A. Catan, L. Janci and M. P. Gonthier (2016). "Curcuma longa polyphenols improve insulin-mediated lipid accumulation and attenuate proinflammatory response of 3T3-L1 adipose cells during oxidative stress through regulation of key adipokines and antioxidant enzymes." Biofactors **42**(4): 418-430.
- Septembre-Malaterre, A., G. Stanislas, E. Douraguia and M. P. Gonthier (2016). "Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Reunion French Island." Food Chem **212**: 225-233.
- Seufi, A. M., S. S. Ibrahim, T. K. Elmaghraby and E. E. Hafez (2009). "Preventive effect of the flavonoid, quercetin, on hepatic cancer in rats via oxidant/antioxidant activity: molecular and histological evidences." Journal of experimental & clinical cancer research : CR **28**(1): 80-80.
- Shalaby, F., J. Rossant, T. P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X.-F. Wu, M. L. Breitman and A. C. Schuh (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." Nature **376**(6535): 62-66.
- Sharma, A., L. Rizky, N. Stefanovic, M. Tate, R. H. Ritchie, K. W. Ward and J. B. de Haan (2017). "The nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) activator dh404 protects against diabetes-induced endothelial dysfunction." Cardiovasc Diabetol **16**(1): 33.

- Simmons, D. L., D. B. Levy, Y. Yannoni and R. L. Erikson (1989). "Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(4): 1178-1182.
- Smadja, J. M., C. (2016). Le grand livre des plantes médicinales de l'île de La Réunion inscrites à la pharmacopée française.
- Sosulski, F., K. Krygier and L. Hogge (1982). "Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours." Journal of Agricultural and Food Chemistry **30**(2): 337-340.
- Spencer, J. P., G. G. Kuhnle, R. J. Williams and C. Rice-Evans (2003). "Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites." Biochem J **372**(Pt 1): 173-181.
- Stahl, W. and H. Sies (2012). "β-Carotene and other carotenoids in protection from sunlight." Am J Clin Nutr **96**(5): 1179s-1184s.
- Steinl, D. C. and B. A. Kaufmann (2015). "Ultrasound imaging for risk assessment in atherosclerosis." Int J Mol Sci **16**(5): 9749-9769.
- Stoffers, D. A., T. J. Kieffer, M. A. Hussain, D. J. Drucker, S. Bonner-Weir, J. F. Habener and J. M. Egan (2000). "Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas." Diabetes **49**(5): 741-748.
- Streit, W. J., J. R. Conde, S. E. Fendrick, B. E. Flanary and C. L. Mariani (2005). "Role of microglia in the central nervous system's immune response." Neurological Research **27**(7): 685-691.
- Stuart, R. O. and S. K. Nigam (1995). "Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(13): 6072-6076.
- Stuart, R. O., A. Sun, K. T. Bush and S. K. Nigam (1996). "Dependence of epithelial intercellular junction biogenesis on thapsigargin-sensitive intracellular calcium stores." J Biol Chem **271**(23): 13636-13641.
- Sugihara, H., M. Nagao, T. Harada, Y. Nakajima, K. Tanimura-Inagaki, F. Okajima, H. Tamura, T. Inazawa, T. Otonari, M. Kawakami and S. Oikawa (2014). "Comparison of three α-glucosidase inhibitors for glycemic control and bodyweight reduction in Japanese patients with obese type 2 diabetes." Journal of diabetes investigation **5**(2): 206-212.
- Sun, H., H. Dai, N. Shaik and W. F. Elmquist (2003). "Drug efflux transporters in the CNS." Advanced Drug Delivery Reviews **55**(1): 83-105.
- Sun, Y. and L. W. Oberley (1996). "Redox regulation of transcriptional activators." Free Radic Biol Med **21**(3): 335-348.
- Suzuki, K., G. Olah, K. Modis, C. Coletta, G. Kulp, D. Gerö, P. Szoleczky, T. Chang, Z. Zhou, L. Wu, R. Wang, A. Papapetropoulos and C. Szabo (2011). "Hydrogen sulfide replacement therapy protects the vascular endothelium in hyperglycemia by preserving mitochondrial function." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(33): 13829-13834.
- Szwajgier, D., K. Borowiec and K. Pustelniak (2017). "The Neuroprotective Effects of Phenolic Acids: Molecular Mechanism of Action." Nutrients **9**(5).
- Tahrani, A. A., A. H. Barnett and C. J. Bailey (2016). "Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus." Nat Rev Endocrinol **12**(10): 566-592.

- Takayama, T., A. Wada, T. Tsutamoto, M. Ohnishi, M. Fujii, T. Isono and M. Horie (2004). "Contribution of vascular NAD(P)H oxidase to endothelial dysfunction in heart failure and the therapeutic effects of HMG-CoA reductase inhibitor." Circ J **68**(11): 1067-1075.
- Tan, S. M. and J. B. de Haan (2014). "Combating oxidative stress in diabetic complications with Nrf2 activators: How much is too much?" Redox Report **19**(3): 107-117.
- Tataranni, P. A. and E. Ortega (2005). "A burning question: does an adipokine-induced activation of the immune system mediate the effect of overnutrition on type 2 diabetes?" Diabetes **54**(4): 917-927.
- Tengan, C. H. and C. T. Moraes (2017). "NO control of mitochondrial function in normal and transformed cells." Biochim Biophys Acta Bioenerg **1858**(8): 573-581.
- Thiebaut, F., T. Tsuruo, H. Hamada, M. M. Gottesman, I. Pastan and M. C. Willingham (1989). "Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein." J Histochem Cytochem **37**(2): 159-164.
- Thomas, S. R., P. K. Witting and G. R. Drummond (2008). "Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities." Antioxid Redox Signal **10**(10): 1713-1765.
- Thulé, P. M. and G. Umpierrez (2014). "Sulfonylureas: a new look at old therapy." Curr Diab Rep **14**(4): 473.
- Tiganis, T. (2011). "Reactive oxygen species and insulin resistance: the good, the bad and the ugly." Trends Pharmacol Sci **32**(2): 82-89.
- Tomás-Barberán, F. A. and M. N. Clifford (2000). "Flavonones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden." Journal of the Science of Food and Agriculture **80**(7): 1073-1080.
- Tontsch, U. and H. C. Bauer (1991). "Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells." Brain Res **539**(2): 247-253.
- Torzicky, M., P. Viznerova, S. Richter, H. Strobl, C. Scheinecker, D. Foedinger and E. Riedl (2012). "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) and CD99 are critical in lymphatic transmigration of human dendritic cells." J Invest Dermatol **132**(4): 1149-1157.
- Tsai, S. J., C. Y. Chao and M. C. Yin (2011). "Preventive and therapeutic effects of caffeic acid against inflammatory injury in striatum of MPTP-treated mice." Eur J Pharmacol **670**(2-3): 441-447.
- Tuomilehto, J., D. Rastenyte, P. Jousilahti, C. Sarti and E. Vartiainen (1996). "Diabetes mellitus as a risk factor for death from stroke. Prospective study of the middle-aged Finnish population." Stroke **27**(2): 210-215.
- Turner, R. J. and F. R. Sharp (2016). "Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke." Frontiers in cellular neuroscience **10**: 56-56.
- Ulaszewska, M., N. Vázquez-Manjarrez, M. Garcia-Aloy, R. Llorach, F. Mattivi, L. O. Dragsted, G. Praticò and C. Manach (2018). "Food intake biomarkers for apple, pear, and stone fruit." Genes Nutr **13**: 29.

- Ulaszewska, M. M., C. H. Weinert, A. Trimigno, R. Portmann, C. Andres Lacueva, R. Badertscher, L. Brennan, C. Brunius, A. Bub and F. Capozzi (2019). "Nutrimetabolomics: An Integrative Action for Metabolomic Analyses in Human Nutritional Studies." *63*(1): e1800384.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(1): 44-84.
- Vallance, P. and N. Chan (2001). "Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance." *Heart* **85**(3): 342-350.
- Vásquez-Vivar, J., B. Kalyanaraman, P. Martásek, N. Hogg, B. S. Masters, H. Karoui, P. Tordo and K. A. Pritchard, Jr. (1998). "Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9220-9225.
- Veerapur, V., K. Prabhakar, T. Boreddy Shivanandappa, P. Bansal, K. Srinivasan and M. K. Unnikrishnan (2010). "Antidiabetic effect of *Dodonaea viscosa* (L). Lacq. aerial parts in high fructose-fed insulin resistant rats: A mechanism based study." *Indian journal of experimental biology* **48**: 800-810.
- Veeran, B., B. Ghaddar, M. Bringart, S. Khazaal and M. P. Gonthier (2020). "Phenolic Profile of Herbal Infusion and Polyphenol-Rich Extract from Leaves of the Medicinal Plant *Antirhea borbonica*: Toxicity Assay Determination in Zebrafish Embryos and Larvae." **25**(19).
- Verhoeven, M. E., A. Bovy, G. Collins, S. Muir, S. Robinson, C. H. de Vos and S. Colliver (2002). "Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway." *J Exp Bot* **53**(377): 2099-2106.
- Vestweber, D. (2015). "How leukocytes cross the vascular endothelium." *Nature Reviews Immunology* **15**: 692-704.
- Vetere, A., A. Choudhary, S. M. Burns and B. K. Wagner (2014). "Targeting the pancreatic β -cell to treat diabetes." *Nature Reviews Drug Discovery* **13**(4): 278-289.
- Vikramadithyan, R. K., Y. Hu, H. L. Noh, C. P. Liang, K. Hallam, A. R. Tall, R. Ramasamy and I. J. Goldberg (2005). "Human aldose reductase expression accelerates diabetic atherosclerosis in transgenic mice." *J Clin Invest* **115**(9): 2434-2443.
- Vincenti, M. P. (2001). The Matrix Metalloproteinase (MMP) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) Genes. *Matrix Metalloproteinase Protocols*. I. M. Clark. Totowa, NJ, Humana Press: 121-148.
- Vita, J. A. (2005). "Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function." *The American Journal of Clinical Nutrition* **81**(1): 292S-297S.
- Vlassara, H. and J. Uribarri (2014). "Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both?" *Current diabetes reports* **14**(1): 453-453.
- Wachtel, M., K. Frei, E. Ehler, A. Fontana, K. Winterhalter and S. M. Gloor (1999). "Occludin proteolysis and increased permeability in endothelial cells through tyrosine phosphatase inhibition." *J Cell Sci* **112** (Pt 23): 4347-4356.
- Wang, R. Y., L. H. Liu, H. Liu, K. F. Wu, J. An, Q. Wang, Y. Liu, L. J. Bai, B. M. Qi, B. L. Qi and L. Zhang (2018). "Nrf2 protects against diabetic dysfunction of endothelial progenitor cells via regulating cell senescence." *Int J Mol Med* **42**(3): 1327-1340.

- Wei, X., D. Wang, Y. Yang, M. Xia, D. Li, G. Li, Y. Zhu, Y. Xiao and W. Ling (2011). "Cyanidin-3-O- β -glucoside improves obesity and triglyceride metabolism in KK-Ay mice by regulating lipoprotein lipase activity." J Sci Food Agric **91**(6): 1006-1013.
- Weidig, P., D. McMaster and U. Bayraktutan (2004). "High glucose mediates pro-oxidant and antioxidant enzyme activities in coronary endothelial cells." Diabetes Obes Metab **6**(6): 432-441.
- Welz, A. N., A. Emberger-Klein and K. Menrad (2018). "Why people use herbal medicine: insights from a focus-group study in Germany." BMC Complement Altern Med **18**(1): 92.
- Werner, N. and G. Nickenig (2004). "From Fat Fighter to Risk Factor." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **24**(1): 7-9.
- Wideman, R., M. Chapman, W. Wang and G. Erf (2004). "Immune modulation of the pulmonary hypertensive response to bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in broilers." Poultry science **83**: 624-637.
- Wilcox, G. (2005). "Insulin and insulin resistance." The Clinical biochemist. Reviews **26**(2): 19-39.
- Williams, C. R., X. Lu, R. L. Sutliff and C. M. Hart (2012). "Rosiglitazone attenuates NF- κ B-mediated Nox4 upregulation in hyperglycemia-activated endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **303**(2): C213-223.
- Wingler, K., J. J. Hermans, P. Schiffers, A. Moens, M. Paul and H. H. Schmidt (2011). "NOX1, 2, 4, 5: counting out oxidative stress." Br J Pharmacol **164**(3): 866-883.
- Wirth, A. and B. Rothenfelde (1996). "[Metabolic syndrome]." Versicherungsmedizin **48**(6): 193-199.
- Wirth, A., I. Vogel, A. Schömig and G. Schlierf (1987). "Metabolic effects and body fat mass changes in obese subjects on a very-low-calorie diet with and without intensive physical training." Ann Nutr Metab **31**(6): 378-386.
- Wójtowicz, S., A. K. Strosznajder, M. Jeżyna and J. B. Strosznajder (2020). "The Novel Role of PPAR Alpha in the Brain: Promising Target in Therapy of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders." Neurochemical Research **45**(5): 972-988.
- Wolin, M. S., S. A. Gupte, B. H. Neo, Q. Gao and M. Ahmad (2010). "Oxidant-redox regulation of pulmonary vascular responses to hypoxia and nitric oxide-cGMP signaling." Cardiol Rev **18**(2): 89-93.
- Woodfin, A., C. A. Reichel, A. Khandoga, M. Corada, M. B. Voisin, C. Scheiermann, D. O. Haskard, E. Dejana, F. Krombach and S. Nourshargh (2007). "JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration." Blood **110**(6): 1848-1856.
- Wu, G. Y. and J. T. Brosnan (1992). "Macrophages can convert citrulline into arginine." The Biochemical journal **281** (Pt 1)(Pt 1): 45-48.
- Wu, J. S., H. D. Tsai, W. M. Cheung, C. Y. Hsu and T. N. Lin (2016). "PPAR- γ Ameliorates Neuronal Apoptosis and Ischemic Brain Injury via Suppressing NF- κ B-Driven p22phox Transcription." Mol Neurobiol **53**(6): 3626-3645.
- Wu, L., J. Li, T. Liu, S. Li, J. Feng, Q. Yu, J. Zhang, J. Chen, Y. Zhou, J. Ji, K. Chen, Y. Mao, F. Wang, W. Dai, X. Fan, J. Wu and C. Guo (2019). "Quercetin shows anti-tumor effect in hepatocellular carcinoma LM3 cells by abrogating JAK2/STAT3 signaling pathway." Cancer medicine **8**(10): 4806-4820.

- Xu, J. and M.-H. Zou (2009). "Molecular Insights and Therapeutic Targets for Diabetic Endothelial Dysfunction." Circulation **120**(13): 1266-1286.
- Xu, Q., X. Hao, Q. Yang and L. Si (2009). "Resveratrol prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase." Biochem Biophys Res Commun **388**(2): 389-394.
- Xueyan, Z., S. Shupeng, S. Jie, Z. Mingyi and H. Qingnan (2019). "Functional Immunoregulation by Heme Oxygenase 1 in Juvenile Autoimmune Diseases." Current Gene Therapy **19**(2): 110-116.
- Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W. I. Weis and W. J. Nelson (2005). "Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex." Cell **123**(5): 889-901.
- Yang, C., K. E. Hawkins, S. Doré and E. Candelario-Jalil (2019). "Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke." **316**(2): C135-c153.
- Yang, C. S. and J. M. Landau (2000). "Effects of Tea Consumption on Nutrition and Health." The Journal of Nutrition **130**(10): 2409-2412.
- Yang, S., H. Jin and Z. Zhao (2018). "Paracellular tightness and the functional expression of efflux transporters P-gp and BCRP in bEnd3 cells." Neurological Research **40**(8): 644-649.
- Yang, S., S. Mei, H. Jin, B. Zhu, Y. Tian, J. Huo, X. Cui, A. Guo and Z. Zhao (2017). "Identification of two immortalized cell lines, ECV304 and bEnd3, for in vitro permeability studies of blood-brain barrier." PLoS One **12**(10): e0187017.
- Yang, Y., W. Nie, J. Yuan, B. Zhang, Z. Wang, Z. Wu and Y. Guo (2010). "Genistein activates endothelial nitric oxide synthase in broiler pulmonary arterial endothelial cells by an Akt-dependent mechanism." Exp Mol Med **42**(11): 768-776.
- Yang, Y., Z. Wu, C. J. Meininger and G. Wu (2015). "l-Leucine and NO-mediated cardiovascular function." Amino Acids **47**(3): 435-447.
- Yayama, K. and H. Okamoto (2008). "Angiotensin II-induced vasodilation via type 2 receptor: role of bradykinin and nitric oxide." Int Immunopharmacol **8**(2): 312-318.
- Yi, X. and N. Maeda (2006). "α-Lipoic Acid Prevents the Increase in Atherosclerosis Induced by Diabetes in Apolipoprotein E-Deficient Mice Fed High-Fat/Low-Cholesterol Diet." Diabetes **55**(8): 2238-2244.
- Ylä-Herttuala, S., B. A. Lipton, M. E. Rosenfeld, T. Särkioja, T. Yoshimura, E. J. Leonard, J. L. Witztum and D. Steinberg (1991). "Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(12): 5252-5256.
- Yokozawa, T., H. Y. Kim, E. J. Cho, J. S. Choi and H. Y. Chung (2002). "Antioxidant effects of isorhamnetin 3,7-di-O-beta-D-glucopyranoside isolated from mustard leaf (*Brassica juncea*) in rats with streptozotocin-induced diabetes." J Agric Food Chem **50**(19): 5490-5495.
- Yong, V. W., C. A. Krekoski, P. A. Forsyth, R. Bell and D. R. Edwards (1998). "Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS." Trends Neurosci **21**(2): 75-80.
- Youdim, K. A., M. Z. Qaiser, D. J. Begley, C. A. Rice-Evans and N. J. Abbott (2004). "Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier." Free Radic Biol Med **36**(5): 592-604.

- Yu, P., L. Wang, F. Tang, L. Zeng, L. Zhou, X. Song, W. Jia, J. Chen and Q. Yang (2016). "Resveratrol Pretreatment Decreases Ischemic Injury and Improves Neurological Function Via Sonic Hedgehog Signaling After Stroke in Rats." Mol Neurobiol **54**(1): 212-226.
- Zelko, I. N., T. J. Mariani and R. J. Folz (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**(3): 337-349.
- Zeng, M. Y., I. Miralda, C. L. Armstrong, S. M. Uriarte and J. Bagaitkar (2019). "The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses." Molecular Oral Microbiology **34**(2): 27-38.
- Zhang, H., J. Zhang, Z. Ungvari and C. Zhang (2009). "Resveratrol improves endothelial function: role of TNF{alpha} and vascular oxidative stress." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(8): 1164-1171.
- Zhang, J.-M. and J. An (2007). "Cytokines, inflammation, and pain." International anesthesiology clinics **45**(2): 27-37.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-432.
- Zhao, X., R. Strong, J. Zhang, G. Sun, J. Z. Tsien, Z. Cui, J. C. Grotta and J. Aronowski (2009). "Neuronal PPARgamma deficiency increases susceptibility to brain damage after cerebral ischemia." J Neurosci **29**(19): 6186-6195.
- Zhao, Z., J. Hu, X. Gao, H. Liang, H. Yu, S. Liu and Z. Liu (2017). "Hyperglycemia via activation of thromboxane A2 receptor impairs the integrity and function of blood-brain barrier in microvascular endothelial cells." Oncotarget **8**(18): 30030-30038.
- Zhao, Z., X. Zhang, Y. Dai, K. Pan, Y. Deng, Y. Meng and T. Xu (2019). "PPAR-γ promotes p38 MAP kinase-mediated endothelial cell permeability through activating Sirt3." BMC Neurology **19**(1): 289.
- Zheng, W., Y. Ma, A. Zhao, T. He, N. Lyu, Z. Pan, G. Mao, Y. Liu, J. Li, P. Wang, J. Wang, B. Zhu and Y. Zhang (2019). "Compositional and functional differences in human gut microbiome with respect to equol production and its association with blood lipid level: a cross-sectional study." Gut Pathog **11**: 20.
- Zhou, Y.-P., A. Madjidi, M. E. Wilson, D. A. Nothhelfer, J. H. Johnson, J. F. Palma, A. Schweitzer, C. Burant, J. E. Blume and J. D. Johnson (2005). "Matrix Metalloproteinases Contribute to Insulin Insufficiency in Zucker Diabetic Fatty Rats." Diabetes **54**(9): 2612-2619.
- Zlokovic, B. V. (2008). "The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders." Neuron **57**(2): 178-201.