Caractérisation de nouvelles molécules vasorelaxantes : études chimico-pharmacologique de Carissa edulis, une espèce médicinale de la pharmacopée béninoise

Ursula Mawulé Houngue

▶ **To cite this version:**

Ursula Mawulé Houngue. Caractérisation de nouvelles molécules vasorelaxantes : études chimico-pharmacologique de Carissa edulis, une espèce médicinale de la pharmacopée béninoise. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg; Université d'Abomey-Calavi (Bénin), 2021. Français. NNT : 2021STRAJ111 . tel-03851076

HAL Id: tel-03851076
https://theses.hal.science/tel-03851076

Submitted on 14 Nov 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.

Université de Strasbourg

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Nanomédecine régénérative – INSERM UMR 1260

THÈSE présentée par :

Ursula Mawulé HOUNGUE

soutenue le : **06 décembre 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences Pharmaceutiques - Pharmacologie

Caractérisation de nouvelles molécules vasorelaxantes : études chimico-pharmacologique de *Carissa edulis*, une espèce médicinale de la pharmacopée béninoise

THÈSE dirigée par :

Mme SCHINI-KERTH Valérie	**Professeur, Université de Strasbourg**
Mr GBAGUIDI Fernand	**Professeur, Université d'Abomey-Calavi**

RAPPORTEURS :

Mme GONTHIER Marie-Paule	**Professeure, Université de La Réunion**
M. AWEDE Bonaventure	**Professeur, Université d'Abomey-Calavi**

Examinateur :

M. Dominique STEPHAN	**Professeur, Université de Strasbourg**

Autres membres du jury :

M. Valentin WOTTO	**Professeur, Université d'Abomey-Calavi**

Dédicaces

Je dédie ma thèse à Dieu, à mon Père, à ma Mère et à mon Parrain

Remerciements

Je rends grâce à Dieu et remercie de tout cœur toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de mes travaux de recherche. Votre contribution de quelque nature qu'elle ait été est vivement appréciée.

Je tiens particulièrement à exprimer ma profonde gratitude envers mes superviseurs **Prof. Valérie SCHINI-KERTH** et **Prof. Fernand GBAGUIDI** pour tout le soutien et l'assistance dont j'ai pu bénéficier de leur part tout au long de mon parcours doctoral. Merci au Prof. Gbaguidi pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet aussi passionnant et au Prof. Schini-Kerth pour m'avoir accueilli dans son labo et avoir mis à ma disposition tout ce dont j'avais besoin pour la réalisation des travaux.

Merci à l'Ambassade de France au Bénin qui m'a attribué une bourse en alternance et au Programme Doctoral International de l'Université de Strasbourg qui m'a octroyées des aides à la mobilité et des aménagements spécifiques.

Au Prof. Euloge OGOUWALE mon Parain, j'exprime ma reconnaissance pour la grande générosité, les conseils et le soutien indéfectible qu'il a été pour moi.

Je remercie également Dr Jean-Marie TOKOUDAGBA, Dr Cyril AUGER, Dr Sèdami MEDEGAN FAGLA, Dr Gabin ASSANHOUN, Dr Urbain KASSEHIN, Dr Charles AHOUANSOU, Dr Hope SOUNOUVOU et Dr Horrhus HOUNGUE pour leur assistance et leur conseil.

Cette thèse n'aurait pas pu se réaliser sans la contribution effective de Brigitte POLLET qui m'a aidé dans l'apprentissage des techniques ; de mes collègues du laboratoire de France : Ahmed CHAKER, Christophe BRUCKERT, Eugenia BELCASTRO, Hanine EL ITAWI, Muhamed KASEEM, Paola Algara SUAREZ, Sandy HMADEH, Dal-Seong GONG, Walaa FAKIH et de mes collègues du laboratoire de Cotonou : Géraldine De SOUZA, Gildas HOUNKANRIN, Aude ZINSOU, Perrin HOUNGUE, Narcisse AGBANOU, Hope AMOU, Steeve ADJIBODE et Parfait DOFFON.

Remerciement spécial et particulier à mon fiancé Dr Etienne HESSOU pour son amour, son assistance, son soutien indéfectible tout au long de mon parcours doctoral et sa contribution à la réalisation de mon document de thèse.

Mon séjour à Strasbourg n'aurait pas pu être aussi agréable sans ma merveilleuse famille chrétienne ICC Strasbourg. Remerciement particulier à mon Berger Pasteur Armond GOURDET et à son épouse, à toute l'équipe Impact Junior et à la famille NOUME.

A mes amies Lamia REMILA, Julia MASSAN, Sandra AHARH-KPESSOU et Sandra VIDJRO, je veux exprimer ma gratitude pour les bons moments que nous avons passé ensemble.

Je ne saurais finir sans remercier mon Père, ma Mère et tous mes frères. Merci pour l'amour inconditionnel et le soutien indéfectible.

Ursula HOUNGUE

Strasbourg, France

Abbréviations

5-HT	5-Hydroxytryptamine
AA	Acide arachidonique
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
AGE	Produits de glycation avancée
AHA	American Heart Association
Akt	Protéine kinase B
Ang II	Angiotensine II
AT_1R	Récepteur de l'angiotensine I
AT_2R	Récepteur de l'angiotensine II
BH_4	Tétrahydrobioptérine
BK	Bradykinine
BK_{Ca}^{2+}	Canal potassique activé par le calcium de grande conductance
K^+	Canal potassique
CaM	Calmoduline
CI_{50}	Concentration inhibitrice semi-maximale
cAMP	Adénosine Monophosphate cyclique
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
CRP	Protéine C-réactive
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindole
DCM-MeOH	Dichlorométhane-méthanol
DHE	Dihydroéthidium
DNA	Acide désoxyribonucléique
DPPH	2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle
CE	Cellules endothéliales
EDCF	Endothelium-derived contractile factors
EDH	Hyperpolarisation dépendante de l'endothélium
EDRF	Facteurs de relaxation dérivés de l'endothélium
eNOS	NO synthase endothéliale
ETA	Récepteur de l'endothéline A
ETB	Récepteur de l'endothéline B
FMD	Dilatation médiée par le flux
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse
GMP	Guanosine monophosphate
GPCR	Récepteur couplé à la protéine G
GPx	Glutathion peroxidase
GSH	Glutathion
GTP	Guanosine trisphosphate
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
H_2S	Sulfure de dihydrogène
IFN- γ	Interféron gamma
i-ƙB	Inhibiteur de ƙB
IK_{Ca}^{2+}	Canal potassique activé par le calcium à conductance intermédiaire
IL	Interleukine
K_{Ca}	Canal potassique activé par le calcium
K_{ir}	Canal potassique à redressement vers l'intérieur
L-NA	L-nitroarginine
MCV	Maladies cardiovasculaires
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
MMP	Métalloprotéinase matricielle

MR	Récepteur minéralocorticoïde
Na^+	Ion sodium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-kB	Facteur nucléaire kappa B
nNOS	NO synthase neuronale
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
$O_2^{-\cdot}$	Anion superoxide
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLA_2	Phospholipase A_2
RAAS	Système rénine angiotensine aldostérone
RAS	Système rénine-angiotensine
RNA	Acide ribonucléique
sGC	Guanylyl cyclase soluble
SHR	Rats spontanément hypertendus
SK_{Ca}	Canal potassique activé par le calcium à faible conductance
SMC	Cellule musculaire lisse
SOC_{Ca2+}	Canal calcique de réserve
SOD	Superoxyde dismutase
TEAC	Capacité antioxydante équivalente au Trolox
Th-17	T auxiliaire 17
MT	Médecine traditionnelle
TNF-α	Facteur de nécrose tissulaire-α
TXA_2	Thromboxane A_2
VCAM	Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1
VSMC	Cellule musculaire lisse vasculaire
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Sommaire

Liste des figures xi

Liste des tableaux xiii

Introduction 1

ETAT DE L'ART 5

Chapitre 1 : Endothélium vasculaire 6

1. Anatomie générale des vaisseaux sanguins 7

2. Rôle de l'endothélium dans la régulation du tonus vasculaire 8

2.1. Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF) 9

2.1.1. Le monoxyde d'azote (NO) 9

2.1.2. L'hyperpolarisation dérivée de l'endothélium (EDH) 14

2.1.3. La prostaglandine (PGI_2) 16

2.2. Les facteurs contractants dérivés de l'endothélium (EDCF) 18

2.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et le stress oxydatif 19

2.2.2. L'Angiotensine II (Ang II) 21

2.2.3 Thromboxane A_2 et Prostaglandine 22

2.2.4 - L'endothéline-1 (ET-1) 25

Chapitre 2 : Dysfonction endothéliale et hypertension artérielle 28

1. Maladies cardiovasculaires et hypertension artérielle 29

2. Hypertension artérielle au Bénin 30

3. Modèle d'hypertension 30

4. Dysfonction endothéliale 33

..... 34

5. Dysfonction endothéliale et hypertension artérielle 34

6. Vieillissement et hypertension artérielle 36

7. Inflammation endothéliale et hypertension 39

7.1. Les cellules Th17 41

7.2. Les cellules dendritiques 41

7. 3 Les cytokines 43

8. Espèces réactives de l'oxygène (ROS) et hypertension 44

9. Les nouveaux traitements antihypertenseurs 47

9.1. Les médicaments ciblant le système rénine angiotensine aldostérone (RAAS) 47

9.1.1. Les inhibiteurs de l'aldostérone synthase et les antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes 47

9.1.2 Activateurs de l'axe enzyme de conversion de l'angiotensine2 / angiotensine (1–7) / récepteur MAS 49

9.2. Les inhibiteurs de l'absorption du sodium 50
9.3. Les inhibiteurs de la dopamine-bêta-hydroxylase 50
9.3. Les inhibiteurs de l'aminopeptidase A 51
9.3. Effet couplé des inhibiteurs de la néphrilysine et antagonistes des récepteurs de l'angiotensine 52
Chapitre 3 : Plantes et traitement de l'hypertension 54
Utilisation et rôle des plantes dans le monde et la médecine traditionnelle 55
1. *Carissa edulis* et traitement de l'hypertension 56
1.2. *Carissa edulis* : taxonomie et morphologie 56
1.3. Pertinence ethnopharmacologique et utilisation dans le traitement de l'hypertension artérielle 58
1.4. Etudes pharmacologiques 59
1.4.1. Capacité antioxydante 59
1.4.2. Inhibition de la COX-2 61
1.4.3. Cicatrisation des plaies et potentiel antimicrobien 62
1.4.4. Activité antivirale 63
1.4.5. Activité antidiabétique 64
1.4.6. Activité anti nociceptive 64
1.4.7. Activité anticancéreuse 64
1.4.8. Activité hépato protectrice 65
1.4.10. Propriétés phyto et physico-chimiques des fruits 65
1.5. Criblage phytochimique et molécules isolées 66
1.5.1. Criblage phytochimique 66
1.5.2. Molécules isolées 67
1.6. Etudes de toxicité 71
2. *Diodia scandens* et traitement de l'hypertension 73
2.1. *Diodia scandens* taxonomie et morphologie 73
2.2. *Diodia scandens* pertinence ethnopharmacologique 74
2.3. Etudes pharmacologiques de *Diodia scandens* 75
2.3.1. Propriété antivenimeuse 75
2.3.2. Propriétés anti-inflammatoire et actions analgésiques de l'extrait de *Diodia scandens* 75
2.3.3. Laxatif et agent ocytocique. 75
2.3.4. *Diodia scandens* dans le traitement de l'hypertension 76
2.4. Criblage phytochimique 76
2.5. Etude de toxicité 77
3. *Cleome gynandra* et traitement de l'hypertension 77
3.1. *Cleome gynandra* taxonomie et morphologie 77
3.2. *Cleome gynandra* : pertinence ethnopharmacologique 79
3.3. Etudes pharmacologiques de *Cleome gynandra* 80

3.3.1. Activité anticancéreuse 80
3.3.2. Propriété antiarthritique et antioxydante 80
3.3.3. Activité anti-nociceptive 80
3.3.4. Activité antifongique et antimicrobienne 81
3.3.5. *Cleome gynandra* dans le traitement de l'hypertension 81
3.4. Criblage phytochimique 81
3.5. Etude de toxicité 82
OBJECTIF DE L'ETUDE 83
MATERIEL ET METHODES 85
1. Extraction et identification des métabolites secondaires 86
1.1. Récolte et séchage des plantes 86
1.2. Extraction par macération 86
1.3. Fractionnent par succession de séparation liquide-liquide 86
1.4. Détermination des composés polyphénoliques 87
1.5. Identification des métabolites 88
1.5.1. Analyse par Chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS) 88
1.5.2. Identification des métabolites 90
2. Matériel et méthode des tests biologiques 91
2.1. Etude ex vivo 91
2.1.1. Matériel 91
2.1.2. Réactivité vasculaire 91
2.1.3. Accumulation d'absorption des flavonoïdes ex vivo 92
2.2. Etude in vivo 93
2.2.1. Déclaration éthique 93
2.2.2. Traitement in vivo des rats 93
2.2.3. Études de la réactivité vasculaire 94
2.2.4. Stimulation et modulation de l'absorption des flavonoïdes ex vivo 95
2.2.5. Études d'immunofluorescence 96
2.2.6. Détermination du niveau de stress oxydatif 97
2.2.7. Analyse statistique 97
RESULTATS ET DISCUSSION 98
Résumé article 1 99
1. Materials and Methods 104
1.1 Plant material and extraction 104
1.2. Chemicals and drugs 105
1.3. LC-HRMS analysis 105
1.4. Metabolite identification 106

1.5. Total polyphenols 107
1.6. Vascular reactivity studies 107
1.7. Ex vivo polyphenols uptake experiment 108
2. Results 109
2.1. Total polyphenolic contents 109
2.2. Vasorelaxant effect on porcine coronary artery rings 110
2.3. CEBF inhibits KCl, CaCl2, U46619 and serotonin-induced contractile responses: Role of the endothelial formation of NO 111
2.4. Vasorelaxant effect on rat thoracic aorta 111
2.5. Preferential accumulation of Carissa edulis polyphenols in the endothelium of porcine coronary artery and rat aorta 111
Résumé article 2 126
Introduction 131
1. Materials and Methods 132
1.1. Ethics statement 132
1.2. Preparation of Carissa edulis extract 132
1.3. Chemicals 133
1.4. In vivo treatment of rats 133
1.5. Vascular reactivity studies 133
1.6. Ex vivo evaluation of the vascular uptake of Carissa edulis polyphenols 134
1.7. Immunofluorescence studies 135
1.8. Determination of the level of oxidative stress 136
1.9. Statistical analysis 136
2. Results 137
2.1. CECE treatment improves the age-related endothelial dysfunction in the main mesenteric artery and the thoracic aorta 137
2.2. eNOS-derived NO mediates the improved phenylephrine-induced contractile response and acetylcholine-induced relaxation of middle-aged rats treated by CECE 137
2.3. Accumulation of Carissa edulis polyphenols in the endothelium of the thoracic aorta: Role of Na+/glucose co-transporters 1 and 2 138
2.4. CECE treatment improves the eNOS-NO/ROS balance in the main and resistance mesenteric arteries of middle-aged rats: Role of the local angiotensin system 139
Discussion 140
Conclusion 144
Discussion générale 156
Dysfonction endothéliale liée à l'âge et hypertension 157
Conclusion et perspectives 170
Références bibliographiques 173
Productions scientifiques 205

Liste des figures

Figure 1 : Structure des vaisseaux sanguins (McKinley et al., 2016). 8
Figure 2 : Production du monoxyde d'azote par la NO synthase endothéliale endothéliale (eNOS) et ses actions dans la cellule musculaire lisse vasculaire. 12
Figure 3 : Régulation de la eNOS 14
Figure 4 L'hyperpolarisation dépendante de l'endothélium stimule la dilatation locale 15
Figure 5 : Synthèse de la prostacycline 17
Figure 6 : **Facteurs contractants dérivés de l'endothélium** 19
Figure 7 : Formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène pertinents pour les réponses dépendantes de l'endothélium 20
Figure 8 : **Le rôle de la stimulation des récepteurs AT_1R dans l'hypertension et l'altération d'organes cibles** 22
Figure 9 : La voie de l'acide arachidonique et le rôle de la cyclooxygénase dans la synthèse des prostaglandines. 23
Figure 10 : Principales voies de signalisation médiées par EDCF 25
Figure 11: Modèle de la voie de signalisation ET-1 dans le système vasculaire rénal. 27
Figure 12 : Différents types de modèles animaux pour l'hypertension primaire ou essentielle et secondaire. 31
Figure 13 : Athérogenèse due à une dysfonction endothéliale. 34
Figure 14 : Mécanismes putatifs par lesquels l'hypertension altère la fonction endothéliale 36
Figure 15 : Changement lié à l'âge du système artériel et de la forme d'onde chez le sujet âgé 38
Figure 16 : Un diagramme du lien mécanistique du vieillissement, de la raideur artérielle et de l'hypertension. 39
Figure 17 : Infiltration de cellules inflammatoires et immunitaires dans la paroi et l'espace périvasculaire des artères pulmonaires dans le cas de l'hypertension pulmonaire. 40
Figure 18 : Activation des lymphocytes T par des protéines modifiées par les isocétales 42
Figure 19 : Cellules immunitaires innées et adaptatives qui jouent un rôle dans l'hypertension 44
Figure 20 : Représentation schématique des mécanismes par lesquels les espèces réactives de l'oxygène entraînent une altération de la biodisponibilité de NO et un dysfonctionnement vasculaire 46
Figure 21 : Mécanisme d'action des agents anti-aldostérone 48
Figure 22 : Médicaments ciblant les systèmes classiques et contre-régulateurs du système rénine-angiotensine (RAS). 49
Figure 23 : La voie du système rénine-angiotensine (RAS) cérébral 52
Figure 24 : C. edulis, feuilles oblongues aux épines fourchues acérées 58
Figure 25 : C. edulis, fruits à différents stades de développement 58
Figure 26 : Diagramme schématique des différentes stratégies d'extraction / production et mécanisme de piégeage des radicaux libres des composés phénoliques. 61
Figure 28 : Activités d'inhibition de COX-2 par des fractions ;CE, extrait brut PE, extrait d'éther de pétrole DCM, extrait au dichlorométhane EA, extrait d'acétate d'éthyle et n-BuOH, extrait butanolic de C. edulis 62
Figure 29 : Effet des flavonoïdes sur l'hypertension et les mécanismes sous-jacents 68
Figure 30 : Structures de nouveaux composés, 1–10, isolés de C. edulis 71

Figure 31: Diodia scandens, feuilles http://www.ethnopharmacologia.org 74
Figure 32 : Variation de couleur de la tige et du pétiole de C. gynandra 78

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les isoformes de NOS 13
Tableau 2 : Taxonomie et morphologie de *Carissa edulis* 60

Introduction

Introduction

Un grand nombre d'études ont montré que l'hypertension est associée à un dysfonctionnement des cellules endothéliales. La dysfonction endothéliale étant une altération phénotypique de l'endothélium caractérisée par un état pro-thrombotique, pro-inflammatoire et pro-vasoconstricteur. L'hypertension artérielle est associée à une réduction de 0,62 % de la fonction endothéliale quantifiée par la vasodilatation médiée par le flux (Gonzalez and Selwyn, 2003).

L'HTA est définie de manière consensuelle comme une pression artérielle (PA) ≥ 140 /90 mm Hg mesurée en consultation et persistant dans le temps. La prévalence de ce facteur de risque des maladies cardiovasculaires a augmenté, en particulier dans les pays à revenu faible et intermédiaire (PRFI) dont le Bénin, où en moyenne environ un adulte sur trois est hypertendu (Mills et al., 2020; Sarki et al., 2015). En effet, des études menées en 2008 dans les 12 départements du Bénin sur 6853 personnes âgées de 25 à 64 ans ont montré que la prévalence de l'HTA était de 27,9 % (Houinato et al., 2012). D'autres études ont été réalisées plutard en 2015 sur 1777 personnes âgées de plus de 25 ans dans la population de Tanvè, une zone rurale située à 150 km au nord de Cotonou et sur 717 personnes âgées de 18 à 64 ans dans la région Atlantique du Bénin. Ces études ont montré une prévalence de l'HTA de 32,9 % dans la population de Tanvè et de 33,9 % dans la région atlantique (Desormais et al., 2019 ; Houssou et al., 2020).

L'HTA est une pathologie considérée comme muette au Bénin, car de nombreux patients éloignés des centres de soins ne bénéficient pas d'un diagnostic précoce. Souvent cette pathologie est révélée lors d'accidents cardiovasculaires tels que l'insuffisance cardiaque, l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral (AVC) ou d'accidents rénaux tel que l'insuffisance rénale, avec parfois des issues fatales.

Les plantes médicinales jouent toujours un rôle important dans les soins de santé primaires de nombreux pays d'Afrique subsaharienne pour diverses raisons liées au manque de services de santé et aux besoins de conservation des normes culturelles et croyances traditionnelles.

Le Bénin dispose d'une flore assez riche et diversifiée à laquelle s'ajoute une pharmacopée et une médecine traditionnelle aux pratiques séculaires. Plusieurs plantes sont considérées comme ayant des propriétés antihypertensives et les populations locales les utilisent très souvent du fait de leurs accessibilités et de leurs couts moins onéreux comparativement à la thérapeutique moderne difficilement accessible aux populations et caractérisée par la cherté des médicaments. Une enquête ethnobotanique menée au Bénin dans les régions du Zou et de la Colline en février 2015 a permis de recenser douze plantes traditionnellement utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle par la population mais dont on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique après consultation des diverses banques de données. L'analyse phytochimique et le screening biologique de ces plantes ont permis d'identifier les deux plus actives : *Carissa edulis* et *Diodia scandens.*

Pour notre étude, nous nous sommes intéressés à ces deux plantes médicinales auxquelles nous avons ajouté *Cleome gynandra* qui, de plus en plus, est également utilisé dans certaines régions du Bénin. C. edulis est un arbuste épineux vivace de la famille des Apocynaceae, répandu en Afrique, en Australie, au Vietnam, au Yémen et en Inde. D. scandens de la famille des Rubiaceae est une herbe vivace à feuilles persistantes qui ont un arrangement alternatif. C. gynandra est une plante de la famille des Capparaceae qui pousse dans la plupart des pays tropicaux.

La première partie du présent manuscrit est consacrée à l'état de l'art qui est subdivisé en trois chapitres et dans lequel nous faisons une présentation de l'endothélium vasculaire suivi de la

dysfonction endothéliale associée à l'hypertension et enfin une bibliographie des trois plantes béninoises à usage antipaludique sélectionnées pour cette étude.

La deuxième partie de notre thèse concerne l'expérimentation, avec une présentation des techniques d'extraction du matériel végétal et des différentes méthodes d'analyse utilisées au cours de ce travail.

La troisième partie présente sous forme d'article les résultats obtenus qui seront suivis d'une discussion et d'une conclusion générales.

ETAT DE L'ART

Chapitre 1 : Endothélium vasculaire

1. Anatomie générale des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins naturels sont classés en trois catégories, à savoir les artères, les veines et les capillaires. Le sang oxygéné est transporté du cœur vers les tissus de l'organisme grâce aux artères, tandis que le sang pauvre en oxygène et riche en gaz carbonique, effectue son voyage de retour, des organes vers le cœur grâce aux veines. Artériole est le nom de l'artère de petit diamètre et vénule est le nom de la veine de petit diamètre. Les capillaires relient les artères et les artérioles avec les veines et les vénules, et ils transfèrent également les gaz et les nutriments du sang vers les tissus et vice versa (Awad et al., 2018).

Les vaisseaux sanguins sont généralement composés de trois couches concentriques : la couche interne, la couche intermédiaire et la couche externe. La couche interne ou intima se compose de cellules endothéliales squameuses tapissant la surface intérieure du vaisseau et de la membrane élastique interne. La couche moyenne ou média abrite les cellules musculaires lisses et la membrane élastique externe. La couche externe ou adventicia se compose de cellules tissulaires adipeuses périvasculaires, de fibroblastes, de fibres de collagène et de terminaisons nerveuses ; elle relie le vaisseau sanguin au tissu conjonctif environnant (Eble and Niland, 2009; Medvedev et al., 2006) (Figure 1).

L'épaisseur et la structure de chaque couche diffèrent selon la taille et l'emplacement des vaisseaux sanguins. Les grandes artères contiennent un plus grand nombre de fibres élastiques tandis que les artères musculaires contiennent un plus grand nombre de cellules musculaires lisses. Les capillaires ne contiennent que la couche endothéliale et une membrane basale avec le tissu conjonctif (Pais et al., 2010).

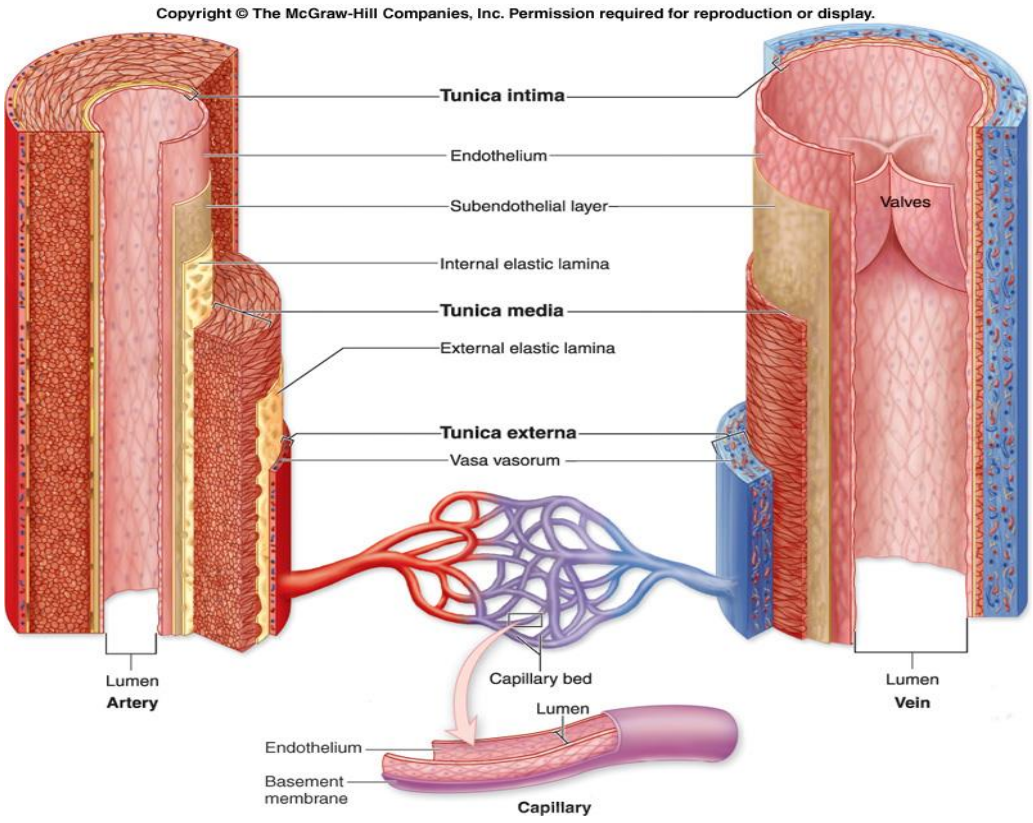


Figure 1 : Structure des vaisseaux sanguins (McKinley et al., 2016).

2. Rôle de l'endothélium dans la régulation du tonus vasculaire

En 1980, Furchgott et Zawadzki ont démontré le phénomène de relaxation artérielle dépendante de l'endothélium. L'acétylcholine induit la relaxation dans les anneaux d'artères en libérant le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF) qui stimule la guanylyl cyclase soluble responsable de la conversion de GTP en GMP cyclique. Plus tard, l'EDRF a été identifié comme étant le monoxyde d'azote (NO) (Arnal et al., 1999). Le NO diffuse de l'endothélium vers le muscle lisse sous-jacent où il active la guanylyl cyclase soluble ; ce qui entraine une augmentation du GMP cyclique intracellulaire et la relaxation du vaisseau sanguin (Gryglewski et al., 1986; Rubanyi and Vanhoutte, 1986a).

L'affirmation "Vous avez l'âge de votre endothélium" est attribuée au Dr Rudolf Altschul, ancien chef du département d'anatomie et de biologie cellulaire de l'université de Saskatchewan, au Canada, mais elle a été reprise par de nombreuses autres personnes et reflète

les importantes contributions de l'endothélium à la physiologie et à la physiopathologie cardiovasculaires (Altschul, 1954).

L'endothélium joue un rôle majeur dans la régulation du tonus vasculaire en impliquant plusieurs mécanismes. De plus, différents médiateurs régulant le tonus vasculaire sont dérivés de l'endothélium (Klein, 2013; Schalkwijk and Stehouwer, 2005). Les cellules endothéliales détectent les stimuli mécaniques, tels que les variations de pression et les forces de cisaillement, et les stimuli hormonaux, tels que les substances vasoactives. Elles libèrent des agents qui régulent la fonction vasomotrice, déclenchent des processus inflammatoires, interviennent dans la mitogenèse, l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire, l'équilibre des fluides et elles participent activement et de manière réactive à l'hémostase. (Sacerdoti et al., 2015). L'endothélium intervient dans la régulation du flux sanguin et de l'homéostasie en libérant des molécules bioactives: les vasoconstricteurs (l'angiotensine II, les espèces réactives de l'oxygène, l'endothéline, les prostanoïdes vasoconstricteurs) et les vasodilatateurs (NO, prostacycline, facteurs hyperpolarisant dérivés de l'endothélium) en réponse à divers neurotransmetteurs, hormones, composés vasoactifs et stimuli mécaniques (Sandoo et al., 2010). L'altération de la régulation endothéliale de l'homéostasie vasculaire entraine une dysfonction endothéliale qui contribue au développement des maladies cardio-vasculaires (MCVs) pouvant entraîner des complications cardiovasculaires majeures comme le syndrome coronaire aigu, l'accident vasculaire cérébral, ou les artérites périphériques (Lerman and Zeiher, 2005).

2.1. Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF)

2.1.1. Le monoxyde d'azote (NO)

Le NO est un puissant facteur vasodilatateur généré par l'endothélium et diminuant le tonus du muscle lisse vasculaire sous-jacent. C'est une molécule labile dont la synthèse est catalysée par l'enzyme NO synthase endothéliale (eNOS) à partir de L-arginine. La eNOS a

besoin de plusieurs cofacteurs pour l'oxydation inhabituelle de cinq électrons d'un azote du groupe guanidine de L-arginine. Trois isoformes de la NOS ont été identifiés : NOS endothélial (eNOS), NOS neuronal (nNOS), et une forme inductible (iNOS) qui peut être exprimée dans le muscle lisse vasculaire après exposition à l'endotoxine et aux cytokines pro-inflammatoires (Tableau 1). Les analogues de la L-arginine se sont avérés utiles en tant qu'outils pharmacologiques pour inhiber les actions de la NOS et réduire la synthèse du NO (Arnal et al., 1999; Joyner and Dietz, 1997; Moncada et al., 1989).

La eNOS inactive est liée à la cavéoline et se trouve dans de petites invaginations de la membrane cellulaire appelées caveolae (Bucci et al., 2000; Michel and Feron, 1997). Lorsque les niveaux intracellulaires de Ca^{2+} augmentent, la eNOS se détache de la cavéoline et est active (Bucci et al., 2000). Les inducteurs de la formation de NO tels que la bradykinine (BK), l'acétylcholine (ACh), l'adénosine triphosphate (ATP), l'adénosine diphosphate (ADP), la substance P et la thrombine peuvent stimuler la séparation de la eNOS et de la cavéoline en libérant le Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (Moncada and Higgs, 2006). Une fois que les réserves intracellulaires Ca^{2+} sont épuisées, un signal (jusqu'à présent non identifié) est envoyé aux récepteurs membranaires pour ouvrir les canaux Ca^{2+} permettant au Ca^{2+} extracellulaire d'entrer dans la cellule (Putney Jr, 1986 ; Schilling et al., 1992 ; Schilling and Elliott, 1992). Ce processus est connu sous le nom de « store-operated Ca^{2+} entry ». Le Ca^{2+} s'attache à la calmoduline protéique dans le cytoplasme de la cellule et la calmoduline se lie ensuite de manière réversible à la eNOS, ce qui permet aux électrons dérivés du NADPH d'être transférés sur le groupe hème de la NO synthase (Abu-Soud and Stuehr, 1993; Fleming and Busse, 1999). La eNOS convertit ensuite la L-arginine en NO (Palmer et al., 1988a). Il est important de souligner que ce mécanisme de production du NO dépend des niveaux de Ca^{2+} intracellulaire dans le réticulum endoplasmique ainsi que du Ca^{2+} qui diffuse dans la cellule à partir des réserves extracellulaires. Une réduction du Ca^{2+} entraîne la dissociation du complexe calcium-

calmoduline de la eNOS, qui se lie à son tour à la cavéoline et devient inactivée (Sandoo et al., 2010).

Le NO diffuse librement dans le muscle lisse sous-jacent où il active la guanylyl cyclase soluble (sGC). L'enzyme maintenant activée augmente le taux de conversion de la guanosine triphosphate (GTP) en GMPc qui interagit à son tour avec la PKG. La PKG diminue le Ca^{2+} cytosolique libre en inhibant la libération de l'inositol triphosphate (IP3) du réticulum sarcoplasmique et son influx depuis les espaces extracellulaires *via* l'activation du canal BK_{Ca}^{2+}(Furchgott and Vanhoutte, 1989) La PKG facilite également l'absorption du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique (RS) par la phosphorylation du phospholamban (une protéine de la membrane du RS) qui active à son tour la calcium-ATPase du RS (Gao, 2010). Cette déplétion du Ca^{2+} cytosolique dans le RS diminue l'activité de la kinase de la chaîne légère de myosine dépendante du calcium (MLCK), ce qui entraîne l'interruption du processus contractile et la relaxation du muscle lisse vasculaire (Zhao et al., 2015) (Figure 2)

Tableau 1 : Les isoformes de NOS (Huang, 2009)

	Type 1 NOS	Type 2 NOS	Type 3 NOS
Common name	nNOS	iNOS	eNOS
Cell type	Neurons	Macrophages	Endothelium
Chromosome	12	17	7
Expression pattern	Constitutive	Inducible	Constitutive
Intracellular location	Soluble, sarcolemma	Soluble	Caveolae (membrane-associated)
Localization	N-terminal PDZ domain	N/A	N-terminal myristoylation
Regulation	Calcium-CaM	Transcription	Calcium-CaM Phosphorylation
Output	Moderate (nM to μM)	High (μM)	Low (pM to nM)
Function	Signaling	Toxin	Signaling
Biological processes	Learning/memory Neurotransmission Autonomic functions	Inflammation Immune defense	Vasodilation Cell proliferation Leukocyte adhesion Thrombosis
Phenotype of knockout mice	Normal central nervous system development Pyloric stenosis Resistance to stroke	Susceptibility to infections Resistance to septic hypotension	Absence of EDRF Hypertension Increased vascular response to injury Increased atherosclerosis

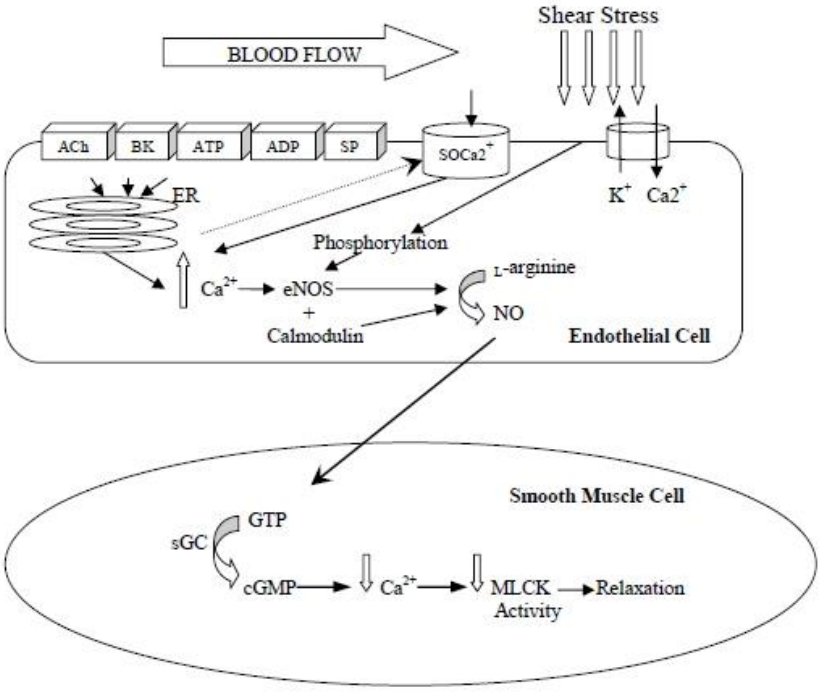


Figure 2 : Production du monoxyde d'azote par la NO synthase endothéliale endothéliale (eNOS) et ses actions dans la cellule musculaire lisse vasculaire (Sandoo et al., 2010). ACh= acétylcholine ; BK= bradykinine ; ATP= adénosine triphosphate ; ADP= adénosine diphosphate ; SP= substance P ; $SOCa^{2+}$= Canal calcique de réserve ; ER= réticulum endoplasmic ; NO= monoxyde d'azote ; sGC= Guanylyl cyclase soluble ; cGMP= guanosine-3', 5-monophosphate cyclic ; MLCK= kinase de la chaîne légère de la myosine.

La régulation complexe de la eNOS se produit à plusieurs niveaux. Les niveaux de l'ARNm-eNOS sont contrôlés aux phases transcriptionnelles et post-transcriptionnelles, et les mécanismes épigénétiques semblent moduler l'expression tissulaire spécifique de la eNOS (Dudzinski and Michel, 2007). En effet, les cellules endothéliales expriment constitutivement la eNOS et comme pour d'autres protéines constitutivement exprimées, le promoteur de la eNOS n'a pas la boîte TATA typique. Mais il a d'autres séquences multiples cis-régulation de l'ADN comme la protéine SP-1, la protéine GATA, la protéine activatrice-1, la protéine activatrice-2, le facteur nucléaire-1, les éléments de réponse au stress et les éléments de régulation du stérol (Chatterjee and Catravas, 2008). Les niveaux de transcriptions de la eNOS sont modifiés par le stress (Davis et al., 2001; Woodman et al., 2005), l'exercice (Sessa et al., 1994; Yang et al., 2002) et l'hypoxie (Le Cras et al., 1996). La transcription de la eNOS chez

l'humain est contrôlée par deux domaines de régulation : les domaines de régulation positifs I et II (PRD I, PRD II). Ces domaines lient différents types de facteurs qui régulent la transcription de la eNOS par interaction des complexes cis et trans (Searles, 2006). Les domaines de régulation contiennent également les nucléotides différemment méthylés qui restreignent la transcription de la eNOS en grande partie dans les cellules endothéliales vasculaires (Chan et al., 2004). Le contrôle post-transcriptionnel de l'ARNm de la eNOS est médié par des éléments d'ARN à action cis situés dans des régions non traduites 5′- et 3′-ARNm (5′-UTR et 3′-UTR). Il dépend d'une combinaison des structures primaires et secondaires de ces éléments d'ARN et de leur reconnaissance par des protéines de liaison à l'ARN à action trans.

L'activité enzymatique de la eNOS et sa localisation subcellulaire sont intimement commandées par des modifications post-translationnelles comprenant l'acylation des acides gras, la disponibilité du substrat et du cofacteur, le degré de phosphorylation, la s-nitrosylation, l'acétylation et les interactions protéine-protéine (Qian and Fulton, 2013). Les multiples stimuli extracellulaires affectant la fonction de la eNOS coordonnent leurs efforts grâce à ces modifications clés pour contrôler dynamiquement l'activité de la eNOS et la biodisponibilité du NO dans la paroi du vaisseau sanguin (Dudzinski and Michel, 2007) (Figure 3).

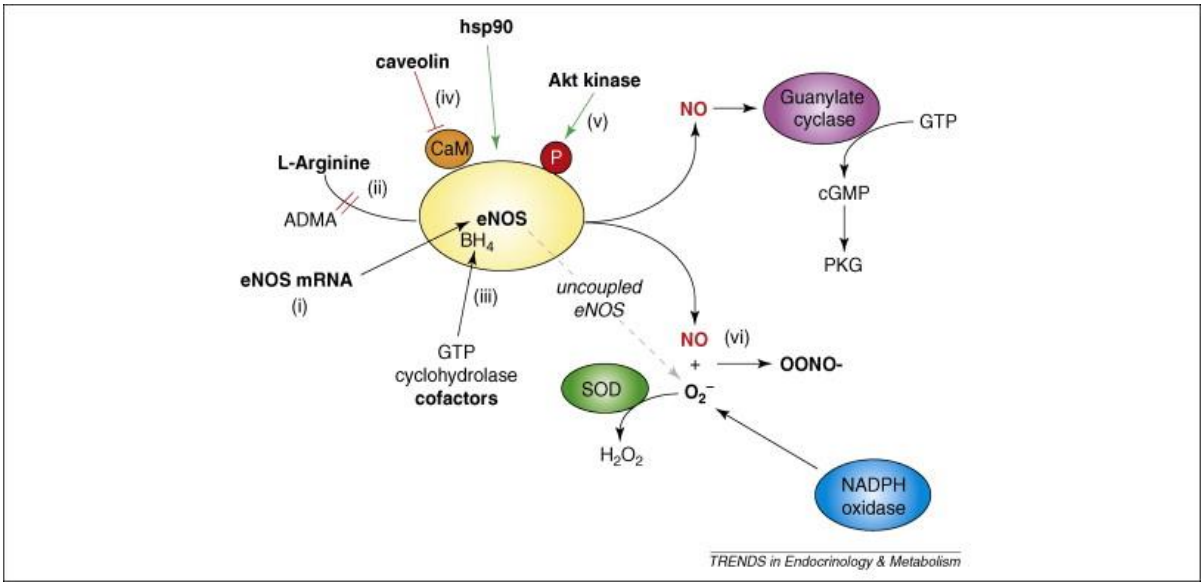


Figure 3 : Régulation de la eNOS (Huang, 2009). La eNOS peut être affectée à plusieurs niveaux, y compris (i) l'ARNm eNOS ou l'expression protéique; (ii) la disponibilité de L-arginine, son substrat, qui pourrait être concurrencé par l'ADMA; iii) la disponibilité de ses cofacteurs, dont le BH4, pour lequel GTP cyclohydrolase catalyse l'étape limitant sa formation ; iv) les interactions protéine-protéine, par exemple avec la cavéoline (inhibiteur; rouge) ou hsp90 (stimulant; vert); v) les modifications post-translationnelles, telles que la phosphorylation de la S1177 par Akt et d'autres kinases (stimulantes; vertes); et (vi) la réaction du NO avec l'anion superoxyde pour donner l'anion peroxynitrite. ADMA, diméthyl arginine asymétrique ; BH4, tétrahydrobioptérine ; eNOS, oxide nitrique synthase endothéliale ; GTP, guanosine 5′-triphosphate ; hsp90, protéine de choc thermique 90 ; NO, monoxyde d'azote ; O_2^-, anion superoxyde ; OONO−, anion peroxynitrite; PKG, protéine kinase G ; SOD, superoxyde dismutase.

2.1.2. L'hyperpolarisation dérivée de l'endothélium (EDH)

L'EDH induit une vasorelaxation qui résiste aux inhibiteurs L-nitroarginine méthyl ester (LNAME) et indométacine (inhibiteurs de l'eNOS et des cyclooxygénases, respectivement) (Takaki et al., 2008). L'EDH n'est pas un agent unique, mais plutôt un groupe de facteurs diffusibles (ions K+, H_2O_2, H_2S, CO, ROS, différents peptides et dérivés de la voie COX, LOX et cytochrome p-450) influençant l'action de différents canaux K+ provoquant l'hyperpolarisation des SMCs (El Assar De La Fuente et al., 2012). La nature chimique et la puissance de l'EDH dépendent de la localisation et de la taille des différentes artères. En effet, la contribution de l'EDH à la régulation du tonus vasculaire augmente lorsque le diamètre de

l'artère diminue (Leung and Vanhoutte, 2017). L'EDH fonctionne principalement par deux voies, la voie diffusible et celle médiée par le contact.

Le mécanisme diffusible est caractérisé par la diffusion de différents agents (ions K+, acides époxy eicosatriénoïques (EET), peptide natriurétique de type C, H_2O_2 et H_2S) des CEs vers les SMC adjacents, ce qui entraîne l'activation du canal BK_{Ca}^{2+} et rend les SMC hyperpolarisés (Goto et al., 2018).

Le mécanisme médié par le contact implique quant à lui l'activation des canaux SK_{Ca}^{2+} et IK_{Ca}^{2+} en réponse à l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire dans les CE et le transfert direct de l'hyperpolarisation des CE aux SMC via les jonctions gap myoendothéliales (MEGJs) (Félétou and Vanhoutte, 2009; Goto et al., 2018). En effet, l'activation des canaux SK_{Ca}^{2+} et IK_{Ca}^{2+} dans les cellules endothéliales entraîne une hyperpolarisation des CE en augmentant les ions K^+ dans l'espace extracellulaire entre l'endothélium et les SMCs, activant ainsi les canaux K^+ à redressement vers l'intérieur (Kir) et la Na^+/K^+-ATPase, ce qui rend les SMCs hyperpolarisées (Garland et al., 2011) (Figure 4).

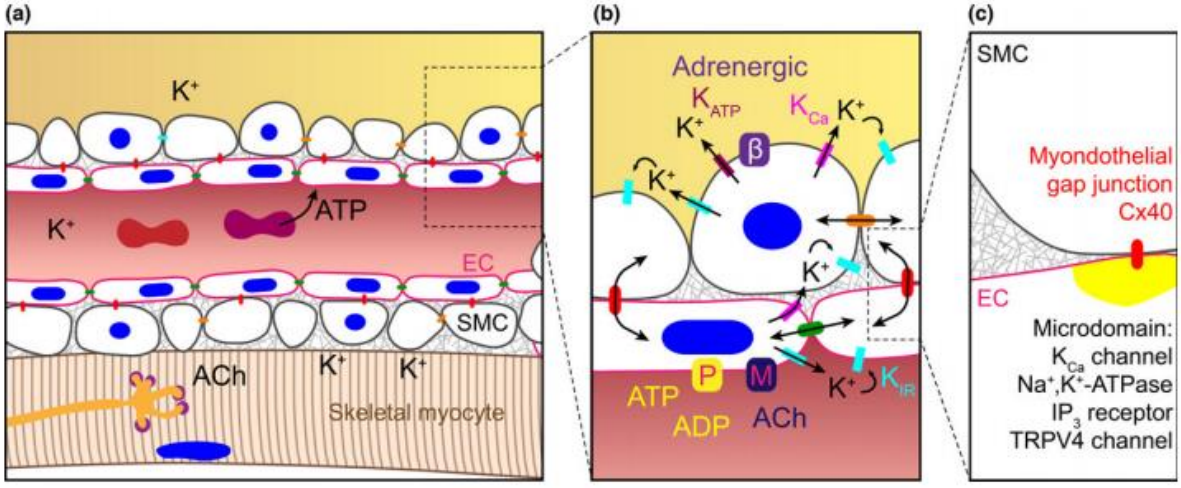


Figure 4 L'hyperpolarisation dépendante de l'endothélium stimule la dilatation locale (Garland and Dora, 2017). Les agonistes libérés de manière autocrine ou paracrine activent les récepteurs des cellules endothéliales (EC) pour stimuler l'EDH (a, b). Dans les exemples d'ACh, ATP et ADP, chacun lie son récepteur couplé aux protéines G associé à la formation d'IP3 pour la libération de Ca^{2+}, et l'afflux de Ca^{2+}. Les canaux KCa sont activés ; en particulier, les canaux IKCa alignés dans le microdomaine myoendothélial [dessiné en jaune dans le panneau (c)]. Le passage du courant via les jonctions gap myoendothéliales (MEGJs) ou la diffusion d'un facteur tel que le K^+ peut hyperpolariser les cellules musculaires lisses (SMCs), fermer les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants et relâcher les cellules. Certains agonistes se lient

aux récepteurs des SMCs pour stimuler l'hyperpolarisation ; par exemple, les catécholamines stimulent les b-adrénocepteurs qui se couplent via la PKA aux canaux K_{ATP}. L'hyperpolarisation dépendante des EC et des SMCs peut conduire à une dilatation médiée, dans les artères et artérioles où les jonctions gap homo- et hétérocellulaires sont patentes et où l'endothélium peut servir de conduit pour le passage du courant (b). Dans tous les cas, le K^+ libéré par les cellules peut agir sur les canaux K_{IR} et stimuler le Na^+, K^+-ATPase, chacun d'eux stimulant une hyperpolarisation supplémentaire. EC, cellules endothéliales ; SMC, Cellule musculaire lisse ; K_{ATP}, Canal potassique sensible à l'ATP ; K_{Ca}, Calcium-activated potassium channel ; K_{IR}, inwardly rectifying potassium channel.

2.1.3. La prostaglandine (PGI_2)

En 1976, alors qu'ils recherchaient l'enzyme qui génère un prostanoïde instable le thromboxane A_2 (TXA_2) à partir d'acide arachidonique (AA), Moncada et al. ont découvert la prostaglandine I_2 (PGI_2) et l'ont rebaptisé prostacycline (Moncada et al., 1976). La prostacycline fait donc partie de la famille des médiateurs lipidiques de la prostaglandine dérivée de l'acide arachidonique, « la cascade d'acide arachidonique », dont il y a maintenant environ 90 membres (Vane and Botting, 1995). Il est le principal produit de la cyclooxygénase (COX) qui catalyse le métabolisme de l'acide arachidonique dans l'endothélium vasculaire (Cheng et al., 2002a). C'est un puissant inhibiteur de l'activation des plaquettes par tous les agonistes reconnus et un vasodilatateur.

La première étape de la synthèse de la prostacycline consiste à libérer l'acide arachidonique. L'acide arachidonique n'est normalement pas libre dans les cellules mais acétylé dans les membranes phospholipidiques. La voie la mieux étudiée pour la libération de l'acide arachidonique implique la phospholipase A_2 (PLA_2) (Figure 5). Il existe de multiples formes de phospholipase A_2 ; mais les formes cytosoliques ($cPLA_2$) et, dans certaines circonstances, les PLA_2 indépendant du calcium ($iPLA_2$) conduisent à la libération de l'acide arachidonique dans les cellules endothéliales (Mitchell et al., 2015). L'acide arachidonique peut également être libéré par une deuxième voie. Après que la phospholipase C clive un groupe d'inositol triphosphate, donnant le diacylglycérol (DAG), il peut alors être hydrolysé par les lipases en monoacylglycérol et ensuite libérer l'acide arachidonique et le glycérol (Mitchell et al., 2015).

La deuxième étape dans la formation de prostacycline est le métabolisme de l'acide arachidonique par la COX en deux étapes. Premièrement, l'acide arachidonique est converti en PGG_2 par une réaction d'oxygénase, puis dans la deuxième étape, en PGH_2 par une réaction de peroxydase. La troisième et dernière étape de la synthèse de la prostacycline est le métabolisme de PGH_2 par la prostaglandine synthase (PGIS) (Chlopicki and Gryglewski, 2004).

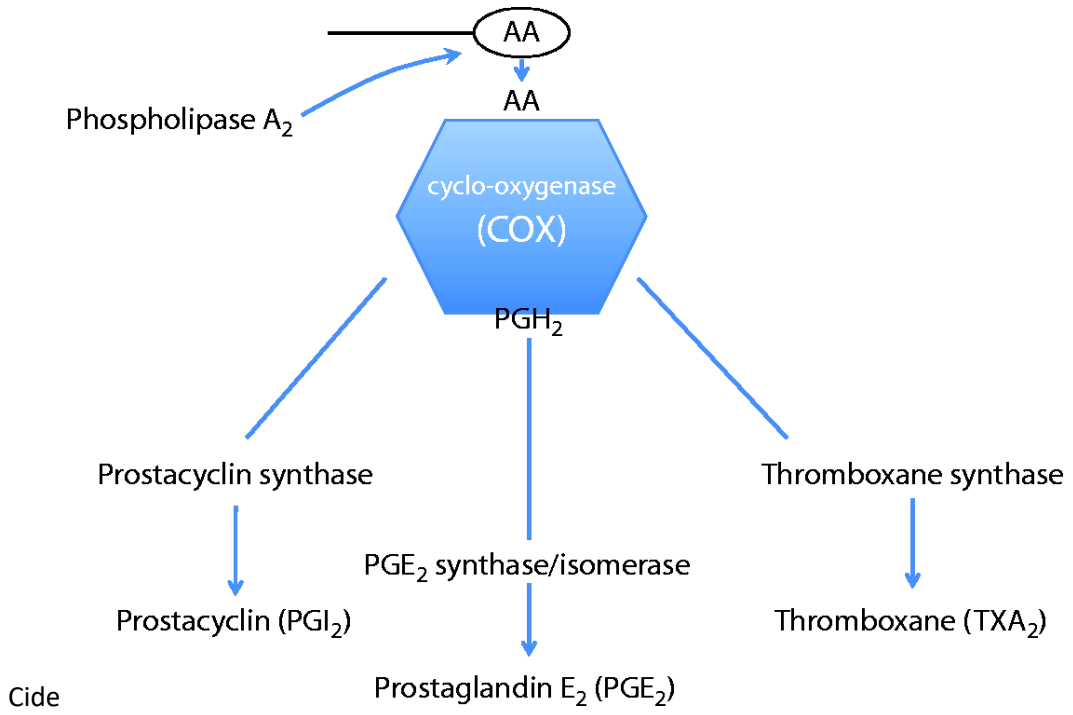


Figure 5 : Synthèse de la prostacycline (Mitchell et al., 2015). La prostacycline (PGI_2) est synthétisée à partir de l'acide arachidonique (AA) par les actions concertées des enzymes cyclo-oxygénase (COX) et prostacycline synthase. AA est libéré des phospholipides plasmatiques par des enzymes phospholipases où il est métabolisé en prostaglandine (PG)H_2 par les COX. PGH_2 est ensuite métabolisé par la prostacycline synthase en PGI_2, par la PGE_2 synthases/isomérases en PGE_2 ou par le thromboxane synthase en thromboxane (TXA_2).

La prostacycline est une hormone cardioprotectrice centrale. Ses principaux effets sont l'inhibition de l'activation des plaquettes réduisant ainsi le risque de thrombose, la vasodilatation, la réduction du remodelage vasculaire des cellules musculaires lisses, l'absorption du cholestérol par stimulation de la cholestérol ester hydrolase (l'enzyme qui convertit l'ester de cholesterol en cholestérol libre pour le mobiliser hors des cellules) , la gastroprotection, et l'athéroprotection par l'inhibition de l'adhérence des cellules tumorales (Nakayama, 2006). L'activité vasodilatatrice de la prostacycline est médiée par le récepteur

couplé à la protéine G de surface cellulaire spécifique aux tissus, le récepteur IP (Coleman, 1994; Hirata and Narumiya, 2011; Woodward et al., 2011). Dans le compartiment extracellulaire, la prostacycline se lie au récepteur IP et l'active ; le récepteur de la prostacycline se couple principalement à la protéine Gαs hétérotrimérique, ce qui conduit à l'activation de l'adénylyl cyclase, à l'accumulation du second messager AMPc et à l'activation de son principal effecteur intracellulaire, la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA), provoquant ainsi une relaxation du muscle (Coleman, 1994; Kukovetz et al., 1979; Pluchart et al., 2017).

2.2. Les facteurs contractants dérivés de l'endothélium (EDCF)

L'endothélium peut moduler le tonus du muscle lisse vasculaire sous-jacent par la synthèse et la libération de puissants vasorelaxants (facteurs relaxants dérivés de l'endothélium ; EDRF) et de facteurs vasoconstricteurs (facteurs contractants dérivés de l'endothélium ; EDCF). Sous divers stimuli physiques et chimiques tels que la noradrénaline, la thrombine, l'hypoxie, l'étirement mécanique et les hormones circulantes (De Mey and Vanhoutte, 1983, 1982; Rubanyi and Vanhoutte, 1986b), les cellules endothéliales peuvent produire des facteurs contractants tels que : le thromboxane A_2 (TXA_2), la prostacycline (PGI_2), les espèces réactives de l'oxygène, l'Endothéline-1 (ET1) et l'Angiotensine II (Ang II) (Lüscher et al., 1992; Puddu et al., 2000; Vanhoutte et al., 2005) (Figure 6).

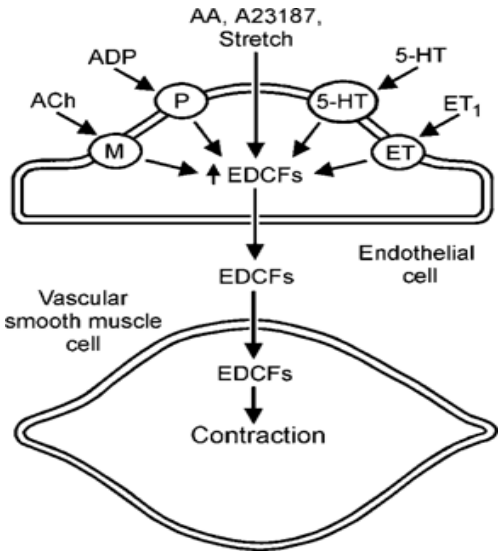


Figure 6 : **Facteurs contractants dérivés de l'endothélium** (Vanhoutte et al., 2005). Dans certaines conditions, les cellules endothéliales, lorsqu'elles sont activées par des médiateurs neurohumoraux, soumises à un étirement soudain ou exposées à l'ionophore Ca^{2+} A23187, libèrent une ou plusieurs facteurs vasoconstricteurs, appelés facteurs contractants dérivés de l'endothélium (EDCF), qui diffusent vers le muscle lisse vasculaire sous-jacent et initient sa contraction. AA = acid arachidonique, ACh = acétylcholine, ADP = adénosine diphosphate, ET = endothéline, 5-HT = 5-hydroxytryptamine, M= récepteur muscarinique, P= purinocepteur.

2.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et le stress oxydatif

Dans des conditions physiologiques normales, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont les sous-produits du métabolisme en condition aérobie et sont des molécules de signalisation importantes dans les processus biologiques pour le fonctionnement normal des cellules. Les ROS incluent l'anion superoxyde ($O_2^{-\bullet}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^-) (Schieber and Chandel, 2014). Les principaux effets des ROS comprennent la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire, la modulation de la production et de la dégradation de la matrice extracellulaire, l'inactivation du NO et la stimulation de nombreuses kinases sensibles aux stress oxydant (Paravicini and Touyz, 2006).

Les ROS sont produits par tous les types de cellules vasculaires, y compris les cellules endothéliales, musculaires lisses et elles peuvent être formés par de nombreuses enzymes. Les ROS intracellulaires proviennent de plusieurs sources, y compris la chaîne mitochondriale de

transport d'électrons, les cytochrome P-450 oxygénases, la xanthine oxydase (XO), les lipoxygénases, les cyclooxygénases, la NOS non couplée et la NADPH oxydase (Paravicini and Touyz, 2006; Zinkevich and Gutterman, 2011) (Figure 7).

Le terme « stress oxydatif » est définit comme étant un déséquilibre entre des niveaux de ROS chroniquement élevés et des antioxydants. Déséquilibre qui est associé à des maladies cardiovasculaires. Les ROS agissent directement comme EDCF ou potentialisent indirectement les réponses médiées par l'EDCF en réduisant la biodisponibilité du NO et en activant la COX dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Wong and Vanhoutte, 2010). Les anions superoxydes peuvent indirectement amplifier les réponses médiées par EDCF en réduisant la biodisponibilité du NO (Macarthur et al., 2008). En effet, ils réagissent chimiquement avec le NO, entraînant la formation de peroxynitrites oxydants puissants qui présentent un large éventail d'effets dommageables pour les tissus, notamment la peroxydation des lipides, l'inactivation des enzymes et des canaux ioniques par l'oxydation et la nitration des protéines, et l'inhibition de la respiration mitochondriale. (Félétou et al., 2012).

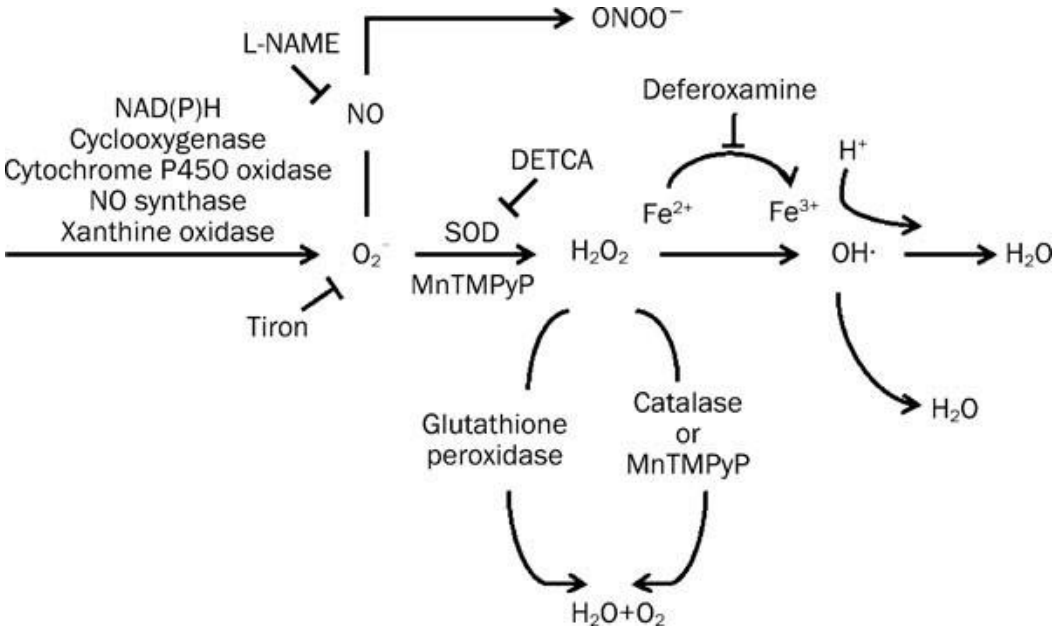


Figure 7 : Formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène pertinents pour les réponses dépendantes de l'endothélium (Wong and Vanhoutte, 2010). Les anions superoxyde (O^{2-}) peuvent être générés à partir de l'oxygène moléculaire par l'action de

diverses enzymes. O^{2-} peut réagir avec NO pour former du peroxynitrites ($ONOO^-$). Il peut également être converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase (SOD). H_2O_2 peut être transformé en radicaux hydroxyles par des ions ferreux ou converti en H_2O par la catalase et le glutathion. Tiron élimine l'O_2^- à l'intérieur des cellules. DETCA inhibe la SOD. La déféroxamine est un chélateur du fer qui élimine les radicaux hydroxyles. L-NAME inhibe NO synthase. MnTMPyP est un mimétique superoxyde dismutase/catalase. DETCA = acide diéthyldithiocarbamique ; GSH = glutathion ; GSSG = disulfure de glutathion ; L-NAME = N^{ω}-nitro-L-arginine méthyl ester ; MnTMPyP = Mn (III)tétrakis(1-méthyl-4-pyridyl) porphyrine ; NO = monoxyde d'azote ; tiron = Acide 4,5-dihydroxy-1,3-benzène disulfonique.

2.2.2. L'Angiotensine II (Ang II)

Le système rénine-angiotensine (RAS) inclut l'angiotensinogène synthétisé par le foie qui est converti en Angiotensine I par la rénine, une protéase principalement produite à partir des cellules juxta-glomérulaires du rein. L'enzyme de conversion de l'Ang I (ACE), une dipeptidyl carboxypeptidase principalement produite par les cellules endothéliales au niveau du poumon, hydrolyse l'Ang I en Ang II (Arumugam et al., 2016). L'angiotensine II est une hormone pléiotrope qui influence la fonction de nombreux types de cellules et régule de nombreux systèmes ; c'est la principale hormone effectrice du système rénine-angiotensine. Dans le système cardiovasculaire, c'est un vasoconstricteur puissant qui augmente la résistance vasculaire périphérique et élève la pression artérielle (Nguyen Dinh Cat and Touyz, 2011). L'angiotensine II agit principalement en activant deux récepteurs différents : AT_1R et AT_2R. Le récepteur sensible au losartan a été appelé récepteur AT_1R (récepteur de l'angiotensine II de type 1). C'est un GPCR hétérotrimérique (récepteur couplé à la protéine G) car il génère de l'IP3 et du diacylglycérol, entraînant respectivement une élévation intracellulaire du Ca^{2+} et une activation de la protéine kinase C tandis que le récepteur insensible au losartan a été appelé récepteur AT_2R ; son couplage aux protéines G reste incertain (Eguchi Satoru et al., 2018). Le récepteur AT_1R est responsable de la plupart des effets connus de l'Ang II, qui comprennent la vasoconstriction, la croissance cellulaire, la génération du stress oxydatif et de l'inflammation, l'hypertrophie vasculaire et cardiaque et la stimulation de la sécrétion d'aldostérone entre autres (Iwai and Horiuchi, 2009) (Figure 8). L'action vasoconstrictrice de l'AT_1R est médiée par l'activation des canaux Ca^{2+} voltage dépendant, de la phospholipase C (PLC), de la

phospholipase D (PLD) et de la phospholipase A_2 (PLA_2). De plus, le récepteur AT_1R active la cascade de kinases régulées par le signal extracellulaire (ERK), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PGRF), le facteur de croissance épidermique (EGRF), la voie du récepteur de l'insuline, les tyrosines kinases et la voie MAPK liée à la famille des protéines Src, la tyrosine kinase 2 riche en proline, la kinase d'adhésion focale et les Janus kinases (JAK). Une production accrue de ROS est également associée à l'AT_1R via l'activation de la NADPH oxydase (Touyz and Schiffrin, 2000)

Le récepteur AT_2R quant à lui est fortement exprimé dans le fœtus en développement, mais son expression est très faible dans le système cardiovasculaire du sujet adulte (Lemarié and Schiffrin, 2010).

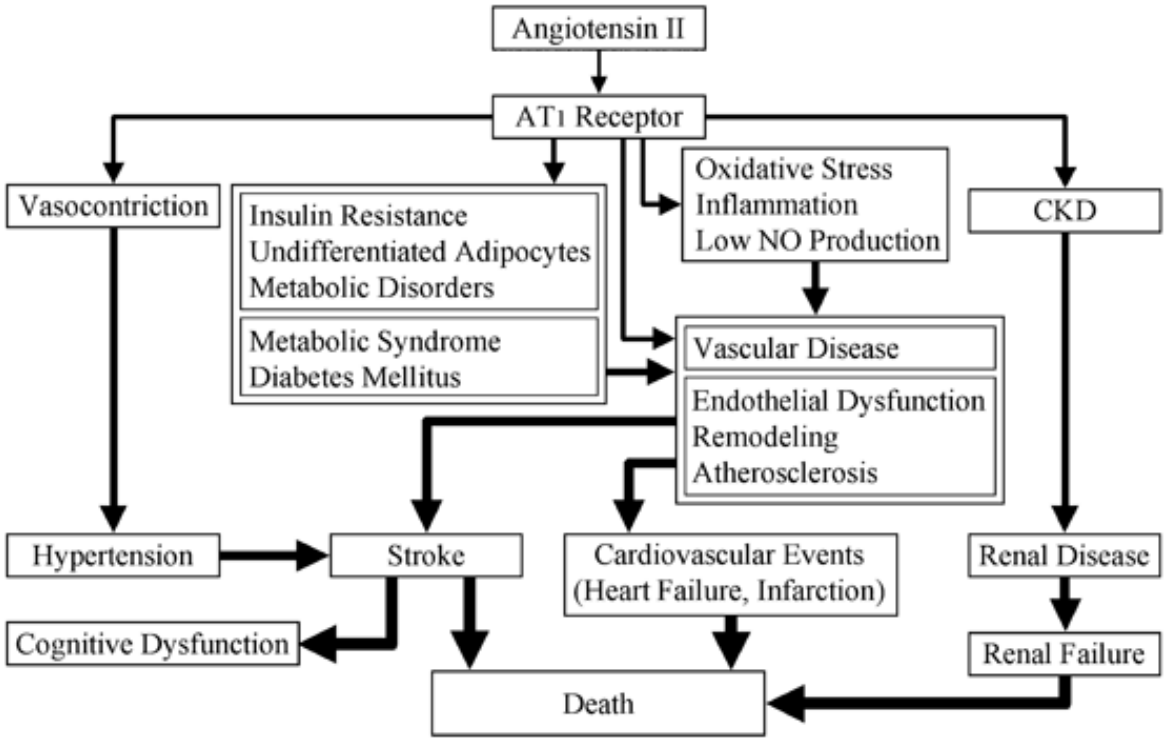


Figure 8 : **Le rôle de la stimulation des récepteurs AT_1R dans l'hypertension et l'altération d'organes cibles** (Iwai and Horiuchi, 2009). NO = nitric oxide; CKD = chronic kidney disease.

2.2.3 Thromboxane A_2 et Prostaglandine

Le thromboxane A_2 (TXA_2) et la prostacycline (PGI_2) sont des métabolites de l'acide arachidonique. Le thromboxane A_2 (TXA_2) appartient à la famille des lipides appelés

eicosanoïdes, qui sont générés par l'action séquentielle de trois enzymes : la phospholipase A_2, la COX-1/COX-2 et la TXA_2 Synthase (TXAS) (Rucker and Dhamoon, 2021). Le TXA_2 a été décrit à l'origine comme étant libéré par les plaquettes et est maintenant connu pour être libéré par une variété d'autres cellules, y compris les macrophages, les neutrophiles et les cellules endothéliales, tandis que la prostacycline (PGI_2) est le principal produit du métabolisme catalysé par la cyclooxygénase (COX) à partir de l'acide arachidonique dans l'endothélium vasculaire (Cheng et al., 2002b). L'acide arachidonique (AA) est converti en prostaglandine G_2 (PGG_2) puis en prostaglandine intermédiaire instable H_2 (PGH_2) par la cyclooxygénase-1 (COX-1) ; rapidement, la PGH_2 instable est isomérisée en TXA_2 par la TXA_2 synthase (TXAS) dans les plaquettes (Li et al., 2019). Cependant, la PGH_2 peut également être isomérisée en prostacycline (PGI_2) et prostaglandine E_2 (PGE_2) respectivement par les prostaglandines I et E synthases (PGIS, PGES) (Wong, 2019) (Figure 9).

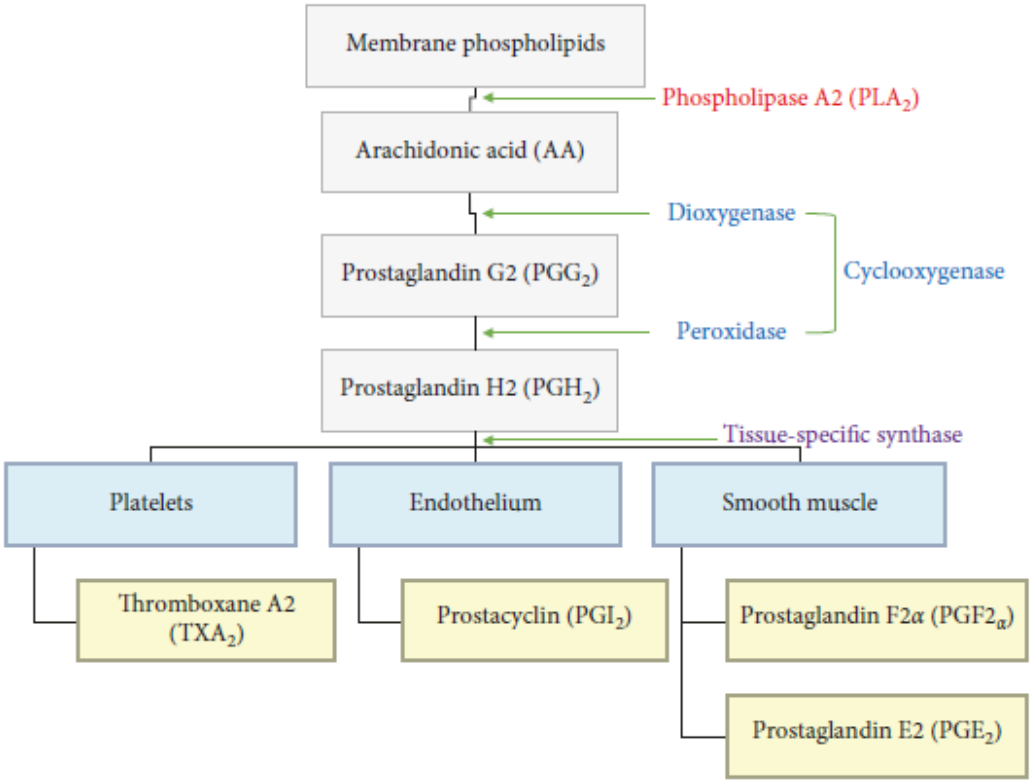


Figure 9 : La voie de l'acide arachidonique et le rôle de la cyclooxygénase dans la synthèse des prostaglandines (Wong, 2019).

Bien que la PGI_2 entraîne généralement une vasodilatation par activation de la voie du récepteur IP/adénylate cyclase (AC)/AMPc, les réponses des PGI_2 sont altérées dans certaines conditions, notamment l'hypertension et le diabète (Matsumoto et al., 2015). En effet, dans les artères des sujet hypertendus, principalement PGI_2, TxA_2 et PGH_2 médient les réponses EDCF (en rouge). En plus de ces prostanoïdes, PGE_2 et $PGF_{2\alpha}$ peuvent également se comporter comme EDCF dans les artères des sujets diabétiques (en bleu) (Figure 10). PGD_2 un autre EDCF a des effets moins significatifs par rapport aux autres prostanoïdes. La COX génère des ROS. Les ROS sont considérés comme des EDCF eux-mêmes ainsi que comme des amplificateurs/modulateurs des réponses EDCF, car les ROS activent davantage les COX endothéliales et des muscles lisses et augmentent la production d'isoprostanes via l'AA, ce qui entraîne l'activation des récepteurs des prostanoïdes. L'activité COX est régulée et renforcée par plusieurs amplificateurs/inducteurs dans l'hypertension et le diabète.

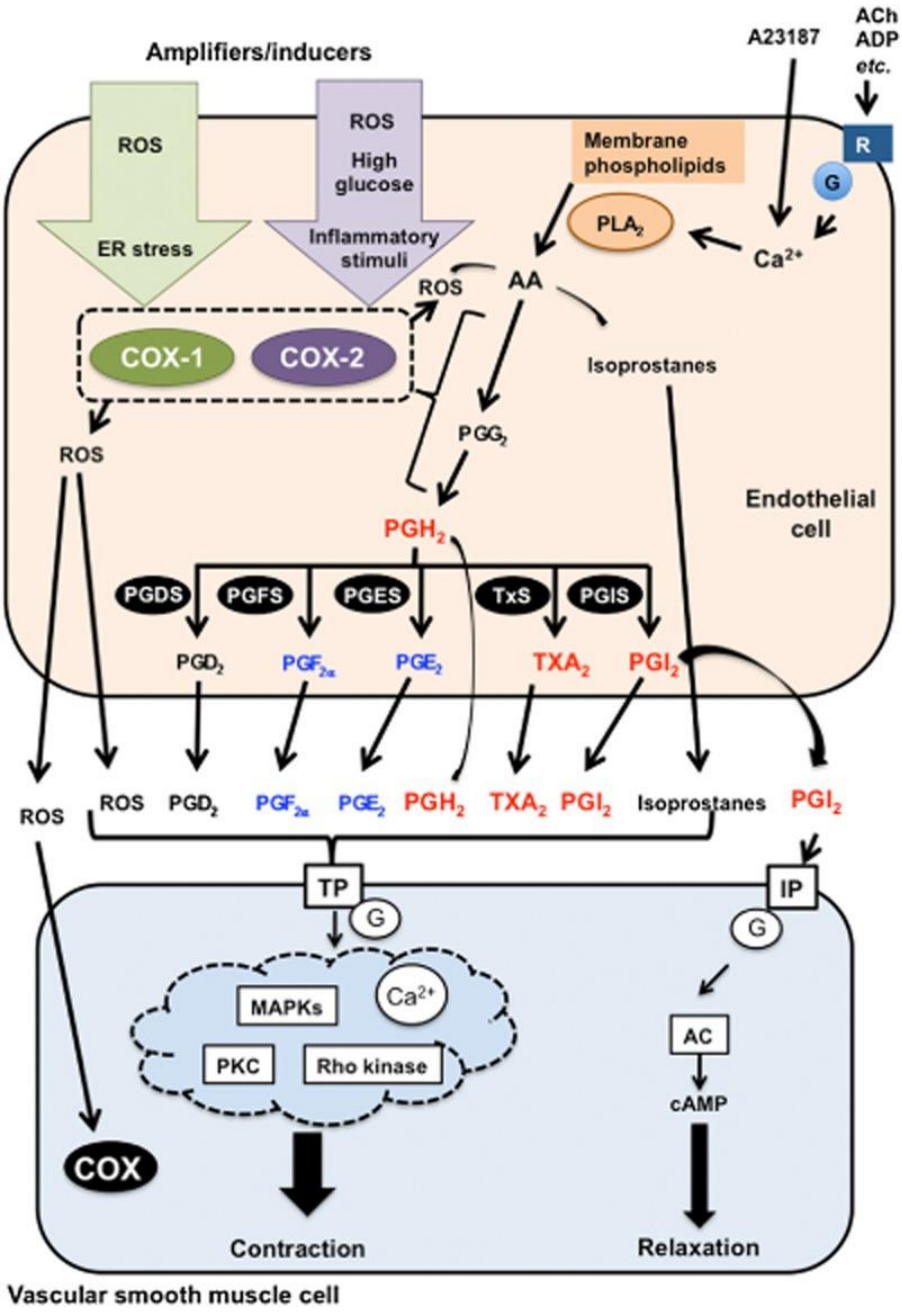


Figure 10 : Principales voies de signalisation médiées par EDCF (Matsumoto et al., 2015)**.**

2.2.4 - L'endothéline-1 (ET-1)

Les endothélines sont une famille de peptides, qui comprend l'endothéline-1 (ET-1), l'endothéline-2 (ET-2) et l'endothéline-3 (ET-3), chacune contenant 21 acides aminés. ET-1 est un peptide sécrété principalement par les cellules endothéliales vasculaires, l'isoforme prédominante exprimée dans le système vasculaire et le vasoconstricteur le plus puissant

actuellement connu (Agapitov and Haynes, 2002). Les ET interagissent avec deux récepteurs distincts couplés aux protéines G, l'ET_A et l'ET_B, qui ont été identifiés deux ans après la découverte des peptides endogènes en 1988 (Maguire and Davenport, 2015; Yanagisawa et al., 1988). Les récepteurs ETA sont situés principalement dans les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC), où ils sont responsables d'une puissante contraction vasculaire, d'une prolifération cellulaire et d'un effet pro-inflammatoire (Kowalczyk et al., 2015). Les récepteurs ETB comprennent deux sous-types : ETB1, qui est exprimé sur les cellules endothéliales et évoque une vasodilatation médiée par NO, et ETB2, également présent dans les VSMC, qui provoque une contraction (Hynynen and Khalil, 2006; Yanagisawa et al., 1988). On sait que l'ET-1 stimule la production de ROS, principalement des anions superoxydes (O_2^-), et conduit par conséquent au développement d'un stress oxydant. Certaines études ont montré que le stress oxydant causé par l'ET-1 est associé à l'augmentation de la peroxydation lipidique et à la réduction des groupes intracellulaires de GSH (glutathion) et SH (Kowalczyk et al., 2015). L'ET-1 contribue au développement de processus inflammatoires dans la paroi vasculaire. L'ET-1 est aussi associé à une réponse inflammatoire impliquant l'activation de facteurs de transcription tels que NF-κB et l'expression de cytokines pro-inflammatoires, y compris TNF-α, IL-1 et IL-6 (Yeager et al., 2012) (Figure 11).

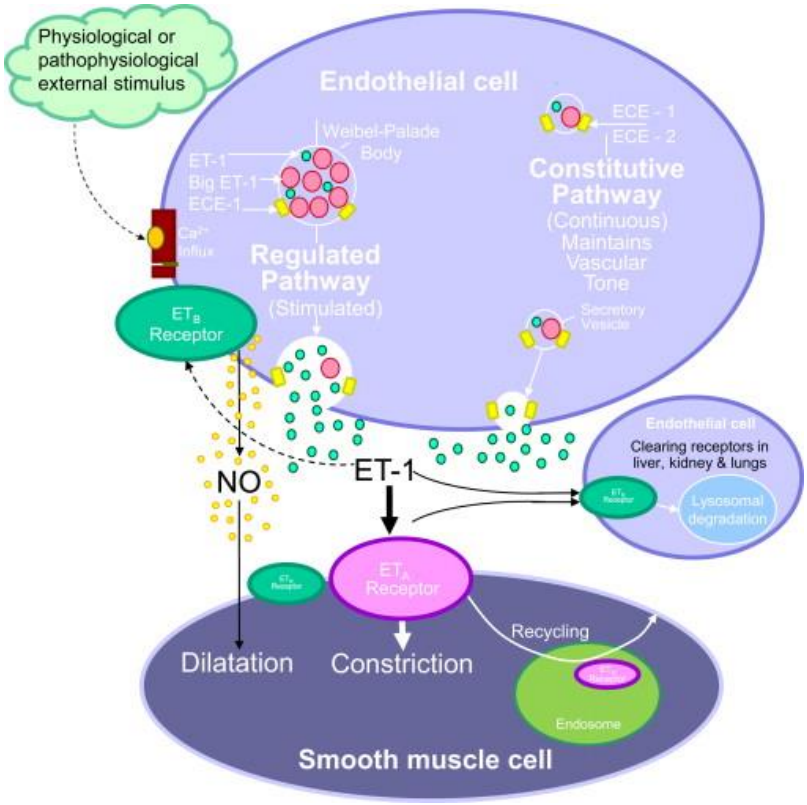


Figure 11: Modèle de la voie de signalisation ET-1 dans le système vasculaire rénal (Maguire and Davenport, 2015). La principale source de production d'ET-1 est l'endothélium vasculaire, bien qu'il soit également produit par d'autres types de cellules dans le rein, y compris les cellules épithéliales. ET-1 est synthétisé dans les vésicules sécrétoires de la voie constitutive. Prépro-ET-1 est transformé en proET-1 par l'action d'une furine convertase. La proET-1 est ensuite transformée en peptide mature et biologiquement actif ET-1, principalement par l'action de l'ECE-1, bien qu'une seconde enzyme apparentée, l'ECE-2, puisse également jouer un rôle, en particulier dans des conditions de pH acides. ET-1 est également libéré par les corps de Weibel-Palade en réponse à des stimuli externes. L'ET-1 libéré provoque la contraction du muscle lisse sous-jacent, principalement via l'ETA. Le complexe ligand-récepteur subit ensuite une internalisation à l'endosome avant le recyclage du récepteur à la surface cellulaire.

Chapitre 2 : Dysfonction endothéliale et hypertension artérielle

1. Maladies cardiovasculaires et hypertension artérielle

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont l'une des principales causes de décès dans le monde. On estime que 55 millions de décès sont survenus dans le monde en 2017, dont 17,7 millions dues aux maladies cardiovasculaires (Yusuf et al., 2020). L'hypertension artérielle est la principale cause de maladies cardiovasculaires et de décès prématurés (Mills et al., 2020). Elle est la cause de 50 % des décès dus aux accidents vasculaires cérébraux et 45 % des décès dus aux maladies cardiaques (WHO, 2013). Elle est diagnostiquée lorsque la pression artérielle systolique d'une personne au cabinet ou à la clinique est ≥ 140 mm Hg et / ou que sa pression artérielle diastolique est ≥ 90 mm Hg après un examen répété (Unger et al., 2020). En raison de l'utilisation répandue des antihypertenseurs, la pression artérielle moyenne globale est restée constante ou a légèrement diminuée au cours des quatre dernières décennies. En revanche, la prévalence de l'hypertension a augmentée, en particulier dans les pays à revenu faible et intermédiaire (PRFI) ; en moyenne, environ 1 adulte sur 3 dans ces pays est hypertendu (Mills et al., 2020; Sarki et al., 2015). Les conséquences de l'HTA sur la composante vasculaire sont différentes selon que l'on s'intéresse aux petites artères de résistances ou aux artères de conduction. Les artères de résistances subissent trois types de phénomènes à savoir un remodelage concentrique dit eutrophique, définit comme étant une réorganisation de la même quantité de tissus autour d'un diamètre plus petit ; une raréfaction du lit artériolaire et capillaire, c'est-à-dire une densité diminuée par unité pondérale de tissu perfusé et une atteinte précoce de la fonction endothéliale, avec diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) (Boutouyrie and Laurent, 2004; Struijker-Boudier et al., 2007). Au niveau des artères de conductance on observe une hypertrophie excentrique une augmentation de rigidité et une perte de compliance. Tout cela entraine une augmentation des résistances périphériques, une altération des capacités de vasodilatation et une ischémie tissulaire dans des cas critiques (Struijker-Boudier et al., 2007). De plus, les recherches ont soulevé la possibilité que les

changements liés à l'inflammation dans la microcirculation puissent être des événements précoces, voire primaires, non seulement dans le développement des lésions du cœur en tant qu'organe mais aussi dans le développement de l'HTA elle-même (Arroyo et al., 2021; Suematsu et al., 2002; Intengan and Schiffrin, 2001).

2. Hypertension artérielle au Bénin

Situé en Afrique de l'Ouest sur le golfe de Guinée entre 6 et 12 degrés nord, le Bénin couvre une superficie de 114763 km^2. C'est un pays à revenu intermédiaire inférieur, qui n'a pas été épargné par l'augmentation de la prévalence de l'HTA. En effet, des études réalisées de juillet à août 2008 dans les 12 départements du Bénin sur 6853 personnes, âgées de 25 à 64 ans ont montré que la prévalence de l'HTA était de 27,9 % (Houinato et al., 2012). D'autres études ont été réalisées en 2015 sur 1777 personnes de plus de 25 ans dans la population de Tanvè, un milieu rural à 150 km au nord de Cotonou et sur 717 personnes âgées de 18 à 64 ans dans la région atlantique du Bénin. Ces études ont montré une prévalence de l'hypertension artérielle qui atteint 32,9 %, dans la population de Tanvè et 33,9 % dans la région atlantique (Desormais et al., 2019; Houssou et al., 2020). Des études ont été aussi réalisées dans le marché de Dantokpa, le plus grand marché du Bénin, situé dans le département du littoral. 255 femmes ont été inscrites à l'étude, dont l''âge moyen était de 41,6 ± 12,13 ans avec des extrêmes de 18 et 84 ans. Les résultats ont montré que 114 femmes (34 %) souffraient d'HTA (Mama Cisse et al., 2020).

3. Modèle d'hypertension

Le modèle animal idéal pour la recherche sur l'hypertension devrait avoir une anatomie, une circulation hémodynamique et une physiologie cardiovasculaire de type humain et développer les caractéristiques et les complications de la maladie humaine. Inévitablement, aucune espèce ne peut répondre de manière cohérente à tous ces critères et d'autres contraintes dictent souvent le choix des modèles animaux pour des applications de recherche (Lerman et

al., 2005). Les modèles animaux d'hypertension peuvent être classés en fonction de l'étiologie, selon qu'il s'agisse de l'hypertension primaire ou secondaire. (Leong et al., 2015) (**Error! R eference source not found.**). L'hypertension primaire plus fréquent est due à une dérégulation des systèmes qui régulent normalement la pression artérielle tandis que l'hypertension secondaire plus rare survient à la suite d'une maladie, une anomalie ou une pathologie particulière.

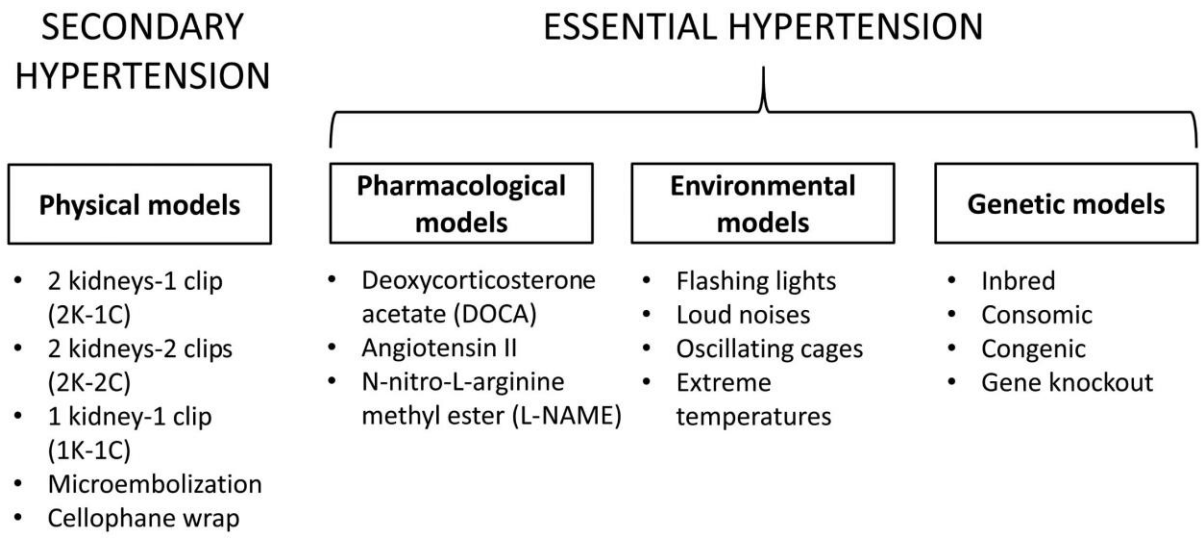


Figure 12 : Différents types de modèles animaux pour l'hypertension primaire ou essentielle et secondaire (Lin et al., 2016).

La souche SHR (Rats spontanément hypertendus) est la souche génétique du rat hypertendu. SHR est un animal de choix pour l'étude des antihypertenseurs et la recherche médicale sur l'hypertension expérimentale car il simule étroitement l'hypertension essentielle (Leong et al., 2015). Les mécanismes génétiques de l'hypertension chez SHR ont été attribués à des altérations neurales et vasculaires. Les variations individuelles du fond génétique du SHR peuvent influencer l'évolution de l'hypertension et son effet sur les organes (Pinto et al., 1998), mais au moins 3 gènes majeurs sont impliqués dans le développement précoce de l'hypertension : 3 QTL (loci de trait quantitatif) identifiés sur les chromosomes 1, 3 et 4 , tandis

qu'un QTL supplémentaire identifié sur le chromosome 10 contribue au développement et maintien de l'hypertension au cours du vieillissement chez SHR (Yamori, 1999).

Différentes méthodes expérimentales sont utilisées pour induire l'hypertension artérielle. Les minéralocorticoïdes ou leurs dérivés synthétiques, y compris le DOCA (Acétate de désoxycorticostérone), sont utilisés avec le chlorure de sodium chez les rats néphrectomisés unilatéraux pour induire une hypertension (Selye et al., 1943). La sécrétion de la rénine est freinée et la réabsorption de fluide est augmentée, produisant ainsi un modèle d'hypertension faible en rénine (Williams Stephen K. and Ogedegbe Gbenga, 2012).

L'hypertension induite par l'Angiotensine II est l'un des modèles pharmacologiques d'hypertension les plus largement utilisés chez le rat. Le système rénine-angiotensine (RAS) joue un rôle fondamental dans l'homéostasie normale du sodium et de l'eau (Crowley et al., 2006). En conséquence, l'un des modèles précliniques d'hypertension les plus largement utilisés, en particulier chez les rongeurs, est la perfusion sous-cutanée à long terme d'Ang II. L'utilité de ce modèle provient en partie de la ressemblance avec certaines formes d'hypertension humaine. Le RAS est largement activé dans l'hypertension artérielle essentielle chez l'Homme, et le niveau d'élévation de la pression artérielle atteint avec des doses couramment utilisées d'Ang II chez la souris est comparable à celui observé dans l'hypertension non contrôlée de stade 2. Après 4 semaines de perfusion d'Ang II à long terme chez des souches de rongeurs sensibles, les dommages aux organes cibles sont assez similaires à ceux observés chez les patients humains présentant des élévations prolongées de la pression artérielle, y compris une hypertrophie cardiaque, un remodelage vasculaire et une maladie rénale chronique (Crowley et al., 2011, 2008, 2006; Guzik et al., 2007). Le modèle de perfusion Ang II a été utilisé dans les premières études qui caractérisaient les fonctions du RAS chez le chien (Cowley a. W. et al., 1971; Olsen et al., 1985). Mais a été adapté pour une perfusion sous-cutanée à long terme chez les rongeurs. Chez les rongeurs, les rats développent des lésions des organes cibles

en réponse à l'Ang II plus facilement que les souris et peuvent être plus facilement mis en œuvre chirurgicalement avec des dispositifs de surveillance de la pression artérielle. D'autre part, les souris se reproduisent plus rapidement, présentent un début rapide d'hypertension et se prêtent au ciblage génétique même au sein de lignées cellulaires sélectionnées (Lerman et al., 2019).

4. Dysfonction endothéliale

L'endothélium est un constituant important des vaisseaux sanguins qui joue un rôle essentiel dans l'homéostasie cardiovasculaire en régulant la fluidité sanguine et la fibrinolyse, le tonus vasculaire, l'angiogenèse, l'adhésion monocyte / leucocyte et l'agrégation plaquettaire. En raison de ses jonctions cellule à cellule spécialisées étroites, l'endothélium forme une barrière qui limite sélectivement le mouvement des macromolécules (Rahimi, 2017). Un équilibre critique entre les facteurs de relaxation et de contraction dérivés de l'endothélium maintient l'homéostasie vasculaire. Lorsque cet équilibre est perturbé, il prédispose le système vasculaire à la vasoconstriction, à l'adhérence des leucocytes, à l'activation plaquettaire, à la mitogenèse, au stress oxydant, à la thrombose, à l'inflammation vasculaire et aux maladies cardiovasculaires : c'est la dysfonction endothéliale (Grover-Páez and Zavalza-Gómez, 2009; Sun et al., 2016). Le terme dysfonctionnement des cellules endothéliales a été utilisé pour la première fois pour décrire une adhésivité excessive de l'endothélium aux plaquettes (Gimbrone, 1980). Une compréhension plus large de la dysfonction endothéliale a permis de la caractériser par une vasodilatation et une vasoconstriction déséquilibrée, une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des facteurs pro-inflammatoires, ainsi qu'un déficit de la biodisponibilité du NO (Sun et al., 2020).

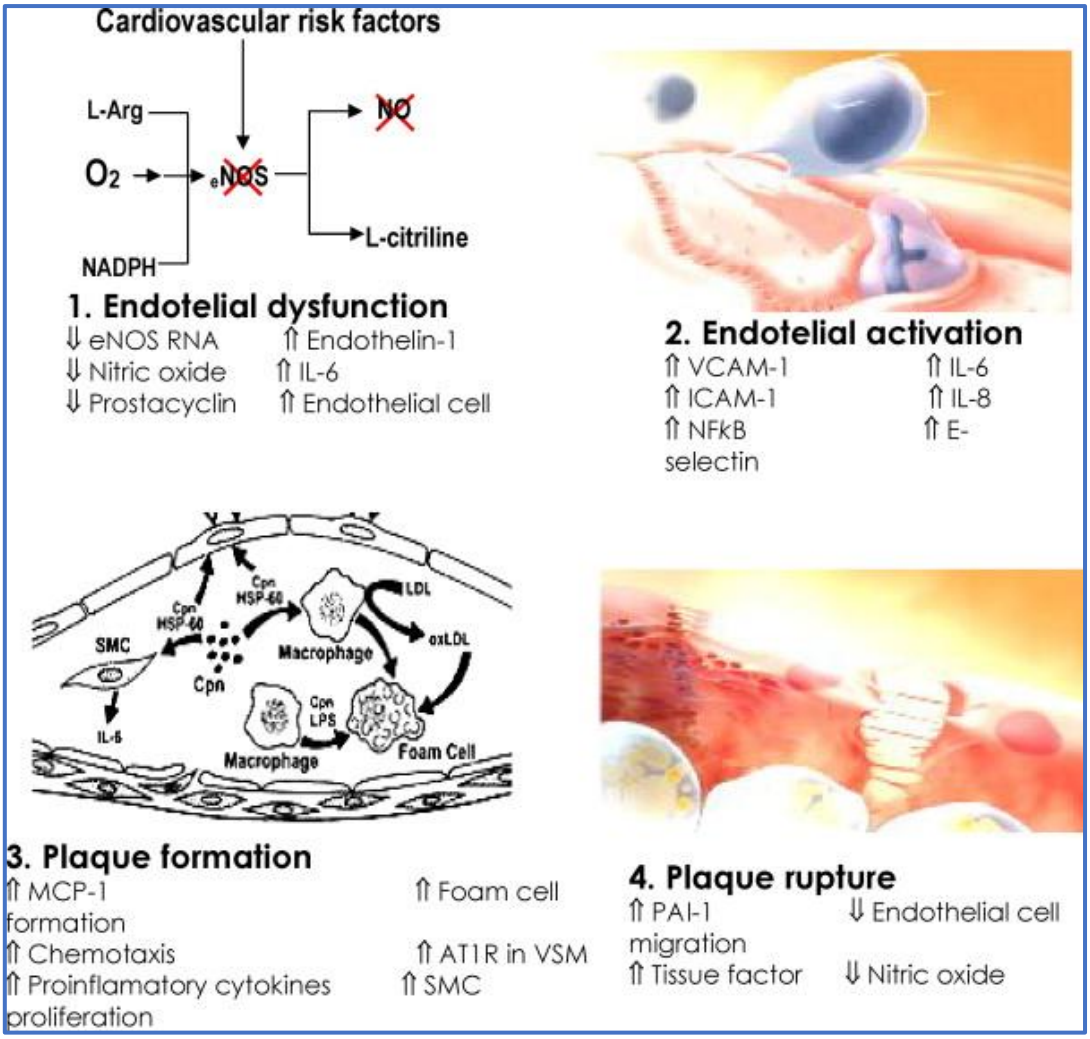


Figure 13 : Athérogenèse due à une dysfonction endothéliale (Grover-Páez and Zavalza-Gómez, 2009)**.** AT_1R, Récepteur de l'angiotensine I; eNOS, oxyde nitrique endothéliale synthase ; EPC, cellules progénitrices endothéliales ; ICAM-1, molécule d'adhésion intercellulaire-1; IL-6, interleukine 6 ; IL-8, interleukine 8 ; MCP, protéine chimio attractive des monocytes ; MMP, métalloprotéinase matricielle; NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; PAI-1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1; ROS, espèces réactives de l'oxygène; SMC, cellule musculaire lisse; VCAM-1, protéine d'adhésion cellulaire vasculaire 1; VSM, cellule musculaire lisse vasculaire.

5. Dysfonction endothéliale et hypertension artérielle

Un grand nombre d'études ont montré que l'hypertension artérielle est associée à un dysfonctionnement endothélial (Higashi and Yoshizumi, 2004; Scolaro et al., 2018). La dysfonction endothéliale est une altération phénotypique de l'endothélium caractérisée par des états pro-thrombotiques, pro-inflammatoires et pro-vasoconstricteurs (Gokce et al., 2001). L'hypertension artérielle est associée à une réduction de 0,62 % de la fonction endothéliale

quantifiée par la vasodilatation médiée par le flux (FMD) (Gonzalez and Selwyn, 2003). En effet, la dysfonction endothéliale a été largement explorée en évaluant la réponse aux stimuli dépendants de l'endothélium, à la fois pharmacologiques et mécaniques. Une réponse altérée à l'acétylcholine, à la méthacholine, à la bradykinine et à la substance P corrélée à l'épaississement de l'intima des artères carotides, a été documentée dans le système vasculaire de l'avant-bras de patients hypertendus essentiels par rapport aux témoins normotendus (Ghiadoni et al., 1998; Taddei et al., 1998). De plus, cette dysfonction endothéliale ne se limite pas qu' à la microcirculation musculaire périphérique, car elle a également été mise en évidence dans la microcirculation cutanée et sous-cutanée, dans la macro- et la microcirculation coronaire et dans la circulation rénale (Taddei et al., 1998). En plus de la résistance périphérique observée, la réponse vasculaire aux stimuli dépendants de l'endothélium tels que l'exercice physique, le test de pression à froid et la dilatation médiée par le flux en réponse à la papavérine est altérée dans les artères épicardiques coronaires non sténosées des patients souffrant d'hypertension essentielle (Taddei et al., 2001b).

Plusieurs études ont prouvé que la eNOS est importante dans la régulation des fonctions vasculaires. En particulier, les souris dépourvues du gène eNOS présentent une augmentation de la pression artérielle et une perte de vasorelaxation dépendante de l'endothélium (Grover-Páez and Zavalza-Gómez, 2009). En effet, le stress oxydatif dans la paroi vasculaire et l'hypertrophie vasculaire contribuent à réduire la biodisponibilité du NO et, par conséquent, à réduire la vasodilatation médiée par l'endothélium (Grover-Páez and Zavalza-Gómez, 2009). Un déséquilibre entre le NO et les ROS, appelé « stress oxydatif », est un facteur clé du dysfonctionnement endothélial induit par l'hypertension. L'hypertension active la nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, la xantine oxydase, la cyclooxygénase et le transport d'électrons mitochondriaux et désactive le système antioxydant, y compris la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase,

entraînant une augmentation de la production de ROS et une diminution de sa dégradation (Higashi et al., 2012) (Figure 14).

Les investigations ont indiqué une plus grande incidence d'événements cardiovasculaires chez les patients hypertendus avec un dysfonctionnement endothélial sévère par rapport aux patients hypertendus avec un dysfonctionnement endothélial moins sévère, et par conséquent, il est suggéré comme marqueur d'événements cardiovasculaires futurs chez les patients hypertendus (Calhoun et al., 2008).

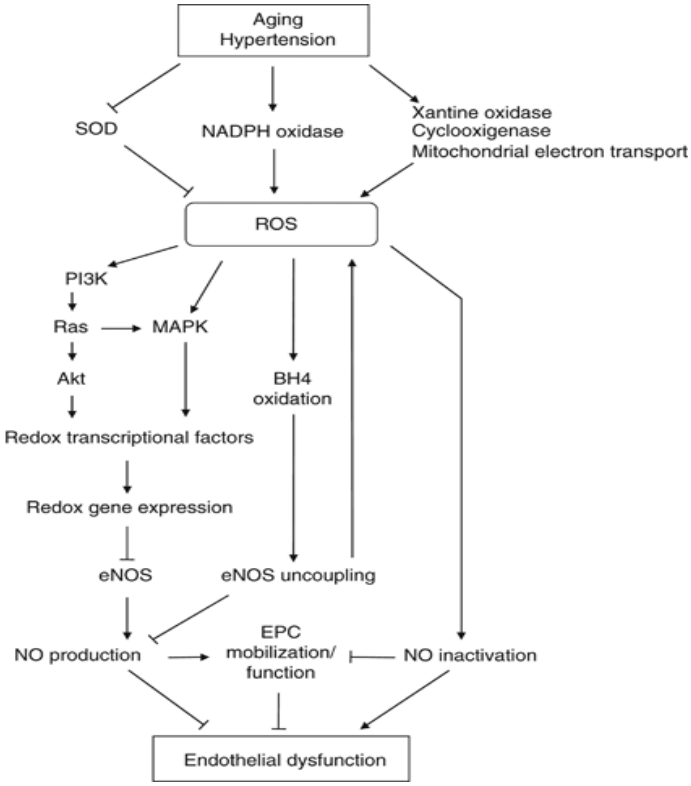


Figure 14 : Mécanismes putatifs par lesquels l'hypertension altère la fonction endothéliale (Higashi et al., 2012)**.** BH4, tétrahydrobioptérine ; eNOS, oxyde nitrique endothéliale synthase ; EPC, cellules progénitrices endothéliales ; NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; NO, monoxyde d'azote ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; SOD superoxyde dismutase.

6. Vieillissement et hypertension artérielle

La pression artérielle, en particulier la pression artérielle systolique, augmente avec l'âge, bien que la composante diastolique de la pression artérielle commence à se stabiliser

autour de l'âge de 50 ans et diminue lentement par la suite (Stanley et al., 2001). Ces changements temporels de la pression artérielle augmentent la pression différentielle et sont associés à une augmentation spectaculaire de la prévalence de l'hypertension systolique. Les résultats d'une étude de cohorte prospective communautaire portant sur 1 298 participants âgés de 55 à 65 ans et ne souffrant pas d'hypertension au départ, ont montré que plus de 90% des adultes normotendus de la quarantaine développent une hypertension au cours de leur vie (Vasan et al., 2002). L'aorte et les branches principales agissent comme des tubes distensibles qui favorisent la conversion de la sortie pulsatile du cœur en un flux constant dans la circulation périphérique. Avec le vieillissement, il y a une perte progressive des propriétés viscoélastiques des vaisseaux de conductance, une augmentation de la maladie artérielle athérosclérose et une hypertrophie et une sclérose des artères et artérioles (Laurent et al., 2007). Ces modifications vasculaires conduisent à une perte de la fonction d'amortissement des vaisseaux et à un raidissement de la vascularisation artérielle dans son ensemble, ce qui favorise le retour précoce des ondes réfléchies de la circulation artérielle périphérique. La réflexion de l'onde précoce amplifie l'onde de pression systolique générée à chaque battement cardiaque, entraînant une augmentation de la pression systolique et une baisse de la pression diastolique (Logan, 2011). Le vieillissement est également associé à une augmentation de la résistance totale (et rénale vasculaire) et de l'indice de masse ventriculaire gauche, ainsi qu'à une diminution du débit cardiaque, de la fréquence cardiaque, du volume systolique, du volume intravasculaire, du débit sanguin rénal et de l'activité rénine plasmatique (Messerli et al., 1983). Il y a une diminution progressive de la capacité des reins à excréter efficacement les charges de sel, ce qui entraîne une augmentation de la pression artérielle (Mimran et al., 1992). Le vieillissement induit une augmentation de la graisse viscérale et de la leptine circulante, qui est associée à une augmentation significative de la pression artérielle (Intapad et al., 2013). De plus le vieillissement est associé à un dysfonctionnement endothélial (Egashira et al., 1993; Taddei et

al., 1995), qui est causé par une altération progressive de la voie du NO et un stress oxydatif accru. Ces modifications subcliniques de la structure et de la fonction vasculaires dépendant de l'âge contribuent fortement au développement de l'hypertension. Récemment, cette physiopathologie a été reconnue comme le « vieillissement vasculaire précoce » (Fukutomi and Kario, 2010). Chez les jeunes individus qui ont une aorte dilatable, l'onde de pression artérielle se déplace à une vitesse lente et revient du site de réflexion périphérique dans la diastole du cycle cardiaque. D'autre part, dans la grande artère raidie des personnes âgées, l'onde de pression artérielle descend plus rapidement et revient plus tôt au cœur en fin de systole, augmentant la pression de pointe systolique aortique et entrainant une diminution de la pression diastolique. Ces modifications de la forme de l'onde artérielle sont le mécanisme physiopathologique de l'« hypertension systolique isolée », fréquemment observée chez les personnes âgées hypertendues (Figure 15).

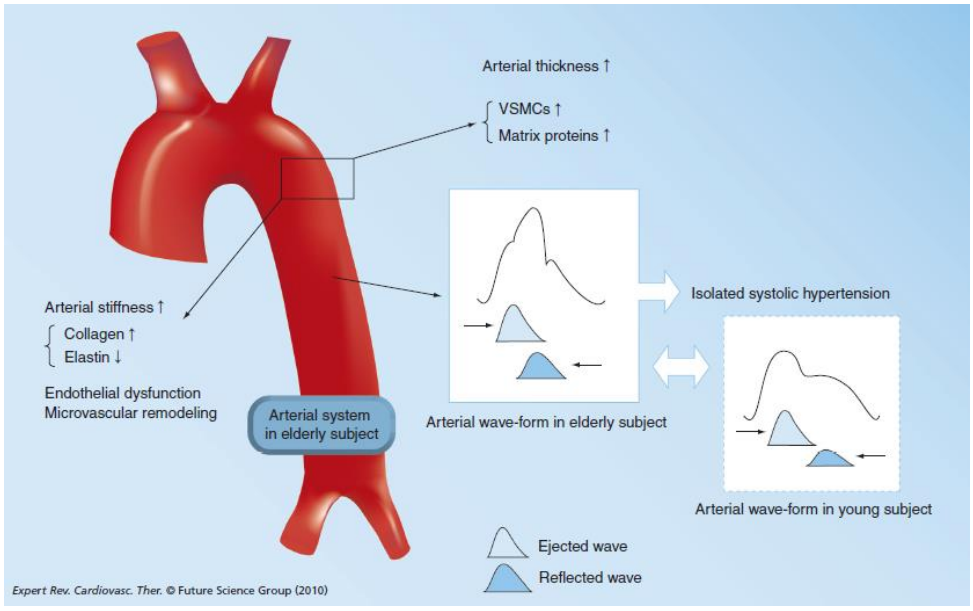


Figure 15 : Changement lié à l'âge du système artériel et de la forme d'onde chez le sujet âgé. (Fukutomi and Kario, 2010)**.** VSMC : cellule musculaire lisse vasculaire.

L'hypertension est intrinsèquement associée à un vieillissement vasculaire accéléré et, par conséquent, il met en lumière le remodelage vasculaire survenant avec l'âge (Lakatta,

2007). Le vieillissement vasculaire précoce, terme introduit dans le contexte du développement prématuré de la rigidité vasculaire et du remodelage par Nilsson et al, (Guimaraes Cunha et al., 2017; Nilson et al., 2009; Nilsson et al., 2008) est une caractéristique clé de l'hypertension (Zhongjie, 2015). Plusieurs mécanismes possibles par lesquels le vieillissement altère la fonction endothéliale entrainant ainsi l'hypertension sont représentés dans la Figure 16.

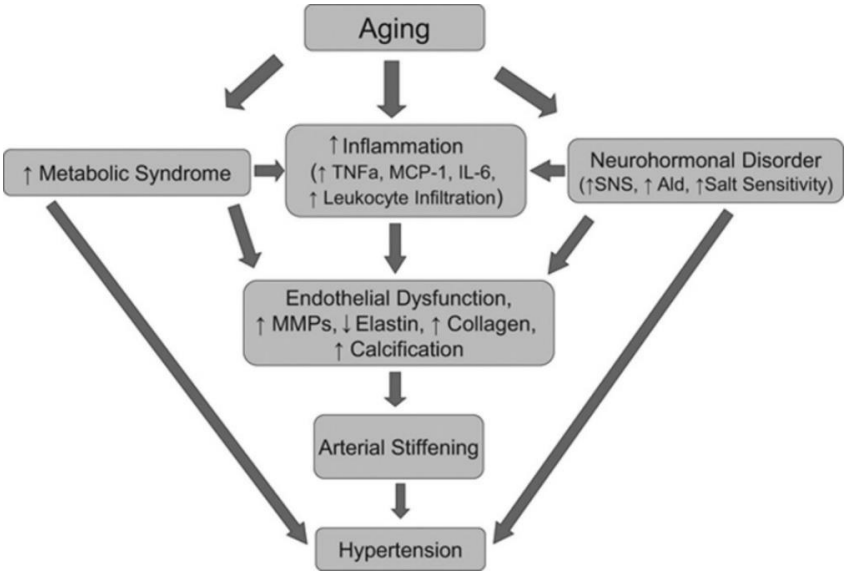


Figure 16 : Un diagramme du lien mécanistique du vieillissement, de la raideur artérielle et de l'hypertension (Zhongjie, 2015). Ald, aldostérone ; IL-6, interleukine 6 ; MCP-1, protéine-1 chimio attractive des monocytes ; MMP, métalloprotéinase matricielle ; SNS, système nerveux sympathique ; et TNF-α, facteur de nécrose tissulaire-α.

7. Inflammation endothéliale et hypertension

L'importance de l'immunité et l'inflammation dans l'hypertension et les maladies vasculaires a été apprécié depuis des décennies. Dans les années 1960, Okuda et al ont montré que l'immunosuppression atténue l'hypertension chez les rats souffrant d'infarctus rénal partiel (Okuda and Grollman, 1967). Mais les progrès de ces recherches ont été ralentis par manque d'outils expérimentaux et à cause de résultats contradictoires. Récemment, avec l'avènement de méthodes expérimentales plus robustes, des progrès significatifs ont été réalisés pour élucider les mécanismes reliant l'inflammation et l'immunité à l'hypertension. Au cours des dernières années, plusieurs études de cohorte ont prouvées que l'inflammation systémique est associée à un risque accru d'événements cardiovasculaires aigus (Bautista, 2003). Les taux

plasmatiques de molécules inflammatoires circulantes, telles que la protéine C-réactive (CRP) et l'interleukine-6 (IL-6), se sont avérés prédictifs de futures maladies cardiovasculaires (MCV) (Pauletto and Rattazzi, 2006). Plus récemment, la reconnaissance de l'abondance et de l'infiltration des cellules immunitaires dans les lésions vasculaires pulmonaires et les vaisseaux remodelés a été reconnue (Figure 17) : les cellules immunitaires innées telles que les macrophages et les monocytes sont détectées chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire idiopathique (iPAH) (Savai et al., 2012).

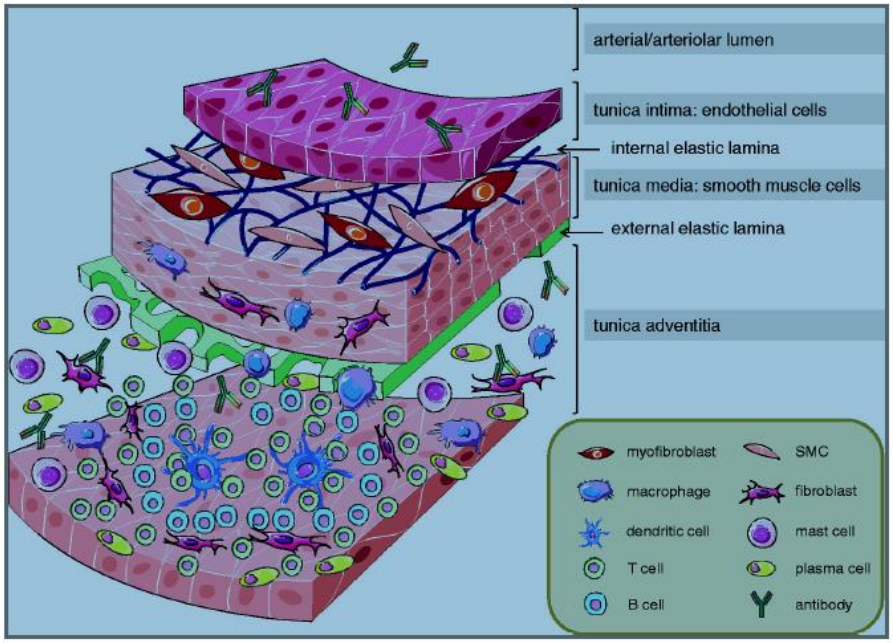


Figure 17 : Infiltration de cellules inflammatoires et immunitaires dans la paroi et l'espace périvasculaire des artères pulmonaires dans le cas de l'hypertension pulmonaire (Kuebler et al., 2018). Une coupe schématique montre une artère pulmonaire avec ses différentes couches (intima, média et adventice) et l'accumulation caractéristique des cellules inflammatoires et immunitaires, à savoir les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules T, les cellules B, mastocytes et plasmocytes, ainsi que l'infiltration de fibroblastes et de myofibroblastes et la production d'(auto-) anticorps au cours de l'hypertension pulmonaire.

L'inflammation contribue au remodelage vasculaire en favorisant la croissance cellulaire et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC). Cela est confirmé par

l'expression accrue dans la paroi vasculaire de molécules d'adhésion et de ligands, l'extravasation de leucocytes, l'augmentation du stress oxydatif, la production de cytokines, l'activation des cellules immunitaires et des voies de signalisation pro-inflammatoires (Savoia et al., 2011). Une plus grande expression des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1) sur la membrane des cellules endothéliales, l'accumulation de monocytes/macrophages, de cellules dendritiques, de cellules tueuses naturelles et de lymphocytes B et T participent à la réponse inflammatoire dans la paroi vasculaire (Wung et al., 1996). Des niveaux élevés de médiateurs inflammatoires (IL-6, ICAM-1 et CRP) peuvent être des facteurs de risque indépendants pour le développement de l'hypertension (Blake et al., 2003; Preston et al., 2002).

7.1. Les cellules Th17

Les cellules Th17 sont un sous-ensemble récemment décrit de cellules T caractérisées par l'expression du facteur de transcription lié à l'acide rétinoïque (ROR) γt et par la production d'interleukine 17 (IL-17). Les cellules Th17 sont pro-inflammatoires et exacerbent les lésions tissulaires dans des conditions d'inflammation chronique et d'auto-immunité (Louten et al., 2009). Cela semble également être le cas dans la pathologie hypertensive. Par exemple, les conséquences de la perfusion d'angiotensine II (Ang II) chez la souris : l'hypertension, le dysfonctionnement vasculaire, l'inflammation vasculaire, le stress oxydatif, le raidissement de l'aorte et le dépôt de collagène sont atténués chez les souris dépourvues d' IL-17 (Louten et al., 2009; Wu et al., 2014). De plus, l'administration d'IL-17 recombinante à des souris diminue la relaxation vasculaire dépendante du NO via la signalisation Rho-kinase et provoque une hypertension (Nguyen et al., 2013).

7.2. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules professionnelles de présentation d'antigène (APC) dérivées de la moelle osseuse qui jouent un rôle clé en tant que modulateurs de la réponse inflammatoire. Quatre sous-ensembles de CD ont été caractérisés : les CD

classiques (cCD), les CD plasmacytoïdes (pCD), les CD inflammatoires dérivées de monocytes (Mo-CD) et les cellules de Langerhans (Christ et al., 2013; Satpathy et al., 2012). Dans l'hypertension expérimentale, de nouvelles recherches intéressantes ont montré que la production de l'anion superoxyde induite par l'Ang II dans les cellules dendritiques est associée à l'accumulation de produits de peroxydation lipidique médiée par les radicaux libres, appelés isocétals, dans ces cellules. Les isocétals se lient rapidement aux lysines protéiques dans les CD, formant des protéines qui sont reconnues comme non-soi. À leur tour, les CD présentent ces protéines modifiées aux lymphocytes T, déclenchant l'activation des cellules T et l'hypertension (Kirabo et al., 2014) (Figure 18).

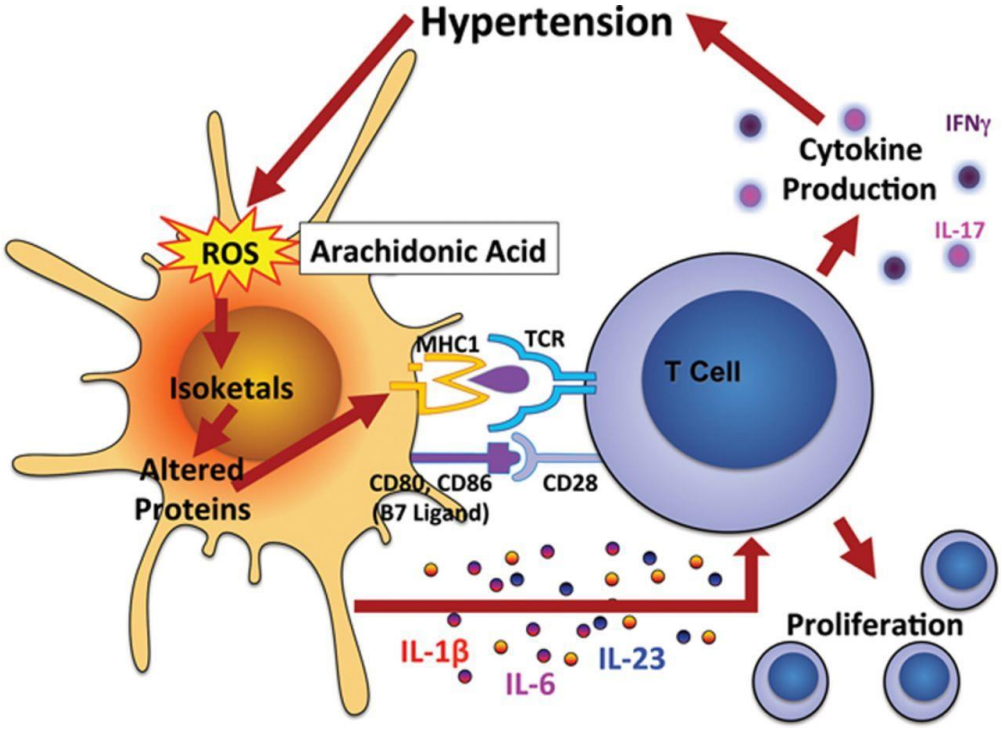


Figure 18 : Activation des lymphocytes T par des protéines modifiées par les isocétales (McMaster et al., 2015). L'hypertension induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules dendritiques (CD), conduisant à l'oxydation de l'acide arachidonique et à la formation de gamma cétoaldéhydes ou isocétals. Les isocétals se lient rapidement aux lysines protéiques dans les CD, formant des protéines qui sont reconnues comme non-soi. Ces peptides altérés sont présentés aux cellules T, conduisant à la prolifération des cellules T. La formation d'isocétals favorise également la production par les CD de cytokines, y compris IL-1β, IL-6 et IL-23, qui polarisent les cellules T pour produire des cytokines spécifiques. IFN, interféron ; IL, interleukine ; MHC, complexe majeur d'histocompatibilité ; et TCR, récepteur des cellules T

7. 3 Les cytokines

Une attention récente s'est concentrée sur l'exploration des voies et les médiateurs inflammatoires que les cellules immunitaires utilisent pour conduire à l'hypertension artérielle et aux lésions des organes terminaux. Lorsque les cellules immunitaires sont activées et/ou sont recrutées vers un organe cible, elles produisent des cytokines qui déterminent la réponse inflammatoire locale. Les chimiokines, types spéciaux de cytokines chimio attractants, dirigent la migration directe des cellules immunitaires dans les tissus. Certaines des cytokines et chimiokines inflammatoires qui ont été étudiés pour leur implication dans l'hypertension sont TNF-α, IL-17, MCP-1, and IL-6 (De Miguel et al., 2015). Les contributions du TNF-α au développement de l'hypertension artérielle ont été démontrées par des approches pharmacologiques ou génétiques dans des modèles animaux d'hypertension induite par l'Ang II comme évalué par Ramseyer et Garvin (Ramseyer and Garvin, 2013) (Figure 18). Le TNFα inhibe également le promoteur eNOS et provoque la déstabilisation de l'ARNm eNOS, réduisant finalement les niveaux de protéine eNOS et la capacité de l'endothélium à produire du NO (Neumann et al., 2004). De plus, l'angiotensine II augmente la production de lymphocytes T de TNFα, et le blocage du TNFα prévient l'hypertension et l'augmentation de la production vasculaire d'O_2^- causée par l'angiotensine II (Guzik et al., 2007).

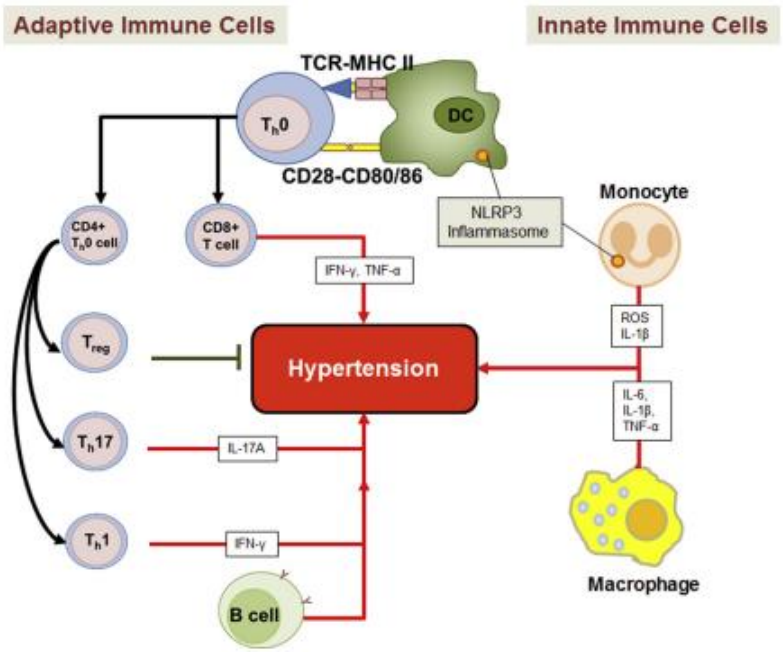


Figure 19 : Cellules immunitaires innées et adaptatives qui jouent un rôle dans l'hypertension (Barrows et al., 2019). Les cellules immunitaires innées telles que les monocytes, les macrophages et les CD inhibent ou favorisent l'hypertension en produisant diverses cytokines et ROS. Les cellules immunitaires adaptatives comme les cellules B, les cellules T CD41 (cellules Treg, Th17 et Th1) et les cellules T CD81 produisent également des cytokines qui inhibent ou induisent l'hypertension. Ang II, angiotensine II ; BP, pression artérielle, CNS, système nerveux central ; DAMP, modèles moléculaires associés aux dommages ; CD, cellules dendritiques ; IFN, interféron ; IL, interleukine ; ROS, espèces oxygénées réactives ; TCR-MHC, Récepteur des cellules T-complexe majeur d'histocompatibilité ; TNF, facteur de nécrose tumorale.

8. Espèces réactives de l'oxygène (ROS) et hypertension

Les ROS sont des dérivés réactifs du métabolisme de l'O_2 que l'on trouve partout dans le corps, y compris dans le système cardiovasculaire. Tout en maintenant l'intégrité cardiaque et vasculaire dans des conditions saines, les ROS jouent un rôle physiopathologique crucial dans plusieurs conditions cliniques, y compris l'hypertension. Au cours de l'hypertension, la génération des ROS dépasse les capacités tampons des mécanismes antioxydants protecteurs conduisant à un état de stress oxydatif (Landmesser and Harrison, 2001). Le stress oxydatif est une cause importante de dysfonctionnement endothélial, principalement par réduction de la biodisponibilité du NO (Barrows et al., 2019). Le O_2^- réagit avec le NO pour augmenter la production du peroxynitrite l'$ONOO^-$ toxique qui, à son tour, favorise les altérations des

facteurs de transcription, des kinases, de la synthèse des protéines et des gènes sensibles à l'oxydoréduction (Beckman and Koppenol, 1996; Touyz et al., 2003; Touyz and Schiffrin, 2004). Le peroxynitrite peut aussi augmenter le stress oxydatif en inhibant l'activité endothéliale de la eNOS par oxydation de la tétrahydrobioptérine (BH4), un cofacteur de l'eNOS. Cela conduit au découplage de la eNOS avec la formation d'anions superoxyde au lieu de NO (Barrows et al., 2019; Vásquez-Vivar et al., 1998). Ces changements dans la physiologie vasculaire induisent des altérations fonctionnelles, augmentent la contractilité vasculaire, la croissance et l'apoptose des cellules musculaires lisses, la migration des monocytes, la peroxydation lipidique, l'inflammation et le dépôt accru de protéines de la matrice extracellulaire (, tous des processus majeurs profondément impliqués dans la pathogenèse et la progression des dommages vasculaires (Masi et al., 2019). Les principales sources de ROS en ce qui concerne les maladies cardiovasculaires et l'hypertension sont la xanthine oxydase, la NO synthase endothéliale découplée (eNOS), la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, les cyclooxygénases (COX) et la respiration mitochondriale (Paravicini and Touyz, 2006). En effet, les COX métabolisent l'acide arachidonique à partir de phospholipides liés à la membrane en une variété finale de prostaglandines bioactives et de thromboxane (TX)A_2, collectivement appelées prostanoïdes (Cipollone et al., 2004). Deux isoenzymes COX distinctes, COX-1 et COX-2, ont été décrites. Alors que la COX-1 est exprimée de manière constitutive pour produire des prostanoïdes physiologiquement pertinents, la COX-2 est considérée comme une isoforme inductible, qui peut être rapidement régulée à la hausse par un certain nombre de stimuli. Dans les petites artères de résistance isolées de patients hypertendus essentiels, on a récemment trouvé une surexpression et une augmentation de l'activité de COX-2, jouant un rôle majeur dans la réduction de la disponibilité du NO (Masi et al., 2019). Lors de l'incubation avec un inhibiteur sélectif de la COX-2, l'excès

intravasculaire O_2^- a été fortement réduit, démontrant ainsi que la COX-2 est une source majeure de ROS dans l'hypertension (Virdis et al., 2013) (Figure 20).

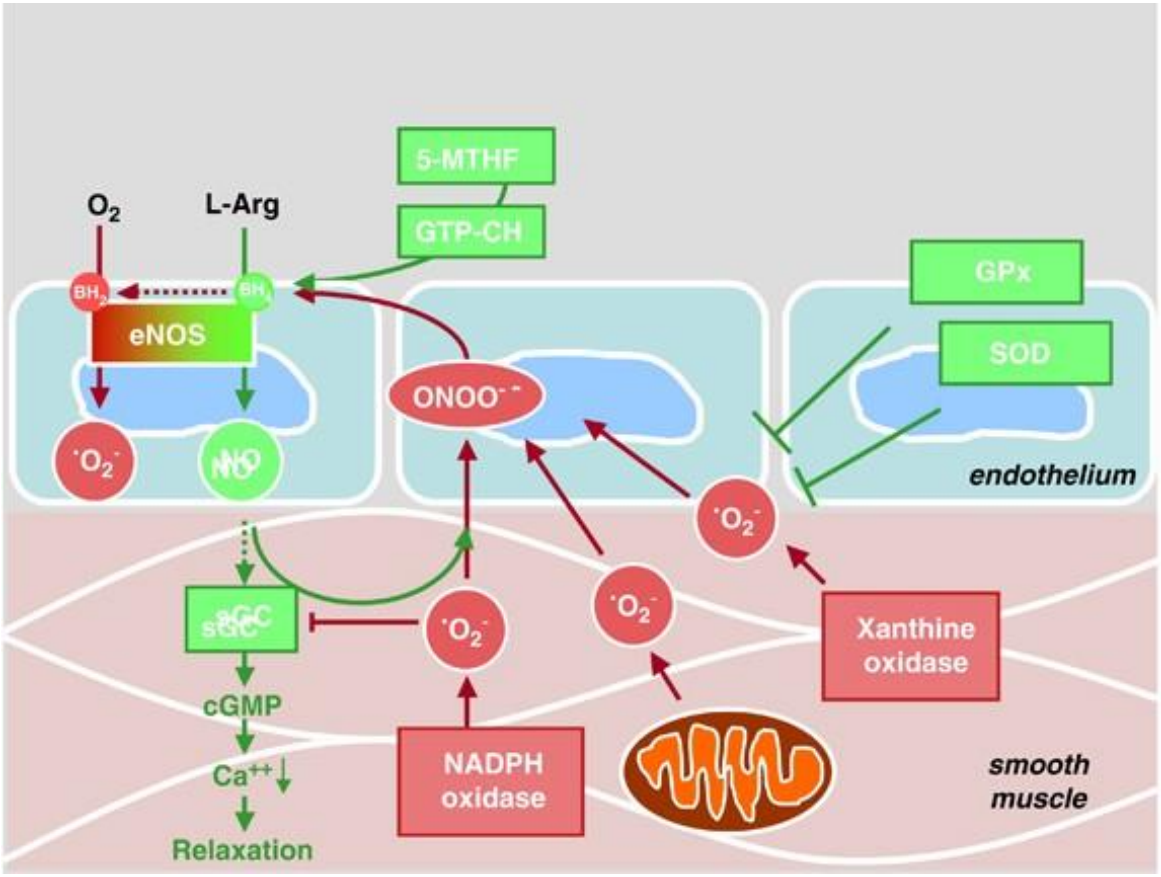


Figure 20 : Représentation schématique des mécanismes par lesquels les espèces réactives de l'oxygène entraînent une altération de la biodisponibilité de NO et un dysfonctionnement vasculaire (Schulz et al., 2011). Dans des conditions normales, le NO est synthétisé par la eNOS à partir de son précurseur L-arginine et stimule la guanylyl cyclase soluble (sGC), augmentant ainsi les niveaux de guanosine monophosphate cyclique conduisant à une baisse transitoire du calcium cellulaire et une vasorelaxation (flèches vertes, côté gauche de la figure). Cette voie peut cependant être inhibée sur plusieurs sites. Les changements associés à l'hypertension, tels que l'augmentation des taux d'angiotensine II, stimuleront la production d'anions superoxyde dans les cellules endothéliales et musculaires lisses principalement via l'activation de la NADPH oxydase vasculaire (Nox), de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la xanthine oxydase (flèches rouges). Les anions superoxydes peuvent directement inactiver le NO via la formation de peroxynitrite (ONOO-) et inhiber l'activité de la sGC. Le peroxynitrite à son tour peut également inhiber la sGC directement et dissocier eNOS en oxydant le cofacteur eNOS en BH_2. Ce concept, cependant, signifie également que le découplage de eNOS nécessiterait toujours un « événement d'amorçage » tel que l'anion superoxyde produit par les NADPH oxydases, les mitochondries ou la xanthine oxydase.Les antioxydants ou les systèmes enzymatiques de dégradation des anions superoxydes tels que les différentes isoformes de la superoxyde dismutase ou de la glutathion peroxydase comme illustré sur le côté droit peuvent prévenir ou même ralentir les dommages oxydatifs du système vasculaire.

9. Les nouveaux traitements antihypertenseurs

En thérapeutique, une variété de médicaments antihypertenseurs sont utilisés seuls et en combinaison pour diminuer la pression artérielle. L'arsenal des traitements antihypertenseurs comprend les diurétiques, les inhibiteurs calciques, les β-bloquants et les inhibiteurs du système rénine-angiotensine- aldostérone (RAAS) qui agissent à différents niveaux de la cascade du RAAS (Paulis et al., 2012). Mais au cours des dernières années, le développement des médicaments antihypertenseurs s'est fait dans l'un ou l'autre des domaines suivants : il s'agit notamment des voies alternatives du système rénine-angiotensine aldostérone (RAAS), les mécanismes centraux du RAAS, les nouveaux antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes, les inhibiteurs de la rénine, les inhibiteurs de la synthèse de l'aldostérone, le blocage des neurotransmetteurs sympathiques, et la réduction gastro-intestinale du sodium (Stewart et al., 2019).

9.1. Les médicaments ciblant le système rénine angiotensine aldostérone (RAAS)

9.1.1. Les inhibiteurs de l'aldostérone synthase et les antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes

L'aldostérone est un minéralocorticoïde qui régule l'homéostasie des électrolytes et du volume chez les sujets normaux et, lorsqu'il est élevé, peut contribuer au développement de l'hypertension et de diverses pathologies associées, y compris l'hypertrophie myocardique et la fibrose et l'insuffisance cardiaque (Story, 2008). Le principal effecteur de l'action de l'aldostérone est le récepteur minéralocorticoïde (MR), un facteur de transcription nucléaire qui s'exprime à des niveaux élevés dans le canal collecteur cortical du rein (Figure 21). Les MR activés stimulent l'expression des canaux sodiques, entraînant une augmentation de la réabsorption du sodium et de l'eau dans le rein et une perte de potassium, conduisant à une forme d'hypertension à volume accru (Oparil and Schmieder, 2015). Les MR ont été des cibles

thérapeutiques dans le traitement de l'hypertension depuis plus d'un demi-siècle: le premier antagoniste des MR (MRA), la spironolactone, est apparu au début des années 1960 (Cranston and Juel-Jensen, 1962). Cependant, la prise de conscience des effets indésirables de certains antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes a conduit au développement d'une nouvelle classe d'agents anti-aldostérone, les inhibiteurs sélectifs de l'aldostérone synthase.

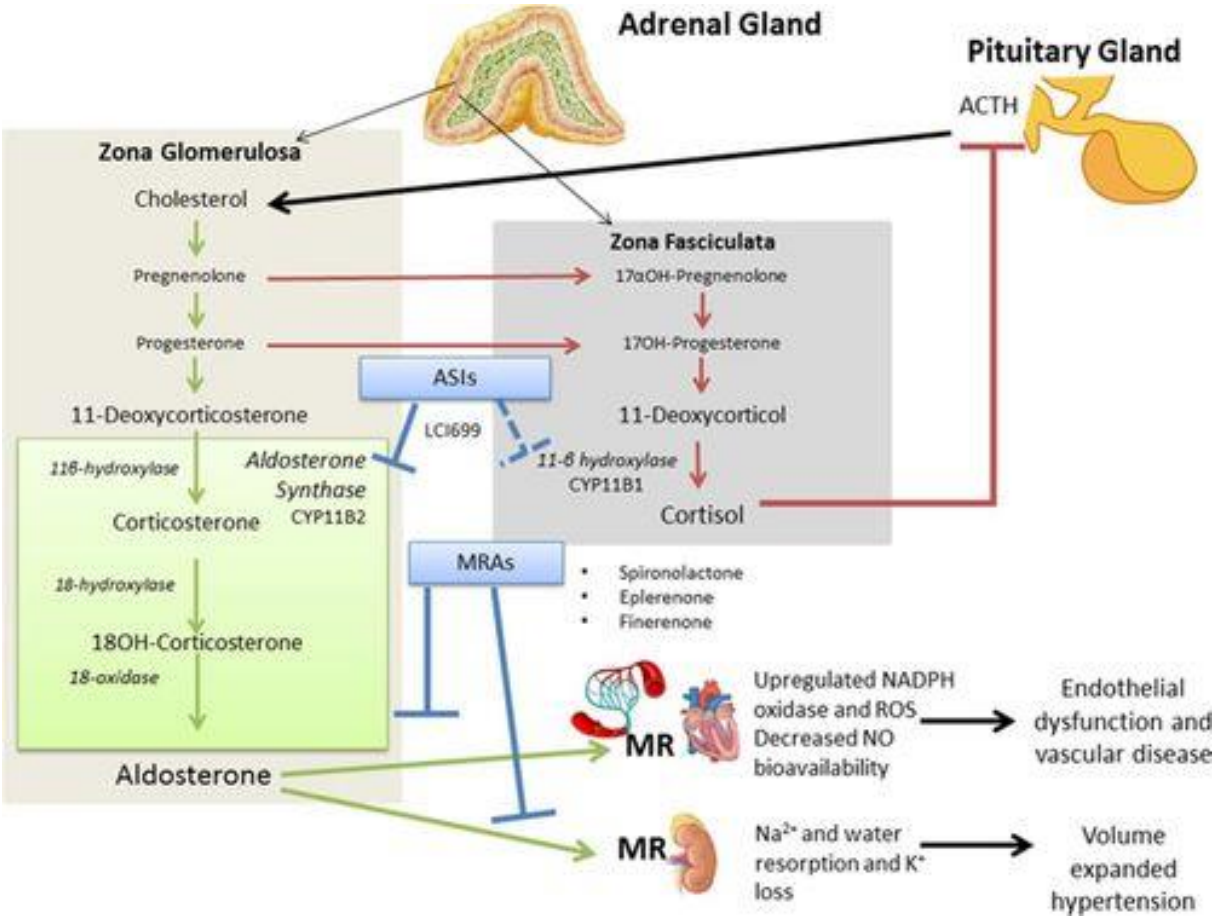


Figure 21 : Mécanisme d'action des agents anti-aldostérone (Oparil and Schmieder, 2015). Les inhibiteurs d'aldostérone synthase (ASI), tels que LCI699, inhibent l'étape de limitation de la vitesse de production d'aldostérone. Les antagonistes des récepteurs des minéralocorticoïdes (MRA), tels que la finérénone, entrent en compétition pour les sites de liaison de l'aldostérone et diminuent efficacement la pression artérielle et la transcription génique médiée par l'aldostérone. Les deux approches se sont révélées utiles dans le traitement de l'hypertension et des maladies vasculaires médiées par l'aldostérone. Synthèse d'aldostérone, vert ; synthèse de cortisol, rouge ; médicaments anti-aldostérone, bleus.

9.1.2 Activateurs de l'axe enzyme de conversion de l'angiotensine2 / angiotensine (1–7) / récepteur MAS

Le système classique rénine-angiotensine (RAS) a été largement étudié pendant des décennies et a donné lieu à de nombreuses thérapies efficaces contre l'hypertension et ses complications. Plus récemment, des composants du RAS qui jouent des rôles de contre-régulation ont été identifiés, caractérisés et proposés comme cibles thérapeutiques pour l'hypertension et d'autres formes de maladies cardiovasculaires (Ferreira et al., 2012; Jankowski et al., 2007) (Figure 22).

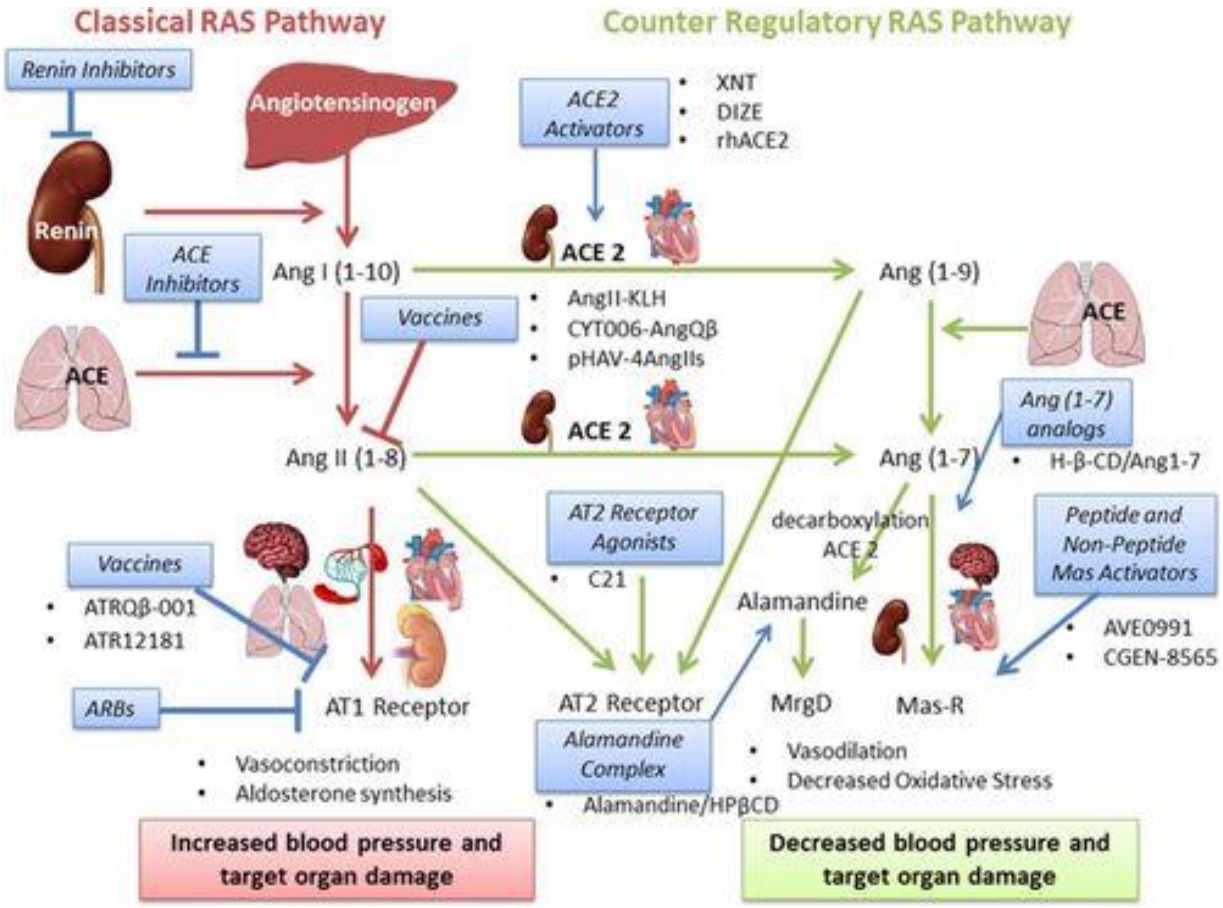


Figure 22 : Médicaments ciblant les systèmes classiques et contre-régulateurs du système rénine-angiotensine (RAS) (Oparil and Schmieder, 2015). L'activation de la voie RAS classique augmente la pression artérielle (PA) et les lésions des organes cibles, et cette voie est la cible de nombreux antihypertenseurs actuellement disponibles, y compris les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA). De nouvelles approches de l'inhibition du RAS, y compris des vaccins ciblant l'angiotensine II (Ang II) et le récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT1), sont en cours d'évaluation dans des essais précliniques et cliniques. En revanche, l'activation

de la voie RAS contre-régulatrice décrite plus récemment diminue la pression artérielle et les lésions des organes cibles, et les médicaments qui activent cette voie commencent à être développés comme agents antihypertenseurs. Il s'agit notamment des activateurs ACE_2, des analogues de l'Ang (1–7), des agonistes du récepteur AT_2, des activateurs peptidiques et non peptidiques du récepteur Mas et de l'alamandine couplée avec la cyclodextrine.

9.2. Les inhibiteurs de l'absorption du sodium

Avec la reconnaissance de l'importance du sodium alimentaire dans la pathogenèse de l'hypertension, une nouvelle voie récemment explorée est l'inhibition de l'absorption du sodium alimentaire. L'antiporteur sodium/hydrogène 3 (NHE3) est un transporteur exprimé sur la bordure en brosse des cellules épithéliales intestinales et est responsable du transport intracellulaire de l'hydrogène et extracellulaire du sodium. Des études réalisées sur les inhibiteurs du NHE3 tels que le Ténapanor ont montré une baisse de la pression artérielle avec une augmentation prévisible de l'excrétion sodique dans les selles et une diminution de l'excrétion sodique urinaire sans effets indésirables majeurs (Rosenbaum et al., 2018).

9.3. Les inhibiteurs de la dopamine-bêta-hydroxylase

Le système nerveux sympathique joue un rôle clé dans la vasoréactivité, et les récepteurs adrénergiques périphériques sont depuis longtemps la cible du traitement pharmacologique antihypertenseur avec des médicaments tels que les bêta-bloquants. La noradrénaline, l'une des principales catécholamines vasoactives de ce système, est générée à partir du précurseur dopamine par la dopamine-béta hydroxylase (DBH). Traditionnellement, on évite de cibler la biosynthèse de la noradrénaline et de la dopamine en raison du rôle multiforme que ces neurotransmetteurs jouent dans le système nerveux central et du risque d'effets indésirables graves. Récemment, cependant, des inhibiteurs de la DBH sélectifs au niveau périphérique ont été mis au point ; ils diminuent la production périphérique de noradrénaline sans avoir d'impact significatif sur leur contrepartie centrale (Stewart et al., 2019). Etamicastat a été le premier inhibiteur de la DBH sélectif au niveau périphérique mis

au point et il a été démontré qu'il diminuait le rapport noradrénaline/dopamine dans les tissus périphériques des rats sans traverser la barrière hémato-encéphalique (Igreja et al., 2015).

9.3. Les inhibiteurs de l'aminopeptidase A

En plus de l'effet périphérique sur le système vasculaire et le tissu rénal, des peptides vasoactifs tels que l'Ang II et leurs récepteurs ont été localisés dans le système nerveux central (SNC). L'angiotensine III (Ang III) est convertie de l'Ang II par l'enzyme aminopeptidase A (APA) et joue un rôle important dans la régulation centrale de la pression artérielle. La perfusion intracérébrale d'Ang III entraîne une réduction durable de la pression artérielle et une réponse plus importante qu'une perfusion comparable d'Ang II. L'Ang II et l'Ang III agissent tous deux par l'intermédiaire du récepteur AT_1 qui se trouve dans le cerveau, mais l'affinité de l'AT_1 pour l'Ang III dans le SNC est supérieure à celle de l'Ang II. Le RB150 est un inhibiteur de l'APA disponible par voie orale qui traverse la barrière hémato-encéphalique où il est converti en son composé actif EC33. Administré par voie intraveineuse à des rats, le RB150 a entraîné une diminution de l'activité de l'Ang II et une réduction soutenue de la pression artérielle sur 24 heures (Fournie-Zaluski et al., 2004).

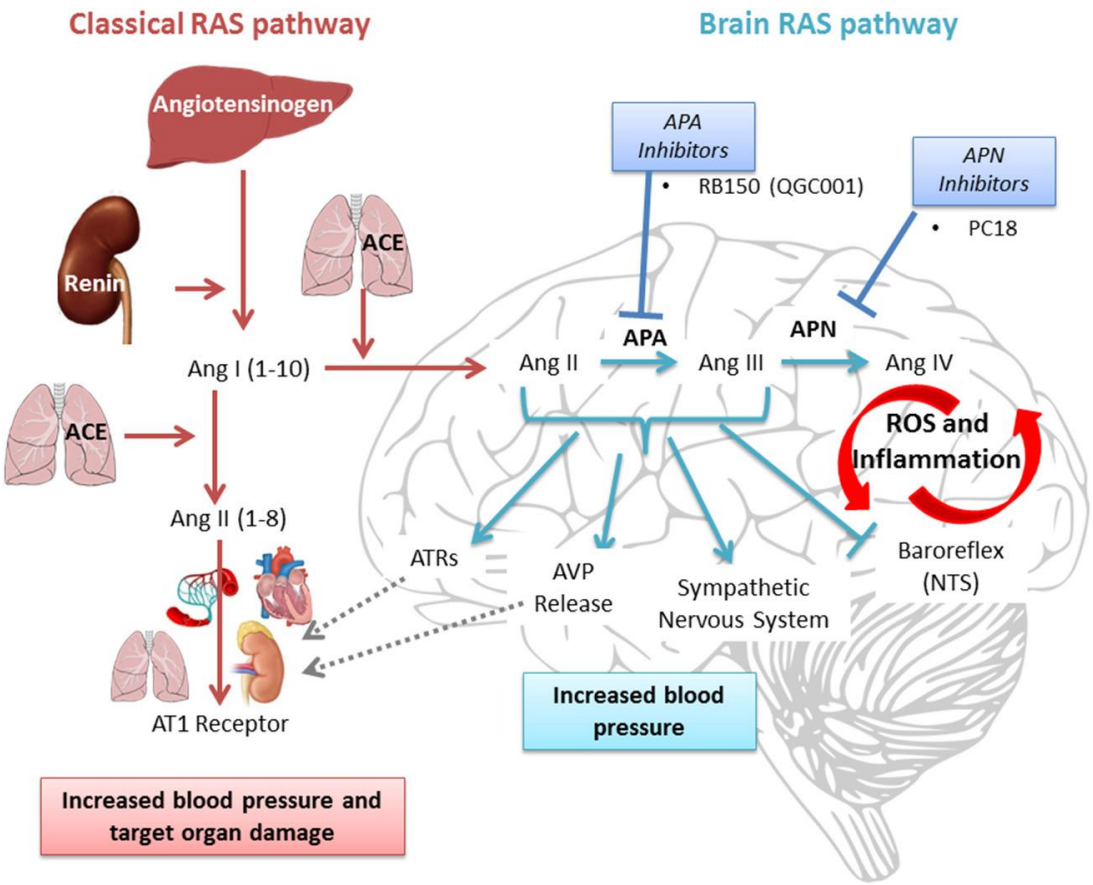


Figure 23 : La voie du système rénine-angiotensine (RAS) cérébral (Oparil and Schmieder, 2015). L'activation du RAS cérébral en réponse au stress oxydatif et à l'inflammation augmente le débit du système nerveux sympathique et la libération de l'arginine vasopressine (AVP) et inhibe le baroréflexe, augmentant ainsi la PA. L'angiotensine (Ang) III, qui est générée à partir de l'Ang II par l'aminopeptidase A (APA), est le peptide presseur prédominant dans le cerveau dans les modèles animaux, et l'APA est une cible thérapeutique pour le traitement de l'hypertension. Il a été démontré que l'inhibiteur de l'APA, le RB150 (QGC 001), traverse la barrière hémato-encéphalique et abaisse la pression artérielle dans des modèles animaux ; des études exploratoires sont en cours chez l'homme. Rouge, RAS classique ; bleu clair, voie SRA cérébrale ; bleu, médicaments ; les flèches en pointillé indiquent la diaphonie entre les systèmes. APN : aminopeptidase N ; AT1, angiotensine de type 1 ; ATR, récepteur de l'angiotensine ; et ROS, espèces réactives de l'oxygène.

9.3. Effet couplé des inhibiteurs de la néphrilysine et antagonistes des récepteurs de l'angiotensine

La néprilysine est une endopeptidase neutre et son inhibition augmente la biodisponibilité des peptides natriurétiques, de la bradykinine et de la substance P, ce qui entraîne des effets natriurétiques, vasodilatateurs et antiprolifératifs. De concert, ces effets sont susceptibles de produire une puissante réponse de décharge ventriculaire et antihypertensive

(Bavishi et al., 2015). Le LCZ696 est un médicament associant le sacubitril, un inhibiteur de la néprilysine, et le valsartan, un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine. Le résultat est une réduction de la dégradation des peptides vasodilatateurs avec une atténuation simultanée de l'effet vasoconstricteur. Supasyndh et al. ont réalisé une étude sur des patients asiatiques traités par LCZ696 pendant 52 semaines et les résultats obtenus ont montré une diminution de la pression artérielle systolique de 24,7 mmHg (Supasyndh et al., 2017). Kario et al. ont étudié le LCZ696 dans une petite cohorte de patients souffrant d'hypertension sévère et ont constaté des réductions de la pression artérielle systolique allant jusqu'à 35 mmHg après 8 semaines de traitement (Kario et al., 2016)

Chapitre 3 : Plantes et traitement de l'hypertension

Utilisation et rôle des plantes dans le monde et la médecine traditionnelle

Depuis l'Antiquité, à la recherche de secours pour leur maladie, les gens ont cherché des traitements dans la nature. Les débuts de l'utilisation des plantes médicinales ont été instinctifs, comme c'est le cas pour les animaux (Beyene et al., 2016). Etant donné qu'à l'époque on ne disposait pas d'informations suffisantes, ni sur les raisons des maladies, ni sur quelle plante et comment elle pouvait être utilisée comme remède, tout était basé sur l'expérience. Les plantes ont fourni à l'homme tous ses besoins en termes d'abris, de vêtements, de nourriture, d'arômes et de parfums, et surtout, de remèdes. Les plantes ont formé la base de systèmes sophistiqués de médecine traditionnelle (MT) qui existent depuis des milliers d'années et continuent de fournir à l'humanité de nouvelles structures candidat médicament (Beyene et al., 2016; Gurib-Fakim, 2006; Petrovska, 2012). Les plantes médicinales jouent un rôle important dans les soins de santé primaires dans de nombreux pays d'Afrique subsaharienne pour diverses raisons, notamment le manque de services de santé, les normes culturelles et les croyances traditionnelles (Abdullahi, 2011; Kipkore et al., 2014). De nombreux patients dans ces pays associent la médecine traditionnelle (MT) à la médecine conventionnelle, en particulier ceux qui souffrent de maladies chroniques (Kigen et al., 2013). L'utilisation de la MT est dans la plupart des cas largement répandue et non seulement limitée aux zones rurales ou aux milieux à faible revenu, mais aussi dans les milieux urbains et aisés (Kigen et al., 2019; Kipkore et al., 2014). De plus, depuis le début du 21e siècle, les scientifiques impliqués dans le développement de médicaments favorisent un retour à la nature comme source de pistes pharmaceutiques potentielles (Gechev et al., 2014).

1. *Carissa edulis* et traitement de l'hypertension

1.2. *Carissa edulis* : taxonomie et morphologie

Le genre Carissa L. appartenant à la famille des Apocynaceae contient environ 30 espèces sous forme d'arbustes à feuilles persistantes, de petits arbres. Ils sont largement distribués dans les régions tropicales et subtropicales d'Afrique, d'Asie et d'Australie (Patel, 2015; Ping-tao et al., 1996). La plupart des plantes de Carissa sont utilisées en médecine traditionnelle pour diverses affections, telles que maux de tête, douleurs thoraciques, rhumatismes, œdème, gonorrhée, syphilis, rage (Kaunda and Zhang, 2017).

Carissa edulis (Forssk) Vahl (syn. *Carissa spinarum* L.) est un arbuste épineux vivace répandu en Afrique, en Australie, au Vietnam, au Yémen et en Inde. (Zhang et al., 2010).

Tableau 2 : Taxonomie et morphologie de *Carissa edulis* (Ansari and Patil, 2018)

Taxonomical hierarchy		Morphology
Règne :	Plantae	- Plante : Arbuste épineux, aux branches fourchues, - Taille : 2–3 m, - Bois : Très dur, - Écorce : Brun clair à verte, - Épines : 3,2 cm de long, à la base brune à verdâtres et vers la pointe de couleur brun foncé, - Feuilles : oblongues, 4,5 cm de long, 2,5 cm de large, coriaces, nervation, pennées réticulées ; marge, entière ; pétiole de 3 mm de long ; feuilles exsudant un latex blanc, lorsqu'elles sont arrachées de la tige, - Fleurs : à tige courte, légèrement parfumées, bisexuées, complètes et de couleur blanche, - Fruit : baie ovoïde, de 5–12 mm de longueur, 6 mm de diamètre, verte lorsqu'elle n'est pas mûre et noire brillante lorsqu'elle est complètement mûre.
Sous règne :	Viridaeplantae	
Phylum :	Tracheophyta	
Classe :	Magnoliopsida	
Sous classe :	Asteridae	
Ordre :	Gentianales	
Famille :	Apocynaceae	
Genre :	Carissa	
Espèce :	Edulis.	

Figure 24 : C. edulis, feuilles oblongues aux épines fourchues acérées (Lim, 2012a).

Figure 25 : C. edulis, fruits à différents stades de développement (Lim, 2012b).

1.3. Pertinence ethnopharmacologique et utilisation dans le traitement de l'hypertension artérielle

C. edulis est une plante utilisée dans de nombreux pays du monde. La plante porte des fruits comestibles sucrés, tandis que sa racine et sa feuille piquantes sont utilisées localement à diverses fins médicinales. Parmi celles-ci, le traitement des symptômes du VIH / SIDA, de la tuberculose, des douleurs thoraciques, des rhumatismes, des maux de tête, de la gonorrhée, de

la syphilis, de la rage, comme diurétique, morsure de serpent, paludisme, épilepsie (Kebamo, 2015). Il a également été rapporté qu'elle est utilisée pour traiter la fièvre, la hernie, la drépanocytose, l'ulcère, l'infestation par les vers, la douleur, l'inflammation (Fanta Yadang et al., 2019) et l'hypertension (Olou et al., 2018).

Dans la préparation des remèdes traditionnels contre l'hypertension artérielle au Bénin, les feuilles de C. edulis sont très utilisés (Tokoudagba et al., 2018; Osseni et al., 2016) mais les racines le sont également(Olou et al., 2018). Les utilisations diversifiées, largement reconnues et l'efficacité avérée des préparations de C. edulis en médecine traditionnelle (Kaunda and Zhang, 2017) ont conduit les chercheurs à s'intéresser aux propriétés pharmacologiques de cette plante.

1.4. Etudes pharmacologiques

Des études ont montré que des extraits de C. edulis peuvent contenir des principes biologiquement actifs avec un potentiel diurétique (Nedi et al., 2004), analgésique (Ibrahim et al., 2007), antimicrobien (Ibrahim et al., 2005), antidiabétique (El-Fiky et al., 1996), propriétés sédatives, anticonvulsivantes et anxiolytiques (Yau, 2007; Ya'u et al., 2010, 2008), activité antiplasmodiale, antivirale et hypoglycémique (Alodeani, 2016).

1.4.1. Capacité antioxydante

Le stress oxydatif est un contributeur majeur à de nombreuses maladies cardiovasculaires dont l'hypertension artérielle (Landmesser and Harrison, 2001). Les espèces réactives (radicalaires ou non : anion superoxyde $O_2^{\bullet}$, $HO^{\bullet}$, peroxynitrites $ONOO^-$ hypochlorite ClO^- impliquées dans le stress oxydant sont typiquement produites par des enzymes telles que la NADPH oxydase, la NO synthase découplée, la xanthine oxydase et la myélopéroxydase (Leverve, 2009; Pincemail, 2001; Santilli et al., 2015), activées par des agents pro-inflammatoires tels que les cytokines, les prostaglandines et les LDL oxydées. Pour réduire l'excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et supprimer les dommages oxydatifs,

un apport antioxydant est nécessaire. Les antioxydants sont naturellement riches en composés réducteurs (donneurs d'électrons). Au sein de l'organisme, ils sont capables d'exercer un pouvoir antioxydant (Dangles, 2020) (Figure 26). Plusieurs tests antioxydants sont utilisés pour déterminer le pouvoir antioxydant d'un extrait ou d'une fraction (TEAC, DPPH, FRAP). Les études ont montré que l'extrait aqueux des feuilles de C. edulis a un pourcentage d'activité de piégeage des radicaux DPPH compris entre 58,63 % et 94,67 %, (Fanta Yadang et al., 2019). De plus, l'activité antioxydante de l'extrait de fruits mûrs a aussi montré un potentiel très élevé pour piéger les radicaux DPPH et une activité antioxydante a été observée au premier stade de la maturation des fruits tandis que la teneur totale en flavonoïdes augmente avec la progression de la maturation (Makumbele et al., 2019; Nazareth et al., 2021).

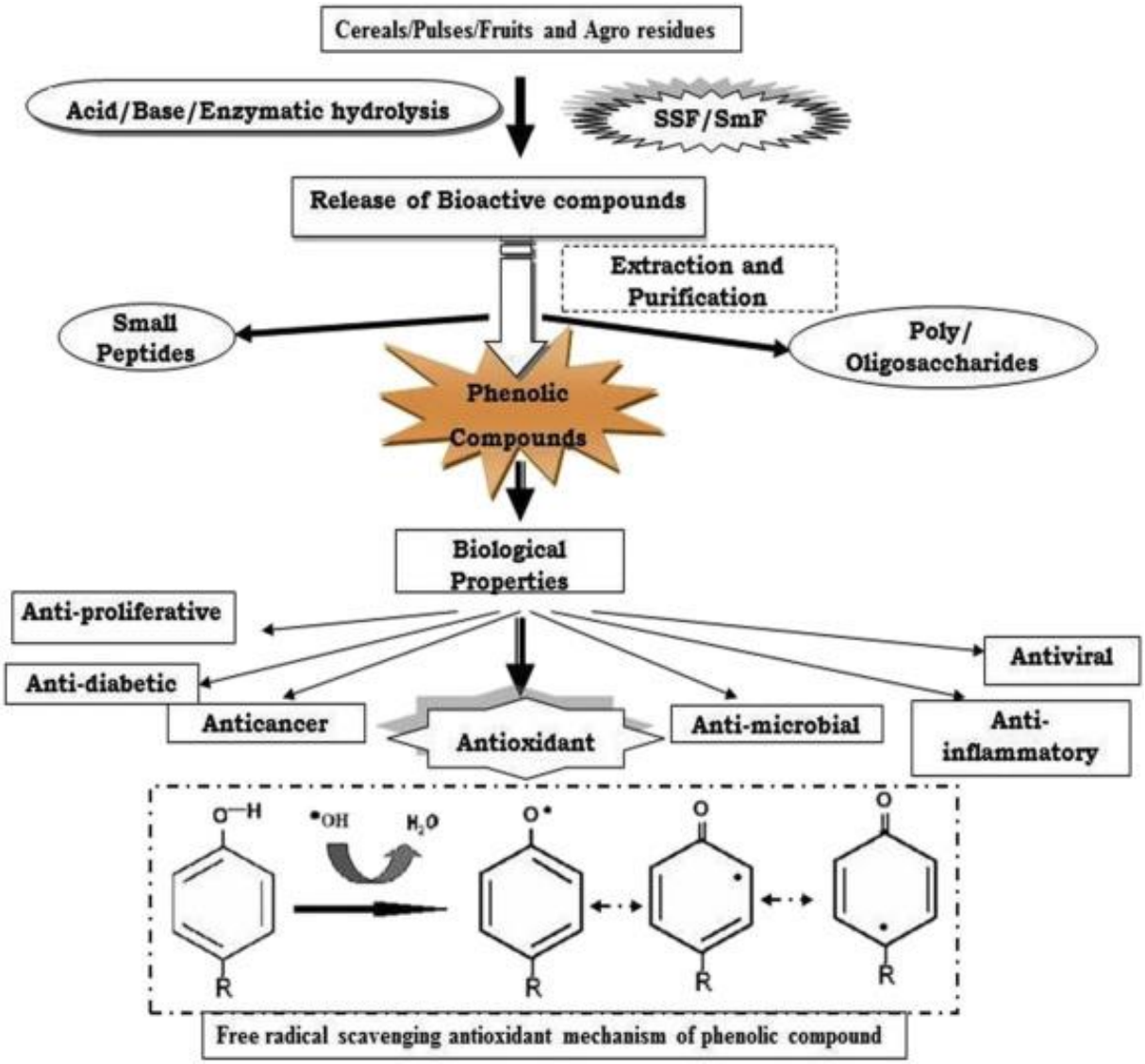


Figure 26 : Diagramme schématique des différentes stratégies d'extraction / production et mécanisme de piégeage des radicaux libres des composés phénoliques (Dey et al., 2016).

1.4.2. Inhibition de la COX-2

La COX-2, une enzyme puissante induite par les cytokines, les mitogènes ou les endotoxines, peut déclencher une inflammation et favoriser la synthèse des prostaglandines, qui exercent des effets pro-inflammatoires dans de nombreux processus pathophysiologiques (Patrignani et al., 2005; Sethi et al., 2019). Au cours des processus inflammatoires l'expression de la COX-2 est favorisée et régulée par des stimuli inflammatoires, notamment le lipopolysaccharide (LPS), l'IL-1, l'IL-6, le TNF, l'IFNγ et l'AA (Sethi et al., 2019).

Liu et *al.* ont récemment étudié l'effet de l'écorce de racine de C. edulis sur l'inhibition de la COX-2. L'indométacine a été utilisé comme contrôle positif. L'extrait brut et quatre fractions ont montré des activités d'inhibition de la COX-2 à des degrés divers. Les fractions acétate d'éthyle (EA) et dichlorométhane (DCM) possédaient les valeurs CI_{50} les plus basses : le DCM (0,5 ± 0,0 µg/ml) et l'EA (0,2 ± 0,0 µg/ml) (Liu et al., 2021) (Figure 27).

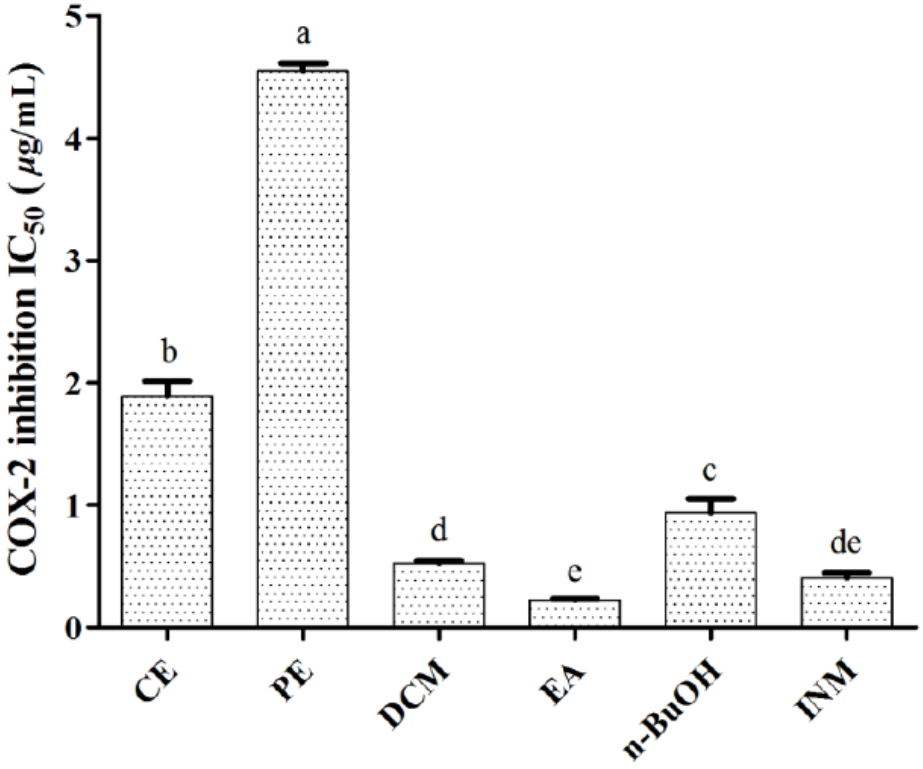


Figure 27 : Activités d'inhibition de COX-2 par des fractions ;CE, extrait brut PE, extrait d'éther de pétrole DCM, extrait au dichlorométhane EA, extrait d'acétate d'éthyle et n-BuOH, extrait butanolic de C. edulis (Liu et al., 2021) L'indométacine (INM) a été utilisée comme contrôle positif. Les données sont exprimées en moyenne ± SD (n = 3). Les moyennes étiquetées par des lettres différentes (a – e) sont significativement différentes à un niveau de p <0,05 (n = 3) one-way ANOVA.

1.4.3. Cicatrisation des plaies et potentiel antimicrobien

L'effet de l'extrait méthanolique des racines de C. edulis obtenu par macération à froid a été évalué par (Sanwal and Chaudhary, 2011) sur un modèle de brûlure chez la souris. Les résultats de leurs études ont montré que l'extrait de racine de *Carissa edulis* a une activité de cicatrisation significative, comme en témoigne le taux de contraction et d'épithétisation de la

plaie. De plus, les expressions de l'hydroxyproline et les paramètres histologiques étaient également en corrélation avec le modèle de guérison observé. L'extrait méthanolique a également montré une activité antimicrobienne significative contre Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Streptococcus sp. et Aspergillus niger. (Sanwal and Chaudhary, 2011). L'activité antimicrobienne des extraits aqueux des feuilles et des fruits a aussi été étudiée en utilisant Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa et Bacillus subtilis. Les résultats ont montré que l'extrait de feuilles était plus actif que l'extrait de fruits et les organismes à Gram positif étaient plus sensibles que les organismes à Gram négatif. La concentration inhibitrice minimale pour E. coli et B. subtilis était de 4,0 % w / v pour l'extrait aqueux de fruits tandis que celle des feuilles était de 3,0 % w / v pour les mêmes organismes. Un pourcentage de destruction de 99,52 % a été obtenu pour B. subtilis et 91,36 % pour E. coli avec l'extrait de feuilles par rapport à celui de l'extrait de fruits où un pourcentage de destruction de 93,6 % a été obtenu pour B. subtilis et 56,4 % pour E. coli à 120 min (Ibrahim et al., 2010).

1.4.4. Activité antivirale

Tolo et al. ont étudié l'activité antivirale de C. edulis. Ces travaux ont montré que l'extrait aqueux d'écorce de racine de C. edulis contient des agents potentiels ayant une activité contre le virus Herpès simplex (HSV). L'extrait a été évalué pour l'activité anti-HSV in vitro et in vivo. Les résultats ont montré que les souches sauvages et résistantes de HSV étaient sensibles à l'extrait. Les souches résistantes étaient encore plus sensibles à l'extrait que les souches sauvages. Le test de réduction du rendement du virus qui simule un environnement d'infection in vivo réalisé sur un modèle murin utilisant des souris infectées par voie cutanée avec des souches de HSV de type sauvage ou résistantes a démontré que l'extrait à la dose orale de 250 mg/kg, a retardé de manière significative l'apparition des infections de HSV de plus de

50 %. Le test de réduction du rendement du virus a également confirmé les observations du test d'inhibition de la plaque sur l'activité anti-HSV (Tolo et al., 2006).

1.4.5. Activité antidiabétique

L'administration orale d'extrait de feuilles de C. edulis (2 g/kg de poids corporel) à des rats diabétiques à la streptozotocine (STZ) a abaissé la glycémie qui est passée après 3h de traitement de 212.70 $\pm$ 17.96 mg/dl à 161.82 $\pm$ 9.79 mg/dl. On a découvert que C. edulis présentait une activité hypoglycémique chez des rats diabétiques à la streptozotocine (STZ) (El-Fiky et al., 1996).

1.4.6. Activité anti nociceptive

Mworia et al ont montré dans leur étude que l'extrait d'acétone des feuilles de C. edulis avait un effet antinociceptif significatif en réduisant le temps de léchage de patte au formol sur des souris albinos chez qui la douleur a été induite expérimentalement en utilisant du formol et de l'acide acétique, par rapport au médicament de référence, le diclofénac sodique. Les souris ont reçu par injection intrapéritonéale des doses de 50 et 100 mg/kg de l'extrait et trente minutes plus tard, ils ont reçu des injections de 0,01 ml de formol à 2,5% dans la région sous-plantaire de la patte arrière gauche et de 0,4 ml d'acide acétique à 5% dans l'autre région. (Mworia et al., 2015).

1.4.7. Activité anticancéreuse

Il a également été constaté que l'extrait aqueux de la tige de C. edulis et sa fraction n-butanolique ont un potentiel anticancéreux. Les deux ont inhibé la prolifération cellulaire des lignées cellulaires cancéreuses humaines HL-60. Les cellules traitées avec une fraction de n-butanol ont présenté une inhibition maximale de la croissance ayant une valeur de concentration inhibitrice (CI_{50}) de 34,58 ± 0,91 µg/ml. Cela fournit des informations précieuses sur la nature pro-apoptotique de C. edulis (Sehar et al., 2011).

1.4.8. Activité hépato protectrice

L'extrait éthanolique des feuilles de C. edulis a un effet contre l'hépatotoxicité induite par le diméthoate chez les cobayes mâles ; ce qui peut être bénéfique pour surmonter la toxicité et les effets secondaires associés aux troubles hépatiques dus à une intoxication aux pesticides (Al-Awthan and Salem Baha, 2019).

Des études similaires ont été menées par Hegde et Joshi. Ils ont sélectionné des racines de C. edulis et évalué l'effet hépato protecteur potentiel. L'effet des extraits éthanoliques de racines de C. edulis sur l'hépatotoxicité induite le chloroforme (CCl4) et par le paracétamol ont été évalués. Les résultats ont montré une élévation significative des taux d'enzymes impliqués dans les atteintes hépatiques au niveau du groupe témoin, comme la teneur en SGOT, SGPT et SALP des animaux intoxiqués par CCl4/PCM. Les animaux prétraités avec l'extrait (100, 200 et 400 mg / kg) ont montré une hépato protection significative en diminuant les enzymes marqueurs sériques de manière dose-dépendante (Hegde and Joshi, 2010).

1.4.9. Activité myorelaxante

Les extraits aqueux d'écorce de racine de C. edulis possèdent un effet myorelaxant significatif sur le jéjunum de lapin isolé. Cette activité semble être médié par la stimulation de la libération du NO par la NO synthase mais pas par la voie de la guanylyl cyclase soluble dépendante de l'oxyde nitrique. (Lincone et al., 2019).

1.4.10. Propriétés phyto et physico-chimiques des fruits

Les fruits de C. edulis sont charnus, ovoïdes, de 6 à 11 mm de diamètre, de baies rouges à noires violacées et à deux à quatre graines. Ils ont des propriétés phénoliques, antioxydantes et physico-chimiques qui sont affectées par les étapes de maturation. Une variabilité significative a été observée pour les propriétés antioxydantes, phénoliques et physicochimiques (couleur, solubilité totale du solide et pH) entre les trois stades de maturation des fruits de C. edulis. Bien que les baies mûres de C. edulis soient généralement plus comestibles au stade

final de la maturation, une plus grande activité antioxydante a été observée au premier stade de la maturation tandis que la teneur totale en flavonoïdes augmentait avec la progression de la maturation (Makumbele et al., 2019).

1.5. Criblage phytochimique et molécules isolées

1.5.1. Criblage phytochimique

Les études réalisées sur les feuilles de C. edulis ont révélées la présence de saponines, flavonoïdes, tanins, anthraquinones, glycosides cardiaques (Ya'u et al., 2013), mais aussi des composés phénoliques, des alcaloïdes, des stérols et des terpénoïdes (H Jorum and M Piero, 2016). Une concentration élevée de contenu phénolique total a été observée dans les extraits aqueux et méthanoliques des feuilles comparativement à l'extrait hydroéthanolique, mais pas de manière significative. Les flavonoïdes étaient plus élevés dans les extraits hydroéthanoliques et méthanoliques. Des tanins ont également été trouvés en grande quantité dans les deux extraits (Fanta Yadang et al., 2019). L'extrait méthanolique était aussi riche en phytostérols, protéines, phénols, saponines, stéroïdes ; et l'extrait aqueux contenait des protéines, phénols, tanins et saponines. L'extrait d'éther de pétrole a été testé positif pour les terpénoïdes et les stéroïdes ; l'extrait de chloroforme contenait des terpénoïdes et des phytostérols et l'extrait d'acétate d'éthyle a été testé positif pour les flavonoïdes, les protéines et les stéroïdes (Janardhan et al., 2015).

Le criblage phytochimique réalisé sur les écorces de racine de C. edulis a révélé la présence d'alcaloïdes, de stérols, de résine (Abdu et al., 2008), de flavonoïdes, de glycosides, de saponines, de stéroïdes, de tanins et de terpénoïdes (Leonard et al., 2016). Dans des conditions de congélation et de séchage à l'air, des niveaux plus élevés de composés phénoliques totaux que d'alcaloïdes totaux ont été observés (Nantongo et al., 2018). Alors que plus d'alcaloïdes ont été trouvés dans les feuilles par rapport à l'écorce, il n'y avait aucune différence d'abondance de phénols (Nantongo et al., 2018).

Les fruits secs de C. edulis contenaient du diterpène, des terpénoïdes, des glucides, des acides aminés et des résines dans l'extrait d'éther de pétrole tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle contenait des flavonoïdes, des glycosides, des composés phénoliques, du phytostérol, du diterpène, des terpénoïdes, de l'anthocyanine, des glucides, des acides aminés et des résines (Fowsiya and Madhumitha, 2017). Les extraits d'eau et d'éthanol ont montré la présence de alcaloïdes, flavonoïdes, coumarine, du diterpène, des terpénoïdes, des glucides, des acides aminés et des résines (Fowsiya and Madhumitha, 2017).

L'extrait aqueux de la tige de C. edulis a montré la présence des composés suivant : alcaloïdes, terpénoïdes, phénols, anthraquinones et saponines (Njau et al., 2017). Les extraits de dichlorométhane et d'éther de pétrole ont montré une forte présence de la plupart des composés phytochimiques, sauf les saponines. L'extrait d'acétate d'éthyle a montré une faible présence de composés phytochimiques testés, sauf les phénols et saponines qui étaient abondants. L'extrait de méthanol a montré une absence d'alcaloïdes et de saponines (Njau et al., 2017).

1.5.2. Molécules isolées

1.5.2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes ne sont pas des nutriments essentiels pour les humains. Cependant, étant donné que les êtres humains consomment de la nourriture pour survivre, tout effet biologique provenant de composants alimentaires s'accumulera au cours de la vie. Des études in vitro et sur des modèles animaux ont d'abord suggéré, et maintenant des essais cliniques (185 études sur les flavonoïdes sont en cours, dont 41 sont axées sur les maladies cardiovasculaires ; voir https://clinicaltrials.gov/) commencent à prouver, les premières associations épidémiologiques entre les aliments riches en flavonoïdes et la baisse des risques de maladie (Fusi et al., 2020). Les flavonoïdes peuvent prévenir ou même traiter les maladies cardiovasculaires (Ciumărnean et al., 2020; Perez-Vizcaino and Duarte, 2010). D'un point de vue du mécanisme, les flavonoïdes induisent leurs effets antihypertenseurs en augmentant la

biodisponibilité du NO, en réduisant le stress oxydatif des cellules endothéliales ou en modulant l'activité des canaux ioniques vasculaires (Maaliki et al., 2019) (Figure 28). Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques naturels appartenant à six sous-groupes principaux : les flavanones, les flavan-3-ols (flavanols), les flavonols, les flavones, les anthocyanes et les isoflavones (Clark et al., 2015). La diversité structurelle entre les sous-groupes de flavonoïdes produit une myriade de différentes propriétés bénéfiques telles que des activités antioxydantes, anti hypertensives, anti-inflammatoires et/ou antithrombotiques (During and Larondelle, 2013; Perez-Vizcaino and Duarte, 2010).

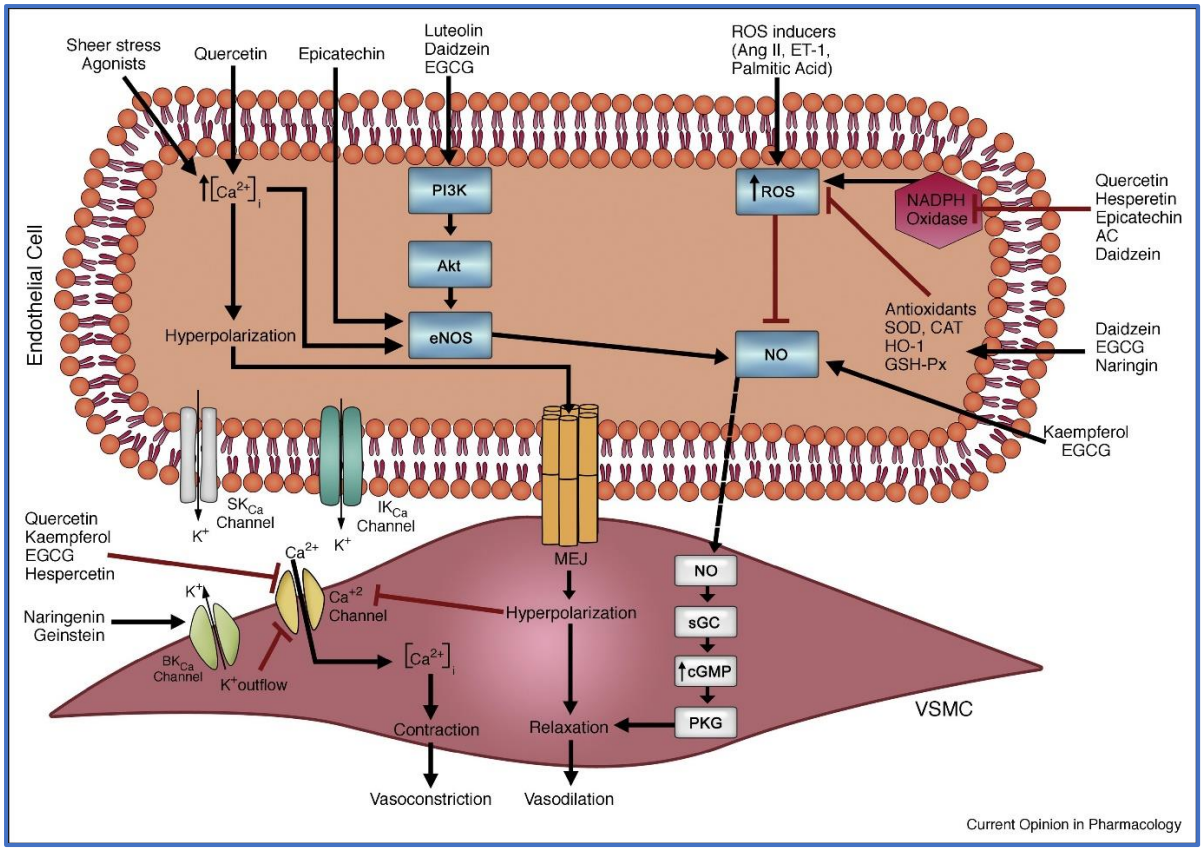


Figure 28 : Effet des flavonoïdes sur l'hypertension et les mécanismes sous-jacents (Maaliki et al., 2019). Au niveau de l'endothélium, les flavonoïdes exercent leurs effets vasorelaxants principalement en augmentant les niveaux du NO via de multiples mécanismes. Certains flavonoïdes augmentent la biodisponibilité du NO en réduisant le stress oxydatif, soit en diminuant la production des ROS, soit en augmentant la capacité antioxydante. Alternativement, d'autres flavonoïdes augmentent l'activation de eNOS via la cascade PI3K/Akt/eNOS ou par des niveaux croissants de $[Ca^{2+}]_i$. L'augmentation endothéliale de $[Ca^{2+}]_i$ conduit également à l'activation des canaux K^+ activés par Ca^{2+} (principalement des canaux K^+ activés par Ca^{2+} à petite conductance (SK_{Ca2+}). et des canaux K^+ activés par Ca^{2+} à conductance intermédiaire (IK_{Ca2+}). L'activation de ces canaux produit un courant sortant de K^+, ce qui conduit à une hyperpolarisation des cellules endothéliales. Cette hyperpolarisation

est ensuite véhiculée vers les VSMC via des jonctions myoendothéliales (MEJ), inhibant ainsi l'influx de Ca^{2+} dans les VSMC, et conduisant finalement à une vasorelaxation.

Les flavonoïdes peuvent également affecter les VSMC directement et plutôt indépendamment de leurs effets sur les cellules endothéliales, comme cela a été établi dans les vaisseaux dénudés en endothélium. Les flavonoïdes peuvent induire une vasorelaxation par l'activation des canaux BK_{Ca2+} ou l'inhibition des canaux Ca^{2+}. Les canaux BK_{Ca2+} agissent comme des inhibiteurs de l'afflux de [Ca^{2+}] i, et limitent ainsi la constriction, tandis que les canaux Ca^{2+} provoquent une contraction et précipitent ainsi une vasoconstriction.

Les flavonoïdes sont une classe importante de substances naturelles, à structure polyphénolique, caractérisées par une structure générale constituée de deux cycles benzéniques (deux cycles phényle et un cycle hétérocyclique). Les trois composants conduisent à la formation de la structure de base des flavonoïdes, c'est-à-dire du noyau flavan (Ciumărnean et al., 2020). Les flavonoïdes présents dans C. edulis se présentent principalement sous la forme de leurs dérivés glycosylés. Les groupements sucre les plus courants comprennent le β-D-glucose et l'α-L-rhamnose et les glycosides sont généralement des –O- glycosides dans lesquels le groupement sucre se lie généralement au groupe hydroxyle de l'aglycone en C-3. Les aglycones (les formes dépourvues de fragments de sucre) sont moins fréquents. L'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de C. edulis a révélé la présence de quatre glucosides de flavonol connus, dont le kaempférol 3-O- β-D-glucopyranoside, la quercétine 3-O- β-D-glucopyranoside, la rhamnétine 3-O- β-D-glucopyranoside et l'isorhamnetine 3-O- β-D-glucopyranoside. De l'extrait butanolique, l'isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside (2 "→ 1" ') - L-rhamnopyranoside, 1- {1- [2- (2 hydroxypropoxy) propoxy] propan-2-yloxy} propan-2-ol et le (+) butyl-O-a-L-rhamnoside ont été isolés (Al-Youssef and Hassan, 2017). Les flavonoïdes identifiés dans les fruits de C. edulis comprenaient la rutine, la catéchine, le dimère de procyanidine, le procyanidintrimer, la quercétine-3-O-glucosyl-xyloside, la quercétine-3-O-robinobioside, la quercétine-3-O-glucoside et la quercétine-3-OH-3-méthylglutaryl-glucoside (Makumbele et al., 2019).

1.5.2.2. Les composés phénoliques

Les études ont montré que les racines de C. edulis contiennent la 2-hydroxyacétophénone (Bentley et Brackett, 1984), les phénoliques solubles et les pro anthocyanidines insolubles (Reed, 1986). Les acides phénoliques identifiés dans les fruits de C. edulis étaient l'acide quinique, le protocatechuoyl-hexose, l'acide néochlorogénique, l'acide chlorogénique, l'acide cryptochlorogénique et l'acide dicaféoylquinique (Makumbele et al., 2019).

1.5.2.3. Les composés volatils

L'huile des racines de C. edulis du Bénin a été analysée par GC/MS et six composants ont été identifiés. Le constituant principal était le 2-acétylphénol (92,7 %) avec des quantités moindres de limonène (1,2 %), y-eudesmol (1,2 %), a-pinène (0,3 %), sabinène (0,3 %) et myrcène (0,8 %) (Moudachirou et al., 1998).

1.5.2.4. Les sesquiterpenes

Les sesquiterpènes sont connus pour posséder une activité antimicrobienne, antipaludique, anticancéreuse et anti-inflammatoire (Al-Youssef and Hassan, 2014a). Neuf sesquiterpènes de type eudesmane et deux sesquiterpènes de type germacrane ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique des racines de C. edulis. Ils comprennent carissone, cryptoméridiol, β-eudesmol, 6α-carissanol, 6β-carissanol, 2α-carissano, 4-Epi-aubergénone, déshydrocarissone et germacrénol (Achenbach et al., 1985, 1983). Un sesquiterpène germacrane appelé carénone a été isolé de l'extrait d'éther de pétrole de la tige de C. edulis a (Jagadeeshwar Rao et al., 2005).

1.5.2.5. Les lignanes

À partir des tiges de C. edulis, 8 lignanes nommés (-) - nortrachelogenin, (-) - secoisolaricirestinol, (-) - carissanol, (-) - carinol, (-) olivil, (+) - cycloolivil, (+) - 8-hydroxypinorésinol, (+) pinorésinol ont été isolés (Wangteeraprasert et al., 2012) et le (+) - lariciresinol a été isolé à partir de la racine (Achenbach et al., 1983). La (-) nortrachelogénine

a montré une activité antiplasmodique (Kebenei et al., 2011) et la (+) - nortrachelogenine, l'énantiomère de la (-) - nortrachelogenine, s'est avérée posséder une activité antitumorale (Peuhu et al., 2013). Les propriétés anti-inflammatoires de la nortrachelogénine ont également été révélées (Laavola et al., 2017). La nortrachelogénine a supprimé l'activation alternative des macrophages induite par IL-4 et IL-13 (Pemmari et al., 2018).

1.5.2.6. Les carissaedulosides

Dix glycosides non décrits auparavant, les carissaedulosides A–J (1–10) faisant référence à six phénylpropanoïdes apiosylés (1–6), un hybride coumarine-sécoiridoïde (7) et trois lignanes de furofurane (8–10) ont été isolés des écorces de racines de C. edulis (Kaunda et al., 2020) (Figure 29).

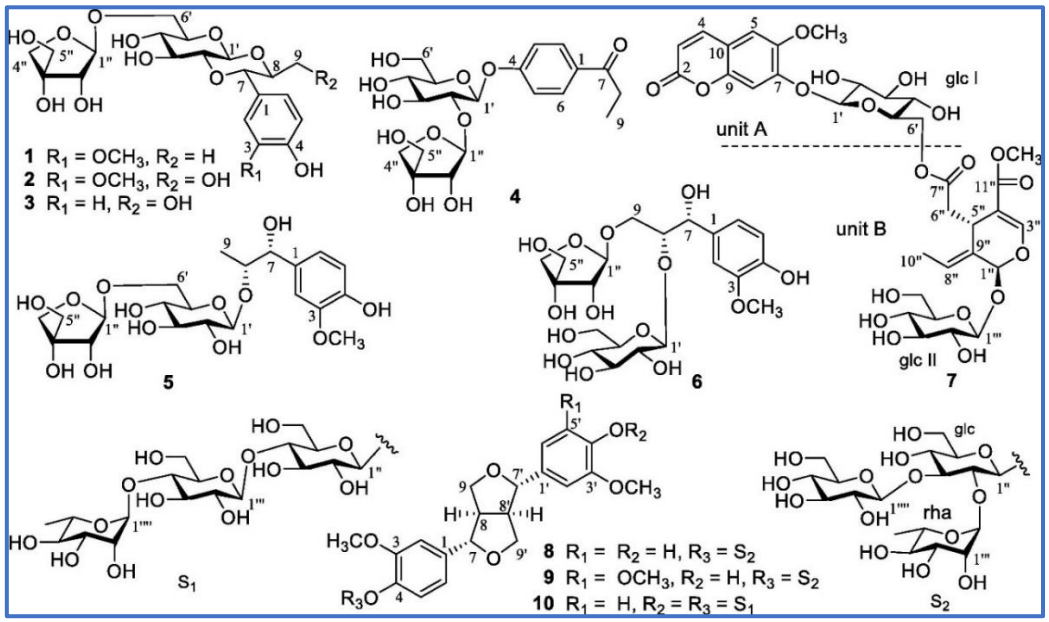


Figure 29 : Structures de nouveaux composés, 1–10, isolés de C. edulis (Kaunda et al., 2020)

1.6. Etudes de toxicité

L'extrait aqueux des feuilles de C. edulis n'a pas d'effet toxique à la dose de 2000 mg/kg sur des rats Wistar l'ayant reçu quotidiennement (Osseni et al., 2016). L'écorce des racines de C. edulis n'a pas présenté d'effets létaux après l'administration orale de l'extrait éthanolique

standardisé à des doses de 1 600, 2 900 et 5 000 mg/kg à des rats Wistar. Aucun changement de comportement n'a été observé chez ces rats. (Ya'u et al., 2013).

De même un traitement subaigu (28 jours) de rats Wistar avec l'extrait éthanolique d'écorce des racines de C. edulis n'a pas affecté l'hématopoïèse et la leucopoïèse chez le rat. Les doses d'extrait administrées par voie orale n'étaient pas toxiques et n'interféraient pas avec la production de globules rouges circulants, de globules blancs et de plaquettes (Ya'u et al., 2013). L'extrait hydroalcoolique de racines de C. edulis n'induit pas d'effet toxique lorsqu'il est administré à 500 mg et 1000 mg/kg à des rats Wistar pendant 28 jours (Dossou-Yovo et al., 2020). L'ingestion orale subaiguë de 28 jours de l'extrait aqueux des feuilles de C. edulis montre une architecture normale de la structure histologique. Aucun changement néfaste de la morphologie des foies et des reins n'a été observé dans le groupe traité par rapport au groupe témoin (Osseni et al., 2016).

L'évaluation de la toxicité subchronique de C. edulis a été réalisée par Osseni et al. Cette étude n'a montré aucun décès des rats Wistar après 90 jours de traitement à 7,87 ; 31,25 et 125 mg/kg de l'extrait. Mais une utilisation prolongée de C. edulis pourrait altérer certaines fonctions de l'organisme, en particulier les fonctions hépatiques, rénale et hématopoïétique. En effet, des changements ont été observés parmi les paramètres de la fonction rénale, notamment une augmentation des taux de créatinine et d'urée. De plus, l'analyse hématologique a montré une augmentation du nombre d'érythrocytes, des taux d'hémoglobine et d'hématocrite (polyérythrocythémie) associés à une augmentation du taux de volume globulaire moyen (VGM macrocytose). L'analyse du poids relatif des organes a montré une réduction significative du poids du foie et des reins traités avec l'extrait dans tous les groupes par rapport au contrôle. L'analyse biochimique des rats traités et témoins a montré qu'il y avait des différences significatives dans les taux de transaminases en particulier au milieu du traitement (jour 45) mais les valeurs étaient physiologiquement normalisées à la fin de l'étude. Et l'analyse

hématologique a révélé une augmentation du nombre d'érythrocytes, d'hémoglobine, d'hématocrite (polyérythrocytémie) associée à une augmentation du taux de MGV (macrocytose) (Osseni et al., 2017). Les études de la toxicité orale à 90 jours de l'extrait hydroalcoolique de racine de C. edulis ont montré qu'à 500 et 1000 mg/kg, l'extrait de racine hydroalcoolique de C. edulis était relativement sans danger pour des rats Wistar (Dossou-Yovo et al., 2021).

2. *Diodia scandens* et traitement de l'hypertension

2.1. *Diodia scandens* taxonomie et morphologie

Diodia scandens Sw (Rubiaceae) est une plante herbacée vivace à feuilles persistantes vert foncé luxuriantes ayant une disposition alternée et dont le pétiole est présent. Ses feuilles sont composées, de forme ovale à lancéolée, ayant une nervation réticulée, une marge entière, un apex aigu, une base cunéiforme, une surface glabre, et une texture ombragée. *Diodia scandens* Sw a une tige anguleuse, une inflorescence groupée et des fleurs blanches ; c'est une plante insipide et inodore (Akpuaka et al., 2018a). Sa capacité de survie en saison sèche est remarquable. Ses caractéristiques botaniques ont été bien décrites par Hutchinson et Dalziel (Hutchinson et al., 1963).

Figure 30: *Diodia scandens*, feuilles http://www.ethnopharmacologia.org

2.2. *Diodia scandens* pertinence ethnopharmacologique

En médecine traditionnelle, les feuilles de la plante sont couramment utilisées pour traiter de nombreuses maladies, notamment la morsure de serpent, les troubles inflammatoires rhumatismaux, les maux d'oreille et les maladies vénériennes (Dalziel, 1937). On prétend également qu'il possède une puissante activité antiulcéreuse (Akah et al., 1993).

La valeur médicinale de la plante comprend son utilisation comme antidote, analgésique, traitement des infections fongiques cutanées et sous-cutanées. Les différentes parties des plantes : la sève, la feuille, la tige et la racine, sont utilisées à diverses fins médicales. La feuille est utilisée pour traiter l'arthrite, les rhumatismes, les infections parasitaires cutanées et sous-cutanées, la diarrhée, et la dysenterie. La tige et les racines sont utilisées pour l'hydropisie, les gonflements, l'œdème et la goutte et comme stimulants de la lactation; tandis que la sève est utilisée pour traiter les otites, la paralysie, l'épilepsie, les convulsions, les spasmes et les troubles pulmonaires (Essiett et al., 2010). La plante entière de D. scandens Swis est utilisée pour traiter les fibromes et les troubles utérins (Okafor, 2013).

2.3. Etudes pharmacologiques de *Diodia scandens*

2.3.1. Propriété antivenimeuse

La propriété antivenimeuse de la plante a été rapportée par Mittal et al. et Onuaguluchi et Okeke (Mittal et al., 1981; Onuaguluchi and Okeke, 1989). Onuaguluchi et Okeke (1989) ont montré que la fraction hydrosoluble d'un extrait à l'éthanol de D. scandens, avait une activité anti-thromboplastine définie contre la thromboplastine cérébrale et l'activité thromboplastine d'Echis carinatus, le serpent de la famille des Viperidae. Il a également été montré que bien que l'extrait à 1,5 mg/kg protège partiellement les souris des effets létaux du venin d'Echis carinatus, il n'y avait pas d'effet délétère sur les souris, même à 2 g/kg (Onuaguluchi and Nwafor, 1999).

2.3.2. Propriétés anti-inflammatoire et actions analgésiques de l'extrait de *Diodia scandens*

L'extrait d'éther de pétrole de D. scandens a montré un effet anti-inflammatoire marqué chez le rat, provoquant une inhibition dose dépendante et soutenue de l'augmentation de la circonférence de la patte de rat provoquée par l'injection sous-plantaire d'un agent phlogistique. De plus, l'extrait a augmenté le seuil de stimulation de la douleur chez la souris. L'extrait a significativement protégé les rats des ulcères induits par l'aspirine, l'indométacine et la réserpine (Akah et al., 1993).

2.3.3. Laxatif et agent ocytocique.

L'effet de l'extrait à l'éthanol de D. scandens sur l'utérus de cobaye a été étudié et il a été découvert qu'il induisait une augmentation de la force de contraction et du tonus à une dose de $1,6 \times 10^{-2}$ mg/ml. D. scandens agit via des récepteurs muscariniques. Il a également induit une vasodilatation concentration dépendante (10-80 mg/kg) des membres postérieurs du rat et abaissé la tension artérielle chez le chat anesthésié (Onuaguluchi and Nwafor, 1999; Patel et al., 2011).

2.3.4. *Diodia scandens* dans le traitement de l'hypertension

Diodia scandens est utilisé dans la médecine traditionnelle pour le traitement de l'hypertension artérielle (Asiedu-Larbi et al., 2020). Les feuilles séchées de la plante ont été utilisées en clinique pour la prise en charge de l'hypertension. Une étude rétrospective visant à évaluer l'efficacité de la plante en tant qu'anti-hypertenseur a été réalisée. Pour les patients hypertendus se présentant à la clinique, deux cent soixante-cinq (265) patients ayant reçu un diagnostic d'hypertension entre janvier 2015 et décembre 2015 ont été inclus. Les résultats de l'étude rétrospective ont indiqué une baisse à la fois de la pression artérielle systolique et la pression artérielle diastolique, avec une pression systolique moyenne de 163,9 mmHg à partir d'une valeur initiale de 174 mmHg et une pression diastolique moyenne de 96,1 mmHg à partir d'une ligne de base de 99,5 mmHg. Il a été conclu que *Diodia scandens* pourrait être efficace dans la gestion de l'hypertension (Boakye-Yiadom et al., 2017) .

Des études ethnopharmacologiques réalisées au Bénin en 2006 dans les principales villes de cinq départements du Bénin choisies pour leur poids démographique et leurs zones géographiques diversifiées ont permis de recenser une série de trente plantes médicinales utilisées pour leurs propriétés antihypertensives mais qui n'avaient pas encore fait l'objet d'objectivation scientifique. Parmi ces plantes figurait D. scandens. Une nouvelle enquête ethnobotanique menée au Bénin dans les régions du Zou et de la Colline en février 2015 a permis de recenser douze plantes traditionnellement utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle, parmi lesquelles D. scandens (Tokoudagba et al., 2018, 2009).

2.4. Criblage phytochimique

Une macération à froid d'extraits de solvants au n-hexane et à l'acétate d'éthyle de *Diodia scandens* pendant 48 heures a donné des solides huileux brunâtres qui ont été soumis à une analyse phytochimique. La chromatographie sur colonne des extraits bruts en utilisant du n-hexane-acétate d'éthyle a donné différents résultats. Ceux-ci ont été soumis à une analyse

spectroscopique. Les résultats de l'analyse phytochimique de l'extrait de n-hexane brut ont montré la présence de stéroïdes, de glycosides, d'alcaloïdes et de saponines. L'extrait d'acétate d'éthyle brut a montré la présence de stéroïdes et de saponine. La présence de ces composés justifiait l'utilisation de cette plante pour traiter l'arthrite et d'autres maladies (Akpuaka et al., 2018a).

2.5. Etude de toxicité

L'étude de toxicité aiguë de l'extrait aqueux de D. scandens a estimé que la dose létale médiane (LD 50) était supérieure à 5 000 mg/kg. Les activités enzymatiques AST, ALP, ALT, LDH-1 ainsi que les concentrations de bilirubine, de créatinine et d'urée mesurées pour l'étude de la toxicité chronique n'ont pas indiqué de différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité. L'analyse de l'urine et l'examen histopathologique du cœur, des reins, des poumons, de la rate et du foie n'ont révélé aucune lésion de ces organes après 6 mois d'exposition. Les poids corporels, les poids des organes humides des rats ainsi que leurs profils hématologiques n'ont pas été affectés par l'extrait à la fin de la période de traitement. Ainsi, aucune toxicité à la fois aiguë et chronique n'a été associé à D. scandens chez les rats mâles et femelles (Asiedu-Larbi et al., 2020).

3. *Cleome gynandra* et traitement de l'hypertension

3.1. *Cleome gynandra* taxonomie et morphologie

Cleome gynandra L., synonyme *Gynandropsis gynandra* (L.) appelée la plante araignée est une plante à feuilles appartenant à la famille des Capparaceae et originaire de l'Afrique subsaharienne et Asie (Wu et al., 2018). C'est une plante herbacée, érigée et annuelle qui atteint une hauteur variant de 0,5 m à 1,5 m à maturité, selon l'environnement de croissance. Il a de nombreuses branches. Dans les sols modérément humides, la plante peut pousser tout au long de l'année, tandis que la floraison et la fructification se produisent simultanément (Shilla et al., 2019). C. gynandra L. a une longue racine pivotante avec des poils racinaires et peu de racines

secondaires. Une observation préliminaire menée à Arusha, en Tanzanie au World Vegetable Center, Afrique orientale et australe (WorldVeg-ESA) en 2013, a révélé que la racine pivotante de certaines plantes de C. gynandra mesurait 60 cm de long (Shilla et al., 2019).

La tige de C. gynandra est collante avec des poils glandulaires, marqué avec des lignes parallèles longitudinales. La pigmentation de la tige varie du vert au rose et au violet. Cependant, sur la base de nos observations à WorldVeg-ESA, quatre types de pigmentation ont été notés : (1) tige pourpre et pétiole de feuille pourpre, (2) tige verte et pétiole de feuille verte, (3) tige pourpre et pétiole de feuille verte, et (4) tige verte et pétiole de feuille pourpre, dont la tige pourpre et le pétiole de feuille verte sont plus courants (Figure 31).

Figure 31 : Variation de couleur de la tige et du pétiole de C. gynandra (Shilla et al., 2019) ; A - tige et pétiole violets, B - tige et pétiole verts, C - tige violette et pétiole vert, D - tige verte et pétiole violet.

Les feuilles sont alternes, composées palmées avec trois à sept, mais généralement cinq folioles et une longue tige de feuille. La tige des feuilles mesure de 20 à 50 mm de long avec des poils glandulaires. Leur forme varie d'obovale à elliptique tandis que la couleur des feuilles va du

vert au vert foncé. La taille des feuilles varie généralement de 2 à 10 cm de longueur et 2 à 4 cm de largeur. La plante a un racème axillaire et terminal, déterminé inflorescence (fleurs à courtes tiges florales appelées pédicelles le long de son axe), avec de nombreuses fleurs issues de la petite bractée trifoliée, ressemblant aux feuilles mais plus petit et sessile (Shilla et al., 2019). Les fruits sont des capsules linéaires et cylindriques (Assongba et al., 2021).

3.2. *Cleome gynandra* : pertinence ethnopharmacologique

C. gynandra joue un rôle important dans la sécurité alimentaire et nutritionnelle des communautés locales. Les feuilles tendres sont généralement consommées cuites en tant que légume tandis que les racines, les tiges et les feuilles entières sont utilisées à des fins médicinales (Ndenga et al., 2011; Onyango et al., 2013). La plante est utilisé depuis plusieurs années en médecine traditionnelle comme agent anthelminthique et antimicrobien (Ajaiyeoba, 2000). Selon l'OMS (2011), dans le traitement des ascites, des tumeurs, des ulcères, des douleurs, des maux d'oreille, de l'élargissement de la rate, des fièvres biliaires, des névralgies, des maux de tête, des raideurs de la nuque et comme rubéfiant (Ghogare et al., 2009). Les feuilles de C. gynandra sont aussi utilisées dans les cas de malnutrition, courants dans de nombreux pays d'Afrique. Au Bénin, le suc de ses feuilles fraîches est utilisée dans le traitement des ictères et hyperthermies (Akoègninou et al., 2006; Dansi et al., 2012). C. gynandra possède également d'importantes propriétés ethnopharmacologiques telles que la répulsion des tiques et l'atténuation de la fièvre (Kwarteng et al., 2018). Le statut de développement modeste de ce légume est disproportionné étant donné l'importance de sa culture en tant que source de nourriture dans les régions (Kwarteng et al., 2018; Onyango et al., 2013; Zorde et al., 2020).

3.3. Etudes pharmacologiques de *Cleome gynandra*

3.3.1. Activité anticancéreuse

L'activité anticancéreuse de l'extrait méthanolique de C. gynandra a été évaluée contre la lignée cellulaire Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC), chez des souris albinos suisses aux doses de 200 et 400 mg/kg de poids corporel par voie intrapéritonéale. L'extrait a montré une diminution concentration dépendante significative du volume de la tumeur, du nombre de cellules viables, du poids de la tumeur et a augmenté la durée de vie des souris porteuses de tumeurs EAC. Le profil hématologique tel que le nombre de globules rouges, d'hémoglobine, de globules blancs et de lymphocytes est revenu à un niveau normal chez les souris traitées par l'extrait au méthanol de C. gynandra (Bala et al., 2010).

3.3.2. Propriété antiarthritique et antioxydante

Une étude visant à étudier le potentiel antiinflammatoire de l'extrait éthanolique des feuilles de C. gynandra a été effectué pendant 30 jours sur l'arthrite induit chez des rats expérimentaux. L'extrait a été administré aux rats à une dose de 150 mg/kg de poids corporel. Les résultats ont montré que l'extrait de feuille de C. gynandra possède une activité antiarthritique significative, comme en témoigne la diminution du volume de la patte des rats. Cette activité est probablement médiée par l'effet inhibiteur de l'extrait sur la formation de peroxyde lipidique et son activité efficace de piégeage des radicaux libres (Narendhirakannan et al., 2005). L'extrait éthanolique de C. gynandra a aussi été testé pour le piégeage des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et l'inhibition du NO via l'induction des cellules macrophages RAW 264.7. L'extrait de C. gynandra s'est avéré avoir les meilleures activités antioxydantes et anti-inflammatoires (Chandradevan et al., 2020).

3.3.3. Activité anti-nociceptive

L'activité anti-nociceptive de C. gynandra a été étudiée en utilisant le test de la plaque chauffante et le test de contorsions induites par l'acide acétique chez des souris à une dose de

100 mg kg-1, par voie intrapéritonéale. Les extraits éthanolique et aqueux ont montré une puissante activité anti nociceptive. Cette activité a été bloquée par la naloxone (1 mg/kg) dans le test de la plaque chauffante, ce qui suggère l'implication des récepteurs opioïdes dans l'action (Ghogare et al., 2009).

3.3.4. Activité antifongique et antimicrobienne

Alele et Imanirampa ont étudié l'activité antifongique de C. gynandra traditionnellement utilisé par la population locale en Ouganda contre Tinea capitis. Des tests ont été effectués sur les isolats cliniques de trois souches fongiques communes à l'origine de la teigne du cuir chevelure (tinea capitis). L'extrait éthanolique et l'extrait aqueux (0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,0625 ; 0,0313 ; 0,0156 ; 0,00781 et 0,00391 mg/ml) ont présenté des réponses antifongiques intéressantes (Imanirampa and Alele, 2016; Singh et al., 2018). Des études ont également montré l'effet antimicrobien de C. gynandra contre une variété de souches microbiennes, qui ont souvent été testées à l'aide d'un test de micro dilution, un système largement accepté comme un test antimicrobien efficace (Van Vuuren and Holl, 2017).

3.3.5. *Cleome gynandra* dans le traitement de l'hypertension

Les études de Runnie et al. ont montré que C. gynandra est riche en polyphénols et possède des propriétés vasorelaxantes intéressantes. L'effet vasculaire étudié sur les préparations d'anneau aortique était principalement dépendant de l'endothélium et médié par le NO. La capacité à réduire le tonus vasculaire est pertinente pour la réduction du risque de maladies cardiovasculaires (Runnie et al., 2004).

3.4. Criblage phytochimique

Les métabolites végétaux secondaires les plus intéressants de C. gynandra sont les glucosinolates et les flavonoïdes comme l'ont démontré Neugart et al. (Neugart et al., 2017). Des concentrations élevées de minéraux dans le tissu foliaire de C. gynandra ont été observées en particulier pour le potassium, le calcium, le magnésium, le phosphore, le fer, le manganèse

et le zinc. Le 3-hydroxypropyl glucosinolate aliphatique était le principal glucosinolate détecté dans tous les tissus avec les concentrations les plus élevées dans les organes reproducteurs. Les glycosides de quercétine, de kaempférol et d'isorhamnetine étaient les principaux flavonoïdes. Les glycosides d'isorhamnetine ont été détectés à l'état de traces dans les feuilles et les inflorescences, tandis que les glycosides de quercétine et de kaempférol étaient dominants dans les feuilles et les inflorescences, respectivement (Omondi et al., 2017). Les alcaloïdes, les stéroïdes, les glycosides cardiaques, les saponines, les phénols et les tanins et les anthraquinones ont aussi été trouvées dans différents extraits de la plante (Sango et al., 2016).

3.5. Etude de toxicité

L'étude de toxicité aiguë a été menée pour des extraits hydroalcooliques, méthanoliques, d'acétate d'éthyle et d'hexane de C. gynandra conformément aux lignes directrices 420 de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques) (OCDE, 2001). Les résultats ont montré que les extraits jusqu'à 2000 mg/kg ne produisaient aucun signe de toxicité ou de mortalité (Rao et al., 2013).

OBJECTIF DE L'ETUDE

L’objectif principal de notre étude est d’étudier le potentiel des extraits de C. edulis, D. scandens et C. gynandra à moduler le tonus vasculaire et clarifier le rôle de l’endothélium ainsi que les mécanismes sous-jacents à l’aide d’une approche *ex vivo*, de déterminer si l’extrait le plus actif permet d’améliorer la fonction endothéliale *in vivo* dans un modèle de vieillissement vasculaire, et de caractériser les molécules d’origine végétale dans l’extrait actif.

Plus précisément, les objectifs spécifiques sont :

1. Etudier l’activité vasorelaxante des extraits des trois plantes sur des artères coronaires de porcs ;
2. Clarifier le rôle de l’endothélium et les mécanismes sous-jacents ;
3. Fractionner l’extrait le plus actif et étudier sa composition chimique ;
4. Etudier l’effet de l’extrait actif sur le tonus vasculaire d’anneaux d’aortes de rats sains et de rats traités par une dose hypertensive d’Ang II ;
5. Etudier in vivo l'effet de la consommation de l’extrait sur le dysfonctionnement endothélial lié au vieillissement ;
6. Déterminer l’effet de l’extrait sur le stress oxydatif et l'activation du système angiotensine vasculaire lié au vieillissement.

MATERIEL ET METHODES

1. Extraction et identification des métabolites secondaires

1.1. Récolte et séchage des plantes

Les différentes plantes ont été collectées dans leur état naturel. Les feuilles de *Carissa edulis, Diodia scandens* et *Cleome gynandra* ont été collectées à Togbin et à Godomey (sud du Bénin) en septembre 2017. La détermination botanique des espèces a été réalisée par Mr Hounnankpon YEDOMONHAN, Professeur de botanique à l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin. Des échantillons justificatifs ont été déposés à l'Herbier National de l'Université d'Abomey-Calavi du Bénin. Les échantillons récoltés ont ensuite été séchés à température ambiante et broyés.

1.2. Extraction par macération

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante. C'est une technique assez courante. Elle ne doit pas être confondue avec l'infusion ou la décoction. Nous avons effectué l'extraction de nos trois plantes de cette manière. Le solvant utilisé est composé de 30 % d'eau distillée et de 70 % d'éthanol absolu. Pour chaque plante le broyat est macéré dans le solvant hydro-éthanolique avec un ratio masse/volume de solvant (1/10). La durée de macération a été de 72 h et la vitesse d'agitation est de 600 rpm. Une fois la macération terminée, le mélange a été filtré sur du papier Wattman et concentrée avec un évaporateur rotatif dont le bain thermostaté a été chauffé à 60°C. L'extrait obtenu après élimination du solvant constitue la matière première pour les fractionnements.

1.3. Fractionnent par succession de séparation liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est une opération de transfert de masse dans laquelle un mélange d'un soluté et d'un liquide porteur est mis en contact avec un second non miscible ou partiellement miscible (solvant) afin de réaliser le transfert des solutés vers le solvant.

L’extraction est optimisée lorsque l’on procède en plusieurs extractions avec des fraction du volume du solvant qu’en une seule fois. Cette technique est maintenant très bien établie dans la communauté scientifique et se présente largement comme un processus de séparation sélective. Nous l’avons utilisé pour fractionner successivement notre extrait le plus actif suivant un gradient de polarité croissante avec quatre solvants : le cyclohexane, le dichlorométhane, l’acétate d’éthyle et le butanol. L’extrait (10g) est dissout dans de l’eau (100 ml) et une séparation liquide-liquide est effectuée avec le même volume (100 ml) de chaque solvant pour trois fois successives par solvant. (**Error! Reference source not found.**).

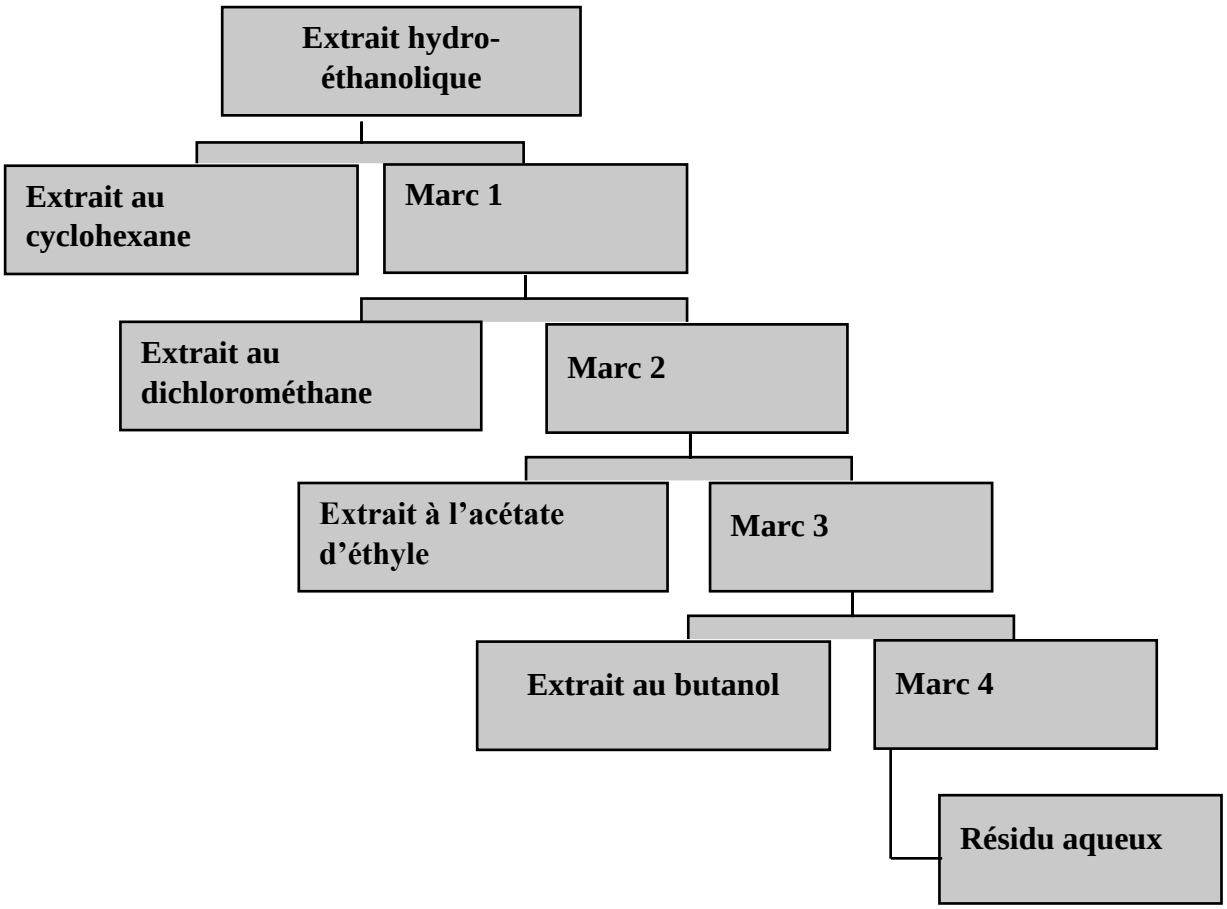


Figure 33 : Fractionnement de l'extrait hydro-éthanolique

1.4. Détermination des composés polyphénoliques

La procédure décrite par Alamgeer et al. (2018) a été suivie pour déterminer le contenu polyphénolique avec le réactif Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocaleu contient un

mélange d'acide phosphotungstique et phosphosmolybdique qui vont réagir avec les phénols pour former un complexe bleu visible à 730 nm. Dans chaque puits d'une plaque de 96 puits, 30 µl d'extrait ou de fraction dilué approprié ont été déposés, auxquels 10 µl de réactif Folin-Ciocalteu et 30 µl de Na_2C0_3 (20 %) ont été ajoutés. Ensuite, le volume total du mélange a été complété à 200 µl avec de l'eau distillée. L'acide gallique a été utilisé comme standard. Après avoir maintenu les échantillons à température ambiante pendant 30 min l'absorbance a été lue à 730 nm en utilisant un lecteur IEMS Lab System, spectrophotomètre MF. La courbe d'étalonnage a été construite en utilisant une solution standard d'acide gallique (0 à 100 mg/ml). Les échantillons ont été préparés en triple et exprimés en mg/ml d'équivalents d'acide gallique.

1.5. Identification des métabolites

1.5.1. Analyse par Chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS)

La spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) et les mesures de masse précises ont récemment gagné en popularité en raison de leur grande capacité à fournir des informations plus complètes concernant la masse moléculaire exacte, la composition élémentaire et la structure moléculaire détaillée d'un composé donné. En effet, le HRMS, atteint une résolution de masse élevée et donc une grande précision de mesure de masse ; ce qui améliore la possibilité de déterminer sans ambiguïté la composition élémentaire des constituants connus et nouveaux avec un niveau de précision élevé, généralement inférieur à 5 ppm. Cela permet à l'analyste de faire également la distinction entre les analytes cibles et les autres composés isobares co-élués (Lucci et al., 2017). Parmi les multiples avantages du HRMS par rapport à la spectrométrie de masse en tandem à résolution de masse unitaire classique, on peut trouver: (i) la différenciation des composés isobares (différents composés de même masse nominale mais de composition élémentaire différente); (ii) la simplification des procédures de préparation des échantillons, conduisant ainsi à des méthodologies plus rapides nécessitant

moins de manipulation des échantillons; (iii) les informations recueillies par une seule injection qui peuvent être utilisées à des fins de quantification et de dépistage, y compris des analyses ciblées, suspectes et non ciblées; (iv) collecte de spectres à balayage complet qui peuvent être stockés et utilisés dans une analyse rétrospective à un stade ultérieur, permettant ainsi la formulation d'hypothèses a posteriori impliquant l'élucidation structurelle de composés inconnus ou suspects (Lucci et al., 2017). Ces dernières années, les scientifiques tirent parti des méthodes LC-HRMS utilisant des analyseurs de temps de vol (TOF) ou Orbitrap pour la caractérisation, la détermination et l'identification des composés métabolites.

La fraction active a été analysée en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution, sur un système UltiMate 3000 (Thermo) couplé à un spectromètre à temps de vol quadripolaire Impact II (Bruker) (Q-TOF). La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Acquity UPLC ® BEH C18 (2,1x100 mm, 1,7 µm, Waters) équipée d'une pré-colonne Acquity UPLC ® BEH C18 (2,1 x 5 mm, 1,7 µm, Waters) en utilisant un gradient de solvants A (eau, 0,1 % d'acide formique) et B (MeOH, 0,1 % d'acide formique). La chromatographie a été réalisée à 35°C avec un flux de 0,3 ml.min-1, commençant avec 5 % B pendant 2 minutes, atteignant 100 % B à 10 minutes, maintenant 100 % pendant 3 minutes et revenant à la condition initiale de 5 % B en 2 minutes, pour une durée totale de fonctionnement de 15 minutes. L'extrait a été maintenu à 4°C, 5 µl ont été injectés en mode boucle complète avec une étape de lavage après injection d'échantillon avec 150 µl de solution de lavage (H20/MeOH, 90/10, v/v). Le spectromètre a été équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI) et a fonctionné en mode ion positif sur une plage de masse de 20 à 1000 Da avec une fréquence spectrale de 2 Hz en mode de fragmentation AutoMS / MS. La tension en source a été réglée à 500 V, la tension capillaire à 2500 V, le nébuliseur à 2 bars, le gaz sec à 8 L.min-1 et la température sèche à 200°C. Le temps de transfert a été fixé à 20-70 µs et l'énergie de collision MS/MS à 80-120 % avec un minutage de 50-50 % pour les

deux paramètres. Le temps de cycle MS/MS a été fixé à 3 sec, le seuil absolu à 816 cts et l'exclusion active a été utilisée avec un seuil d'exclusion à 3 spectres, la libération après 1 min et l'ion précurseur a été reconsidéré si le rapport intensité courante/intensité précédente était supérieur à 5. Un segment d'étalonnage a été inclus au début des essais permettant l'injection d'une solution d'étalonnage de 0,05 à 0,25 min. La solution d'étalonnage utilisée était un mélange frais de 50 ml d'isopropanol/eau (50/50, v/v), 500 µl de NaOH 1 M, 75 µL d'acide acétique et 25 µl d'acide formique. Le spectromètre a été étalonné sur la forme [M + H] + d'ions de référence (57 masses de m / z 22,9892 à m / z 990,9196;) en mode étalonnage haute précision (HPC) avec un écart-type inférieur à 1 ppm avant les injections pour chaque mode de polarité, et un réétalonnage de chaque donnée brute a été effectué après l'injection à l'aide du segment d'étalonnage.

1.5.2. Identification des métabolites

Les données brutes ont été traitées dans le logiciel MetaboScape 4.0 (Bruker) : les caractéristiques moléculaires ont été considérées et regroupées dans des buckets contenant un ou plusieurs adduits et isotopes des ions détectés avec leur temps de rétention et les informations MS/MS lorsqu'elles étaient disponibles. Les paramètres utilisés pour la création du jeu de données sont un seuil d'intensité minimum de 10 000, une longueur de pic minimum de 3 spectres, un rapport signal sur bruit (S/N) de 3. Les ions $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$ ont été autorisés comme ions possibles. Les échantillons répliqués ont été regroupés et seuls les buckets trouvés dans 80% des échantillons d'un groupe ont été extraits des données brutes. La liste des buckets obtenue a été annotée à l'aide de SmartFormula pour générer une formule brute basée sur la masse exacte des ions primaires et le modèle isotopique. La variation maximale autorisée de la masse ($\Delta m/z$) a été fixée à 3 ppm, et la valeur maximale mSigma (évaluation du bon ajustement des profils isotopiques) a été fixée à 30. Pour mettre un nom sur les formules obtenues, une liste d'analytes a été dérivé de la base de données KNApSAcK (

http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK/). Les paramètres utilisés pour l'annotation avec les listes d'analytes sont les mêmes que pour l'annotation SmartFormula. Les annotations obtenues avec KNApSAcK sont du niveau 3 sur l'échelle de Schymanksi.

2. Matériel et méthode des tests biologiques

2.1. Etude ex vivo

2.1.1. Matériel

Pour les tests biologiques, nous avons utilisé les artères coronaires circonflexes gauches de cœurs de porcs et l'aorte thoracique de jeunes rats. Les cœurs de porcs ont été collectés à l'abattoir local (Copvial, Holtzheim) / France. Des rats mâles Wistar âgés de 12 semaines ont été obtenus auprès de Janvier-labs (Le Genest-Saint-Isle, France) et ont été gardés dans une animalerie à température contrôlée (22°C), cycle lumière / obscurité de 12 h. Ils ont eu libre accès à de la nourriture et de l'eau standard.

2.1.2. Réactivité vasculaire

Les artères coronaires circonflexes gauches et l'aorte thoracique ont été excisées, nettoyées du tissu conjonctif lâche et rincées avec du PBS sans calcium pour éliminer le sang restant. Des anneaux (3 à 4 mm de long) ont ensuite été mis en suspension dans des cuves à organes isolés contenant une solution oxygénée de bicarbonate de Krebs (95 % O_2, 5 % CO_2) (composition en mM : NaCl 119, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.18, $MgSO_4$ 1.18, $CaCl_2$ 1.25, $NaHCO_3$ 25 and D-glucose 11, pH 7.4, 37°C) pour la détermination des changements de tension isométrique (tension basale 5 g pour l'artère coronaire et 2 g pour l'aorte de rat). Après la période d'équilibrage, les anneaux ont été exposés à une solution de bicarbonate de Krebs à forte teneur en K^+ (80 mM) jusqu'à ce que des réponses contractiles reproductibles soient obtenues. Pour évaluer l'intégrité de l'endothélium, les anneaux d'artères coronaires porcines, ont été précontractés avec U46619 (un agoniste des récepteurs de la thromboxane A_2) avant induction d'une relaxation à la bradykinine (0,3 µM). Pour l'évaluation des propriétés

vasorelaxantes des extraits, les anneaux ont été contractés (environ 80 % de la contraction maximale) avec U46619 (un agoniste du récepteur du thromboxane A_2) pour l'artère coronaire et la phényléphrine pour l'aorte de rat avant construction d'une courbe concentration-relaxation par extrait. Pour étudier l'inhibition des réponses contractiles, les anneaux avec endothélium ont été exposés à l'extrait pendant 30 min avant construction d'une courbe concentration-contraction au KCl, U46619, $CaCl_2$ en présence de 40 mM KCl ou à la sérotonine.

Pour caractériser les différentes voies médiées par la relaxation, les anneaux ont été incubés pendant 30 min avec des agents pharmacologiques avant la construction des courbes concentration-réponse. Le rôle de la relaxation médiée par le NO a été étudié dans des anneaux incubés avec de la N^G-nitro-L-arginine (L-NA, 300 µM, un inhibiteur de la NOS). Pour étudier le rôle des prostanoïdes dérivés des cyclooxygénases, les anneaux ont été incubés avec de l'indométacine (10 µM). Pour étudier le rôle de la relaxation médiée par l'EDH, les anneaux ont été incubés avec TRAM-34 plus UCL-1684 (1 µM chacun, inhibiteurs de IK_{Ca}^{2+} et SK_{Ca}^{2+}, respectivement).

2.1.3. Accumulation d'absorption des flavonoïdes ex vivo

Le segment des artères coronaires de porc et d'aorte thoracique de rat ont été excisés et soigneusement nettoyés des tissus conjonctifs. Des anneaux de 3-4 mm chacun ont été lavés dans une solution de Krebs et placés dans des plaques à 24 puits contenant du milieu de culture MCDB131 (Gibco, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) supplémenté en fungizone (250 µg/ml), pénicilline (100 UI/ml), streptomycine (100 UI/ml), L-glutamine (2 mM), toutes de Lonza Levallois-Perret, France. Les artères coronaires et les anneaux de l'aorte thoracique ont été incubés avec différentes concentrations de l'extrait pendant 3 min à 37°C avec 5% de CO_2. Ils ont ensuite été lavés deux fois avec du PBS avant une autre incubation avec du PBS contenant 0,4 % de 2-aminoéthyl diphényle borate pendant 5 min à 37°C. Par la suite, les anneaux ont été lavés avec du PBS froid, congelés dans l'azote liquide dans des histomolds

contenant du milieu pour congélation de tissues (FSC 22, Leica Biosystèmes, Nanterre, France), avant d'être cryosectionnés à 14 µm et montés sur des lames adhésives Superfrost plus (ThermoFisher) avec du milieu Dako (milieu de montage fluorescent, Dako, Agilent Technologies France, Les Ulis, France). Les lames ont ensuite été séchées pendant 20 min à température ambiante et analysées le jour même à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (Leica TSC SPE). L'analyse quantitative de la fluorescence a été réalisée à l'aide du logiciel Image J (version 1.6 pour Windows, NIH).

2.2. Etude in vivo

2.2.1. Déclaration éthique

Cette étude a été réalisée conformément au guide sur les soins et l'utilisation des animaux en laboratoire, publié par l'institut américain de la santé (Bethesda, MD, USA ; numéro de publication du NIH 85-23, révisé en 1996). Le protocole utilisé a été autorisé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation et par le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg. Toutes les expériences ont été réalisées dans une animalerie enregistrée au sein de la Faculté de pharmacie (numéro d'autorisation # 7626-2016111715542930).

2.2.2. Traitement in vivo des rats

Des rats mâles Wistar de 12 semaines obtenus auprès de Janvier-labs (Le Genest-Saint-Isle, France) ont été conservés dans une animalerie à température contrôlée (22°C), cycle lumière / obscurité de 12 h. Ils ont eu accès librement à de la nourriture et de l'eau standard jusqu'à ce qu'ils aient 40 semaines. Ils ont ensuite été répartis en trois groupes. Les rats âgés ont reçu de l'eau ou de l'extrait brute de Carissa edulis (90 mg/kg/jour) dans de l'eau potable pendant deux semaines, tandis que les jeunes rats (12 semaines), utilisés comme témoins, n'ont reçu que de l'eau. Après traitement, les rats ont été pesés et euthanasiés par une injection intra-

péritonéale d'un mélange de kétamine / xylazine (120/10 mg/kg) avant le prélèvement des organes.

2.2.3. Études de la réactivité vasculaire

L'artère mésentérique principale et l'aorte thoracique ont été nettoyées du tissu conjonctif et découpées en anneaux (2-3 mm) avant suspension dans des bains d'organes contenant une solution oxygénée de bicarbonate de Krebs (95 % O_2, 5 % CO_2) (composition en mM : NaCl 119, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.18, $MgSO_4$ 1.18, $CaCl_2$ 1.25, $NaHCO_3$ 25 et D-glucose 11, pH 7.4, 37°C). La tension au repos a été fixée à 1 g pour les artères mésentériques principales et à 2 g pour l'aorte thoracique avant la détermination des changements de tension isométrique. Après la période d'équilibrage, les anneaux ont été exposés à une solution de bicarbonate de Krebs contenant une concentration élevée de potassium (80 mM) jusqu'à ce que des réponses contractiles reproductibles aient été obtenues. Pour vérifier la présence et la fonctionnalité de l'endothélium, les anneaux ont été contractés avec de la phényléphrine (PE, 1 µM) avant l'induction d'une relaxation à l'acétylcholine (ACh, 1 µM). Pour la détermination des réponses contractiles, les anneaux ont été soumis à des courbes de concentration-contraction en réponse à la PE. Pour évaluer les relaxations dépendantes de l'endothélium, les anneaux ont été contractés avec la PE (1 µM) avant la construction de courbes concentration-relaxation en réponse à l'ACh.

Pour caractériser les différentes voies médiées par la relaxation, les anneaux ont été incubés pendant 30 min avec des agents pharmacologiques avant la construction des courbes concentration-réponse. Le rôle de la relaxation médiée par l'EDH a été étudié dans des anneaux incubés avec à la fois de l'indométacine (10 µM, un inhibiteur non sélectif de la COX) et du TRAM-34 plus UCL-1684 (1 µM chacun, inhibiteurs de l'IK_{Ca}^{2+} et du SK_{Ca}^{2+}, respectivement). Pour étudier la relaxation médiée par le NO, les anneaux ont été incubés avec de l'indométacine et de la N^G-nitro-L-arginine (L-NA, 300 µM, un inhibiteur de l'eNOS) pour inhiber la formation

de prostanoïdes vasoactifs et de NO, respectivement. Pour étudier le rôle des prostanoïdes dérivés des cyclooxygénases, les anneaux ont été incubés avec de l'indométacine (10 µM). Pour évaluer la fonction du muscle lisse vasculaire, les anneaux ont été incubés avec de l'indométacine, de la L-NA et du TRAM-34 plus UCL-1684, puis contractés avec du PE (1 µM) avant la construction d'une courbe concentration-relaxation soit au nitroprussiate de sodium (SNP, un donneur de NO) ou à la levcromakalim (Lev, un ouvreur des canaux potassiques sensibles à l'ATP).

2.2.4. Stimulation et modulation de l'absorption des flavonoïdes ex vivo

Les anneaux de l'aorte thoracique ont été lavés avec une solution de Krebs et placés dans des plaques à 24 puits contenant du milieu de culture MCDB131 (Gibco, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) supplémenté en fungizone (250 µg/ml), pénicilline (100 UI/ml), streptomycine (100 UI/ml), L-glutamine (2 mM). Les anneaux sont ensuite incubés avec l'extrait actif (60 µg/ml) pendant 3 min à 37°C avec 5 % de CO_2. Pour évaluer l'implication des co-transporteurs sodiques du glucose (SGLT)1 et 2 dans l'absorption des polyphénols, les anneaux ont été incubés avec un inhibiteur mixte des SGLT1et 2 Sotagliflozine (0,1 µM) ou un inhibiteur sélectif du SGLT2 (Empagliflozine, 0,1 µM) pendant 5 min à 37°C avant l'ajout de l'extrait actif. Les anneaux ont ensuite été lavés deux fois avec du PBS avant une autre incubation avec du PBS contenant 0,4 % de 2-aminoéthyl diphényle borate pendant 5 min à 37°C. Ensuite, les anneaux ont été lavés avec du PBS froid, surgelés avec de l'azote liquide dans des histomolds contenant du milieu pour congelation de tissue (FSC 22, Leica Biosystems, Nanterre, France), avant d'être cryosectionnés à 14 µm et montés sur des lames adhésives Superfrost plus (ThermoFisher) avec du milieu Dako (milieu de montage fluorescent, Dako, Agilent Technologies France, Les Ulis, France). Les lames ont ensuite été séchées pendant 20 min à température ambiante et analysées le même jour à l'aide d'un microscope confocal à

balayage laser (Leica TSC SPE). L'analyse quantitative de la fluorescence a été réalisée à l'aide du logiciel Image J (version 1.6 pour Windows, NIH).

2.2.5. Études d'immunofluorescence

Les anneaux des artères mésentériques principales et secondaires ont été incorporés dans des histomolds (FSC 22, Leica Biosystems, Nanterre, France) et ont été congelés instantanément dans de l'azote liquide. Les anneaux ont été cryosectionnés à 14 μm et stockés à -40°C jusqu'à leur utilisation. Les sections ont été décongelées avec du tampon phosphate salin (PBS) et fixées pendant 30 min avec 4 % (w/v) de paraformaldéhyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) puis incubées avec du tampon de blocage/perméabilisation (PBS contenant 1 % de sérum bovin) albumine (BSA) (w/v) et 0,5 % Triton X-100 (w/v) pendant 30 min à température ambiante. Après élimination du tampon, toutes les coupes, à l'exception des contrôles négatifs, ont été incubées pendant 1 h à 4°C avec différents anticorps primaires : un anticorps primaire anti eNOS (1/100, Cat.610297, BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France), la nitrotyrosine (1/500, Cat.05-233, EMD Millipore, Billerica MA, USA), l'ACE (1/200, Cat.250450, Abbiotec, San Diego, USA) et l'AT_1R (1/200, Cat. Ab124505, Abcam, Paris, France). Toutes les sections ont été lavées 3 fois avec du PBS avant l'incubation avec un anticorps secondaire fluorescent anti-lapin ou anti-souris (1/400, Alexa fluor 633 conjugué, Invitrogen) pendant 1 h à température ambiante dans l'obscurité. Après 3 lavages avec du PBS, les coupes ont été incubées avec 1 mg/ml de diamidino-4',6-phénylindol-2 dichlorhydrate (DAPI, Thermo Fisher) pendant 5 min à température ambiante, afin de contre-colorer les noyaux. Les lames ont été lavées 3 fois avec du PBS puis montées sous une lamelle couvre-objet en utilisant un milieu de montage fluorescent (Dako, Agilent Technologies France, Les Ulis, France) avant d'être séchées pendant 20 min à température ambiante. Les lames ont ensuite été analysées avec un microscope confocal à balayage laser (Leica SP2 UV DM IRBE ; Leica, Heidelberg,

Allemagne) avec une lentille de grossissement 20X. Le niveau de fluorescence a été quantifié en utilisant le logiciel Image J (version 1.6 pour Windows, NIH).

2.2.6. Détermination du niveau de stress oxydatif

Le niveau de ROS dans les artères mésentériques principales et secondaires et dans les mitochondries a été déterminé en utilisant la sonde fluorescente sensible redox dihydroéthidium (DHE, Invitrogen, ThermoFischer) et la sonde MitoSox (MitoSoxTM, Invitrogen, Thermofischer), respectivement. Les cryosections des artères mésentèriques principales et secondaires (25 µm) ont été décongelées avec du PBS et incubées avec le DHE (2,5 µM) ou le MitoSox (2,5 µM) pendant 30 min à 37°C dans l'obscurité. Après deux lavages au PBS, les coupes ont été montées sous une lamelle en utilisant un milieu de montage fluorescent (Dako, Agilent Technologies France, Les Ulis, France) et séchées pendant 20 min à température ambiante. Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (Leica SP2 UV DM IRBE ; Leica, Heidelberg, Allemagne) avec une lentille de grossissement 20X. L'analyse quantitative a été réalisée à l'aide du logiciel Image J (version 1.6 pour Windows, NIH).

2.2.7. Analyse statistique

Les données sont exprimées en tant que moyenne ± erreur standard (S.E.M.) de n expériences différentes en utilisant GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). La variance statistique entre les différents groupes a été déterminée en appliquant le test Anova à deux facteurs (Two-way Anova) pour les résultats de réactivité vasculaire et le test Anova à un facteur (One-way Anova) pour les résultats de microscopie confocale quantitative. La valeur IC_{50} correspond à la concentration du produit inhibant 50 % de la réponse. Les valeurs moyennes sont comparées à l'aide d'une analyse de variance suivie du test post-hoc de Bonferroni (comparaison de paires sélectionnées). La différence a été significative pour une valeur $P < 0,05$.

RESULTATS ET DISCUSSION

Résumé article 1

L'hypertension est une maladie cardiovasculaire majeure qui touche la plupart des pays, y compris ceux d'Afrique où la médecine traditionnelle est très exploitée. *Carissa edulis, Diodia scandens* et *Cleome gynandra* sont traditionnellement utilisées au Bénin pour traiter l'hypertension artérielle.

Cette étude a examiné l'activité vasoactive des trois plantes et les mécanismes sous-jacents en utilisant des anneaux d'artère coronaire porcine et l'aorte thoracique de rat.

Des extraits aqueux-éthanoliques des feuilles de *Carissa edulis, Diodia scandens* et *Cleome gynandra* ont été préparés par macération et fractionnés successivement en utilisant différents solvants. L'effet des extraits et des fractions a été évalué sur l'artère coronaire porcine et l'aorte thoracique de rats avec et sans endothélium en utilisant des chambres à organes isolés. Différents réactifs pharmacologiques ont été utilisés pour caractériser les mécanismes sous-jacents. L'absorption des polyphénols a été quantifiée dans les anneaux d'artère coronaire de porc et d'aorte thoracique de rat en utilisant le réactif Neu.

Résultats : L'extrait brut aqueux-éthanolique de *Carissa edulis* (CECE) a induit de fortes relaxations qui étaient exclusivement endothélium-dépendantes et plus prononcées que celles de *Diodia scandens* et *Cleome gynandra*. La fraction n-butanolique de *Carissa edulis* (CEBF) était plus active que les fractions cyclohexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle. La relaxation induite par CECE et CEBF a été fortement inhibée par la N^G-nitro-L-arginine un inhibiteur de la NOS mais n'a pas été affectée par le Tram 34 + UCL 12684 (inhibiteurs d'IK_{Ca} et SK_{Ca} respectivement) et par l'indométacine un inhibiteur des cyclooxygénases. Ainsi, l'activité vasorelaxante de CECE et CEBF implique principalement la formation endothéliale du NO. La relaxation endothélium dépendante induite par CEBF est maintenue pendant au moins 60 minutes, alors que celle induite par la bradykinine est revenue au niveau de la pré-

contraction en 5 minutes. Ceci indique que la fraction induit une relaxation stable et soutenue qui pourrait être plus appropriée pour contrôler le tonus vasculaire. CEBF a également inhibé de manière concentration-dépendante, les contractions induites par les agents contracturants KCl, $CaCl_2$, U46619 et 5-HT dans les anneaux avec endothélium, indiquant que l'effet inhibiteur de CEBF est efficace contre plusieurs voies de transduction du signal conduisant à l'activation des protéines contractiles. L'analyse de CEBF par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS) a indiqué la présence de polyphénols, de terpènes et d'alcaloïdes, des familles de molécules capables de réguler le tonus vasculaire. Le traitement aigu d'anneaux d'artère coronaire porcine et d'aorte thoracique de rat avec le CEBF a montré une accumulation dose-dépendante de polyphénols laquelle est plus prononcée dans l'endothélium que dans le muscle lisse vasculaire. Ainsi, les polyphénols de CEBF sont capables de cibler préférentiellement les cellules endothéliales.

De cette étude il en ressort que la fraction butanolique de l'extrait hydro-éthanolique des feuilles de *Carissa edulis* induit des relaxations prononcées dépendantes de l'endothélium et inhibe les réponses contractiles principalement en stimulant la formation endothéliale de NO. De plus, les polyphénols de CEBF s'accumulent préférentiellement dans les cellules endothéliales de la paroi artérielle. La régulation du tonus vasculaire par *Carissa edulis* pourrait contribuer à expliquer son action antihypertensive.

Carissa edulis extract, a medicinal plant of Benin pharmacopoeia, induces potent endothelium-dependent relaxation of coronary artery rings involving predominantly nitric oxide

Ursula Houngue[a,b], Claire Villette[c], Jean-Marie Tokoudagba[b], Ahmed B. Chaker[a], Lamia Remila[a], Cyril Auger[a], Dimitri Heintz[c], Fernand Gbaguidi[b], Valérie B. Schini-Kerth[a,*]

[a] *INSERM UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, University of Strasbourg, Strasbourg, France address mail* U.H: ursula.houngue@etu.unistra.fr; A.C: dztechn@gmail.com; L.R: lamia.remila@etu.unistra.fr; C.A: cyril.auger@unistra.fr; V.S: valerie.schini-kerth@unistra.fr

[b] *Medicinal Organic Chemistry Laboratory, Faculty of health Sciences, University of Abomey-Calavi, Cotonou, Benin address mail* J-M.T: tokusj@yahoo.fr ; F.G : gbafern@gmail.com

[c] *CNRS, Plant Imaging and Mass Spectrometry (PIMS), IBMP, University of Strasbourg, Strasbourg, France address mail* C.V: claire.villette@ibmp-cnrs.unistra.fr; D.H: dimitri.heintz@ibmp-cnrs.unistra.fr:

Name and complete address of corresponding author:

Valérie B. Schini-Kerth

INSERM UMR 1260, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg

1 rue Eugène Boeckel

67000 Strasbourg, France

Phone: +33 3 68 85 41 27

Email: valerie.schini-kerth@unistra.fr

Abstract:

Background: Hypertension is a major cardiovascular disease that affects most countries including those of Africa, which are known to rely often on traditional medicine. *Carissa edulis, Diodia scandens* and *Cleome gynandra* are traditionally used in Benin for the treatment of hypertension.

Aim: This study investigated the vasoactive activity of the plants and underlying mechanisms using porcine coronary artery rings and rat thoracic aorta.

Study design: Aqueous-ethanolic extracts of aerial parts of *Carissa edulis*, *Diodia scandens* and *Cleome gynandra* were prepared by maceration process and successively fractionated using different solvents. The effect of the extracts and fractions were assessed on porcine coronary artery and thoracic aorta of rats with and without endothelium using organ chambers. Different pharmacological reagents were used to characterize the underlying mechanisms. The polyphenol uptake was quantified in porcine coronary artery and rat thoracic aorta rings using the neu reagent.

Results: The aqueous-ethanolic crude extract of *Carissa edulis* (CECE) induced potent relaxations that were exclusively endothelium-dependent and more pronounced than those to *Diodia scandens* and *Cleome gynandra*. The n-butanolic fraction of *Carissa edulis* (CEBF) was more active than the cyclohexane, dichloromethane, and ethyl acetate fractions. The relaxation induced by CECE and CEBF were strongly inhibited by N^G-nitro-L-arginine, and not affected by Tram 34 + UCL 12684 and by indomethacin. The CEBF-induced endothelium-dependent relaxation was sustained for at least 60 min whereas that of bradykinin returned to the pre-contractile level within 5 min. CEBF inhibited, in a concentration-dependent manner, contractions to KCl, $CaCl_2$, U46619 and 5-HT in rings with endothelium. Analysis of the butanol fraction (CEBF) by LC-HRMS indicated the presence of polyphenols, terpenes and

alkaloids. Acute treatment of porcine coronary artery and rat thoracic aorta rings with CEBF showed a dose-dependent accumulation of polyphenols that is more pronounced in the endothelium than the vascular smooth muscle.

Conclusion: The butanol fraction of the aqueous ethanol extract of *Carissa edulis* leaves induced pronounced endothelium-dependent relaxations and inhibited contractile responses mostly by stimulating the endothelial formation of NO. They further indicate that CEBF polyphenols preferentially accumulate in endothelial cells in the arterial wall.

Introduction

Cardiovascular diseases are the most prevalent diseases worldwide (Mendis et al., 2007). Hypertension is a major risk factor identified initially in Western industrialized countries (Maione et al., 2013a). However, the prevalence of hypertension and cardiovascular diseases is strongly increasing in developing countries and, in particular, in sub-Saharan Africa (Tokoudagba et al., 2010a). Modern therapeutics are not easily accessible to African and Beninese populations, due to the difficult economic environment characterized by high drug prices. Pharmacopoeia and traditional medicine become a significant alternative in terms of health coverage, especially when life-long medication is required (Houngbeme et al., 2014; Sen and Chakraborty, 2017; Yuan et al., 2016). *Carissa edulis, Diodia scandens* and *Cleome gynandra* are three plants traditionally used in Benin for the treatment of hypertension. *Carissa edulis* is a perennial thorny shrub of the family of Apocynaceae widespread in Africa, Australia, Vietnam, Yemen and India (Al-Youssef and Hassan, 2014b). *Diodia scandens* (Rubiaceae) is an evergreen perennial herb, which has an alternate leaf arrangement, (Akpuaka et al., 2018b). *Cleome gynandra* is a plant of the family of Capparidaceae which grows in most tropical countries. The leaves and seeds of the plant have long been used as indigenous medicine for treatment of headaches and stomach aches (Narendhirakannan et al., 2007). The

aim of the present study is to investigate the potential of the leaves extracts of the three selected plants to affect vascular tone and clarify the role of the endothelium and the underlying mechanisms.

1. Materials and Methods

1.1 Plant material and extraction

The leaves of *Carissa edulis*, *Diodia scandens* and *Cleome gynandra* were collected from Togbin, Godomey, Benin in September 2017 and were identified by Pr Hounnankpon Yedomonhan, Professor of Botany at University of Abomey-Calavi, Benin. The voucher specimens have been deposited in the National Herbarium of University of Abomey-Calavi, Benin. The samples were dried, grounded into powder (100 g) and macerated at room temperature with ethanol/water (6:4, v/v) (3× 300 ml, 72 h each). The filtered extracts were combined and evaporated under reduced pressure to obtain a dry extract (yield 25%). The aqueous ethanolic extract that showed the best vascular relaxation was successively fractioned with four solvents: cyclohexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol.

Carissa edulis extract (10 g) was mixed with water (100 ml) and partitioned with the same volume of cyclohexane (100 ml) for 24 h three successive times. The decantation and evaporation provided 66 mg of the *Carissa edulis* cyclohexane fraction (CECF). The remaining aqueous layer was further extracted with dichloromethane, ethyl acetate and butanol (100 ml each) for 24 h three successive times. The decantation and evaporation provided 16 mg of the *Carissa edulis* dichloromethane fraction (CEDF), 0.43 g of the *Carissa edulis* ethyl acetate fraction (CEEF) and 1.04 g of the *Carissa edulis* butanolic fraction (CEBF). All extracts were stored at 4 °C before being used.

1.2. Chemicals and drugs

All pharmacological reagents were from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie SARL, St Quentin Fallavier, France). De-ionised water was filtered through a Direct-Q UV (Millipore) station, isopropanol and methanol were purchased from Fisher Chemicals (Optima ® LC/MS grade). NaOH was obtained from Agilent Technologies, acetic acid, formic acid, cyclohexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol from Sigma Aldrich. All chemicals were of analytical grade.

1.3. LC-HRMS analysis

Carissa edulis butanolic fraction (CEBF) was analyzed using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry on an UltiMate 3000 system (Thermo) coupled to an Impact II (Bruker) quadrupole time-of-flight (Q-TOF) spectrometer. Chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC ® BEH C18 column (2.1x100 mm, 1.7 µm, Waters) equipped with and Acquity UPLC ® BEH C18 pre-column (2.1 x 5 mm, 1.7 µm, Waters) using a gradient of solvents A (Water, 0.1% formic acid) and B (MeOH, 0.1% formic acid). Chromatography was carried out at 35 °C with a flux of 0.3 $mL.min^{-1}$, starting with 5% B for 2 min, reaching 100% B at 10 min, holding 100% for 3 min and coming back to the initial condition of 5% B in 2 min, for a total run time of 15 min. Extract was kept at 4 °C, 5 µL were injected in full loop mode with a washing step after sample injection with 150 µL of wash solution (H_2O/MeOH, 90/10, v/v). The spectrometer was equipped with an electrospray ionization (ESI) source and operated in positive ion mode on a mass range from 20 to 1000 Da with a spectra rate of 2 Hz in AutoMS/MS fragmentation mode. The end plate offset was set at 500 V, capillary voltage at 2500 V, nebulizer at 2 Bar, dry gas at 8 $L.min^{-1}$ and dry temperature at 200 °C. The transfer time was set at 20-70 µs and MS/MS collision energy at 80-120% with a timing of 50-50% for both parameters. The MS/MS cycle time was set to 3 sec, absolute threshold to 816 cts and active exclusion was used with an exclusion threshold at 3 spectra,

release after 1 min and precursor ion was reconsidered if the ratio current intensity/previous intensity was higher than 5. A calibration segment was included at the beginning of the runs allowing the injection of a calibration solution from 0.05 to 0.25 min. The calibration solution used was a fresh mix of 50 mL isopropanol/water (50/50, v/v), 500 µL NaOH 1 M, 75 µL acetic acid and 25 µL formic acid. The spectrometer was calibrated on the [M+H] + form of reference ions (57 masses from m/z 22.9892 to m/z 990.9196;) in high precision calibration (HPC) mode with a standard deviation below 1 ppm before the injections for each polarity mode, and re-calibration of each raw data was performed after injection using the calibration segment.

1.4. Metabolite identification

Raw data were processed in MetaboScape 4.0 software (Bruker): molecular features were considered and grouped into buckets containing one or several adducts and isotopes from the detected ions with their retention time and MS/MS information when available. The parameters used for bucketing are a minimum intensity threshold of 10 000, a minimum peak length of 3 spectra, a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and a correlation coefficient threshold set at 0.8. The [M+H] +, [M+Na] + and [M+K] + ions were authorized as possible ions. Replicate samples were grouped and only the buckets found in 80% of the samples of one group were extracted from the raw data. The obtained list of buckets was annotated using SmartFormula to generate raw formula based on the exact mass of the primary ions and the isotopic pattern. The maximum allowed variation on the mass (Δm/z) was set to 3 ppm, and the maximum mSigma value (assessing the good fitting of isotopic patterns) was set to 30. To put a name on the obtained formulae, an analyte list was derived from KNApSAcK database (http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK/). The parameters used for the annotation with the analyte lists are the same as for SmartFormula annotation.

1.5. Total polyphenols

The total phenolic content of *Carissa edulis* total extract and its fractions was quantified using the Folin–Ciocalteu reagent according to Alamgeer et al. (Alamgeer et al., 2018).

1.6. Vascular reactivity studies

Vascular reactivity studies were performed using left circumflex coronary arteries of pig hearts and the thoracic aorta of young rats. Pig hearts were collected from the local slaughterhouse (Copvial, Holtzheim) and vascular reactivity was assessed as previously (Alamgeer et al., 2016). Briefly, left circumflex coronary arteries and thoracic aorta were excised, cleaned of loose connective tissue, and flushed with PBS without calcium to remove remaining blood. Rings (3-4 mm in length) were then suspended in organ baths containing oxygenated (95% O_2, 5% CO_2) Krebs bicarbonate solution (composition in mM: NaCl 119, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.18, $MgSO_4$ 1.18, $CaCl_2$ 1.25, $NaHCO_3$ 25 and D-glucose 11, pH 7.4, 37 °C) for the determination of changes in isometric tension (basal tension 5 g). The endothelial function was checked with bradykinin (0.3 µM). For the assessment of the vasorelaxant properties of the extracts, rings were contracted (about 80% of the maximal contraction) with U46619 (a thromboxane A_2 receptor agonist) before construction of a concentration-relaxation curve to an extract. For assessment of the inhibition of contractile responses, rings with endothelium were exposed to CEBF (1, 3 and 10 µg) for 30 min before construction of a concentration-contraction curve either to KCl, U46619, $CaCl_2$ in the presence of 40 mM KCl or serotonin. To characterize the different pathways mediating relaxation, rings were incubated for 30 min with a pharmacological agent before the construction of concentration-response curve. The role of NO-mediated relaxation was studied in rings incubated with N^G-nitro-L-arginine (L-NA, 300 µM, an eNOS inhibitor). To study the role of cyclooxygenase-derived prostanoids, rings were incubated with indomethacin (10 µM). To study endothelium-dependent hyperpolarization

(EDH)-mediated relaxation, rings were incubated with TRAM-34 plus UCL 1684 (1 µM each, inhibitors of IK_{Ca} and SK_{Ca}, respectively).

Vascular reactivity studies were also performed using thoracic aorta. They were cleaned of connective tissue and cut into rings (2-3 mm in length). Rings were suspended in organ baths containing oxygenated Krebs bicarbonate solution for the assessment of changes in isometric tension under an optimal resting tension of 2 g. After the equilibration period, the rings were exposed to high K^+-containing Krebs bicarbonate solution (80 mM) until reproducible contractile responses were obtained. To assess the endothelial function, the rings were contracted with phenylephrine (PE, 1 µM) before the induction of a relaxation to acetylcholine (ACh, 1 µM) or a concentration-relaxation curve to CEBF.

1.7. Ex vivo polyphenols uptake experiment

Segment of left circumflex coronary arteries of pig hearts and thoracic aorta of rats were excise and careful clean of connective tissues. Rings of 3-4 mm of each were washed in Krebs solution and placed in 24 wells plates containing MCDB131 culture medium (Gibco, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) supplemented with fungizone (250 µg/ml), penicillin (100 UI/ml), streptomycin (100 UI/ml), L-glutamine (2 mM, all from Lonza Levallois-Perret, France). Coronary arteries and thoracic aorta rings were incubated with CEBF (30, 60, 80 and 100 µg/ml) for 3 min at 37 °C with 5% CO_2. They were then washed twice with PBS before further incubation with PBS containing 0.4% of 2-aminoethyl diphenyl borate for 5 min at 37 °C to determine the uptake of polyphenols according to Jin et al., 2013 with some modifications. Subsequently, rings were washed with cold PBS, snap-frozen with liquid nitrogen in histomolds containing frozen section media (FSC 22, Leica Biosystems, Nanterre, France, before being cryosectioned at 14 µm and mounted on Superfrost plus slides (ThermoFisher) with Dako medium (fluorescence editing medium, Dako, Agilent Technologies France, Les Ulis, France) and dried for 20 min at room temperature. Slides were then analyzed on the same

day using a confocal laser scanning microscope (Leica TSC SPE). Quantitative analysis of fluorescence was performed using Image J software (version 1.6 for Windows, NIH).

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard error mean (S.E.M.) of n different experiments using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Statistical variance between different groups was determined by applying Two-way Anova test for vascular reactivity results and One-way Anova test for quantitative confocal microscopy results. The IC_{50} value corresponds to the concentration of the product inhibiting 50% of the response. Mean values are compared using analysis of variance followed by the Bonferroni post-hoc test (comparison of selected pairs). The difference was significant for a *P* value $P < 0.05$.

2. Results

2.1. Total polyphenolic contents

The content of phenolic compounds amounted to 856.66 ± 23.33; 106.66 ± 18.55; 196.66 ± 14.53; 580.00 ± 5.77 and 793.33 ± 17.63 mg of gallic acid equivalent (GAE) per gram, respectively for *Carissa edulis* total extract, CECF, CEDF, CEEF and CEBF.

Characterization of *Carissa edulis* preparations and identification of CEBF-containing metabolites

Analysis of CEBF by LC-HRMS revealed the presence of several compounds including polyphenols, terpenes, and alkaloids (Table 1). Each compound is indicated by the name, the molecular formula, the measured m/z (masse/charge) ratio and mSigma. Identification of the name of each compound corresponds to the level 4, and their molecular formula to the level 3 (Schymanski et al., 2014).

2.2.Vasorelaxant effect on porcine coronary artery rings

The aqueous ethanolic crude extract of *Carissa edulis, Diodia scandens* and *Cleome gynandra* caused greater concentration-dependent relaxations in endothelium intact compared to endothelium denuded porcine coronary artery rings (Figures 1A-C). In addition, the crude extract of *Carissa edulis* induced greater endothelium-dependent relaxations than that of *Diodia scandens* and *Cleome gynandra* (Figures 1A-C). Maximal relaxation was observed in response to 100 µg/ml of *Carissa edulis* crude extract (Figure 1A). All subsequent experiments were performed with *Carissa edulis,* the most active plant, to characterize the underlying mechanism.

The total extract of *Carissa edulis* was successively fractioned with solvents with increasing polarity including cyclohexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol, and their vasorelaxant activity was assessed. The butanolic fraction showed a greater relaxing activity than the crude extract while the ethyl acetate, dichloromethane and cyclohexane extracts were significantly less active (Figure 2A).

Compared to bradykinin, the butanolic extract of *Carissa edulis* induced endothelium-dependent relaxations that persisted at least over 60 min whereas those to bradykinin returned gradually to the pre-contractile level after 5 min (Figure 2B).

Relaxation to *Carissa edulis* crude extract and its butanolic fraction were minimally affected by the presence of indomethacin (an inhibitor of cyclooxygenases), and by TRAM 34 plus UCL 1684 (inhibitors of EDH-mediated relaxation, Figures 2C & D). In contrast, N^G-nitro-L-arginine, a competitive NO synthase inhibitor markedly reduced relaxations to the crude extract and its butanolic fraction indicating the predominant involvement of NO (Figures 2C & D).

2.3. CEBF inhibits KCl, CaCl2, U46619 and serotonin-induced contractile responses: Role of the endothelial formation of NO

CEBF significantly inhibited contractile responses of coronary artery rings with endothelium to different vasocontractile agonists including KCl, $CaCl_2$ in the presence of 40 mM of KCl, U46619 and serotonin in a concentration-dependent manner (Figure 3). At a concentration of 10 µg/ml, CEBF significantly shifted to the right and reduced maximal contractile responses to KCl and $CaCl_2$ whereas those to U46619 and serotonin were markedly reduced (Figure 3). In the presence of N^G-nitro-L-arginine, contractile responses to serotonin were significantly increased and the inhibitory effect of CEBF at 10 µg/ml was not observed indicating that NO synthase-derived NO blunted the contractile response.

2.4. Vasorelaxant effect on rat thoracic aorta

Similar to coronary artery rings, CEBF induced pronounced relaxations of pre-contracted aortic rings with endothelium compared to those without endothelium of young adult rats (Figure 4).

2.5. Preferential accumulation of Carissa edulis polyphenols in the endothelium of porcine coronary artery and rat aorta

Exposure of porcine coronary artery rings and rat aorta rings to CEBF have showed a concentration-dependent accumulation of polyphenols as assessed using Neu reagent that was more pronounced in the endothelium than the vascular smooth muscle (Figures 5A & B). Moreover, the intensity of the endothelial accumulation of polyphenols was greater in the rat thoracic aorta (636.4 ± 61.11 AU) than in the porcine coronary artery rings (348.9 ± 40.5 AU) at 100 µg/ml (Figure 5).

Discussion

The present findings indicate that the aqueous ethanolic extract of *Carissa edulis* leaves induced greater relaxations of coronary artery rings with endothelium than those of *Diodia*

scandens and *Cleome gynandra*. In contrast to rings with endothelium, all three extracts caused only small relaxations in rings without endothelium indicating that the vasorelaxant effect is predominantly mediated by the endothelium. Furthermore, the n-butanolic fraction of *Carissa edulis* (CEBF) was more potent to induce endothelium-dependent relaxations than the crude extract and the cyclohexane, dichloromethane, and ethyl acetate fractions. The *Carissa edulis* crude extract- and the CEBF-induced relaxations in coronary artery rings with endothelium were markedly reduced by L-NA, an inhibitor of NO synthase, and minimally affected by inhibition of EDH-mediated relaxation using the combination of TRAM-34 plus UCL 1684. Thus, the vasorelaxant activity of *Carissa edulis* crude extract and CEBF involves predominantly the endothelial formation of NO.

The formation of NO by endothelial cells is mediated by endothelial NO synthase (eNOS) from L-arginine in response to a variety of stimulators including mechanical forces and humoral factors. The endothelium-derived NO plays a pivotal role in the regulation of vascular homeostasis including the control of vascular tone, inhibition of platelet adhesion and aggregation, and also of monocyte adhesion triggered by a variety of proatherogenic factors (Boo and Jo, 2003a). Besides physiological activators, the endothelial formation of NO can also be induced by numerous natural products as observed in the present study with the polyphenol-rich *Carissa edulis* crude extract. The present observations are in line with previous studies showing endothelium-dependent relaxations of a polyphenol-rich red wine extract (Ndiaye et al., 2005a), and also of a *Dicksonia sellowiana* extract that are mediated by NO and also to some extent by EDH (Rattmann et al., 2012). Of interest, the *Carissa edulis*-induced endothelium-dependent relaxation is a sustained event in contrast to that induced by the physiological agonist bradykinin, and, hence, might be more appropriate for a persistent control of vascular tone. Polyphenols have also been shown to cause endothelium-dependent relaxations in rat aortic rings (Diebolt et al., 2001), porcine coronary artery rings (Ndiaye et

al., 2005a), and human internal mammary artery rings (Zgheel et al., 2019). Besides blood vessels, natural products might also be of interest to regulate the tone of the respiratory cartilaginous tube since a hexan extract of *Achillea millefollium* caused relaxation of rat tracheal rings by a non-competitive antagonism of muscarinic receptors, calcium channel blockade and release of NO (Arias-Durán et al., 2020). In addition to regulation of vascular tone, *Carissa edulis* has been shown to have antioxidant and anti-inflammatory properties (Al-Youssef and Hassan, 2012; Fanta Yadang et al., 2019). Liu et al. studied the effect of *Carissa edulis* root bark on cyclooxygenase-2 (COX-2) activity and observed that the crude extract and four fractions inhibited COX-2 to varying degrees (Liu et al., 2021).

Polyphenols have been shown to increase the catalytic activity eNOS to promote the formation of NO, and also to up-regulate the expression of eNOS in endothelial cells (Schini-Kerth et al., 2010b). Different pathways have been involved in the endothelial formation of NO in response to polyphenols including the redox-sensitive activation of Src/phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase/Akt pathway, the calcium/calmodulin complex pathway, the activation of estrogen receptors and the 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and sirtuin 1/ Krüppel-like Factor 2 (Sirt1/KLF2) pathways (Anter et al., 2004; Oak et al., 2018).

Contractile responses of blood vessels to KCl are mediated predominantly by membrane depolarization and the subsequent influx of calcium through voltage-operated calcium channels (Kuriyama et al., 1998). In case of G-protein coupled membrane receptor-mediated contractile responses, the activator calcium signal involves both extracellular Ca^{2+} influx through receptor-operated calcium channels and voltage-dependent calcium channels, and also the release of Ca^{2+} from intracellular Ca^{2+} stores (Broekaert and Godfraind, 1979). CEBF inhibited in a concentration-dependent manner the contractile response in rings with endothelium induced either by KCl, $CaCl_2$, U46619 or serotonin indicating that the inhibitory effect of CEBF is

effective against several signal transduction pathways leading to the Ca^{2+}-dependent activation of contractile proteins. A similar effect has also been observed previously in coronary artery rings in response to the butanolic fraction of a *Berberis orthobotrys* root extract (Alamgeer et al., 2016). CEBF inhibited very effectively contractile responses to U46619 and also to serotonin. The inhibitory effect of CEBF on contractile responses to serotonin required the presence of a functional endothelium and was prevented by an inhibitor of eNOS, implying a major role of the endothelial formation of NO. A previous study has also shown that the omega-3 polyunsaturated fatty acid formulation EPA:DHA 6:1 strongly inhibited serotonin-induced contractions in porcine coronary artery rings mostly through an increased endothelial formation of NO (Zgheel et al., 2019).

Although several polyphenol-rich products have been shown to stimulate the endothelial formation of NO, little is known regarding their interaction with endothelial cells. Jin et al. showed that the delphinidin-3-glucoside enters endothelial cells via a transport mechanism involving the sodium-dependent glucose transporter1 in a temperature and time-dependent manner (Jin et al., 2013). Therefore, the accumulation of *Carissa edulis* polyphenol in the arterial wall was assessed using the Neu reagent. The findings indicated that *Carissa edulis* polyphenols accumulate in the porcine coronary artery and the rat aorta wall and that this effect occurs preferentially in the endothelium.

Analysis of the *Carissa edulis* crude extract and its butanolic fraction has indicated that both are rich in polyphenols. Several polyphenols have been shown previously to be active compounds that have anti-inflammatory, anticarcinogenic and free radical-scavenging properties (Lin and Lin, 1997). Analysis of CEBF by LC-HRMS revealed the presence of several compounds including polyphenols, terpenes, and alkaloids. Polyphenol compounds present in CEBF are flavonoids, phenolic acids, coumarin and anthraquinone. The flavonoids present in the ethyl acetate extract of *Carissa edulis* have been shown to be mainly in the form

of glycosylated derivatives (Al-Youssef and Hassan, 2017). A previous study suggested that polyphenols are major compounds involved in the vasoprotective effect of natural products followed by terpenes and alkaloids (Maione et al., 2013a). Sun et al. reported that the polyphenols luteolin and quercetin from the buds of *Coreopsis tinctoria* caused relaxation of rat aortic rings (Sun et al., 2013a). Flavonoids of *Elsholtzia splendens* relaxed aortic rings regardless of the presence or absence of the endothelium (Wang et al., 2014a). Paredes et *al.*, evaluated the antihypertensive effect of several flavonoid extracts (lemon, grapefruit + bitter orange, and cocoain) in a rat model of arterial hypertension. The findings indicated that the grapefruit + bitter orange flavonoid extract reduced the elevated blood pressure levels subsequent to the chronic administration of L-NAME (Paredes et al., 2018a). Cardoso Lima et al. showed that both oxygenated terpenes and non-oxygenated terpenes promoted relaxation of rat superior mesenteric artery rings with endothelium (Cardoso Lima et al., 2012a). The alkaloids quindolinone and cryptolepine salt, two indoquinoline alkaloids isolated and identified from aerial parts of *Sida rhombifolia*, showed vasorelaxant activity in rodent isolated mesenteric artery rings with endothelium (Chaves et al., 2017).

In conclusion, the present findings indicate that a *Carissa edulis* leave extract is a potent vasorelaxing natural product and inhibitor of contractile responses mostly by stimulating the endothelial formation of NO. The vasorelaxing activity is mostly observed with the butanolic extract of *Carissa edulis* that is rich in polyphenols, terpenes and alkaloids. Moreover, the *Carissa edulis* polyphenols accumulate in the arterial wall preferentially in the endothelium. The vasorelaxing activity of *Carissa edulis* can contribute to explain its traditional use for the treatment of hypertension.

Acknowledgments:

U.H was supported by a scholarship from the French government.

Author contributions:

Conflicts of interest:

The authors declare no conflict of interest.

Reference

Akpuaka, M.U., Chime, J.C., Igoli, J.O., 2018. Phytochemical Analysis of n- Hexane and Ethylacetate Extracts of Diodia scandens Sw and Spectroscopic Identification of an Omega- 6 Fatty Acid and a Glyceryl Trilinoleoate. Physical Science International Journal 1–9. https://doi.org/10.9734/PSIJ/2018/42782

Alamgeer, Auger, C., Chabert, P., Lugnier, C., Mushtaq, M.N., Schini-Kerth, V.B., 2018. Mechanisms underlying vasorelaxation induced in the porcine coronary arteries by Thymus linearis , Benth. Journal of Ethnopharmacology 225, 211–219. https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.07.010

Alamgeer, Chabert, P., Akhtar, M.S., Jabeen, Q., Delecolle, J., Heintz, D., Garo, E., Hamburger, M., Auger, C., Lugnier, C., Kim, H.-J., Oak, M.-H., Schini-Kerth, V.B., 2016. Endothelium-independent vasorelaxant effect of a Berberis orthobotrys root extract via inhibition of phosphodiesterases in the porcine coronary artery. Phytomedicine 23, 793–799. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.04.005

Al-Youssef, H., Hassan, W.H.B., 2012. Phytochemical and Biological Studies of the Aerial Parts of Carissa edulis Growing in Saudi Arabia. Biomed. Pharmacol. J. 5, 9–18. https://doi.org/10.13005/bpj/314

Al-Youssef, H.M., Hassan, W.H.B., 2017. Chemical constituents of Carissa edulis Vahl. Arabian Journal of Chemistry 10, 109–113. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.01.004

Al-Youssef, H.M., Hassan, W.H.B., 2014. Phytochemical and Pharmacological aspects of Carissa edulis VAHL: A review. Int. J. Curr. Res. Chem. Pharm. Sci 1, 12–24.

Anter, E., Thomas, S.R., Schulz, E., Shapira, O.M., Vita, J.A., Keaney, J.F., 2004. Activation of Endothelial Nitric-oxide Synthase by the p38 MAPK in Response to Black Tea Polyphenols *. Journal of Biological Chemistry 279, 46637–46643. https://doi.org/10.1074/jbc.M405547200

Arias-Durán, L., Estrada-Soto, S., Hernández-Morales, M., Chávez-Silva, F., Navarrete-Vázquez, G., León-Rivera, I., Perea-Arango, I., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., 2020. Tracheal relaxation through calcium channel blockade of Achillea millefolium hexanic extract and its main bioactive compounds. Journal of Ethnopharmacology 253, 112643. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112643

Boo, Y.C., Jo, H., 2003. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. American Journal of Physiology-Cell Physiology 285, C499–C508. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00122.2003

Broekaert, A., Godfraind, T., 1979. A comparison of the inhibitory effect of cinnarizine and papaverine on the noradrenaline-and calcium-evoked contraction of isolated rabbit aorta and mesenteric arteries. European Journal of Pharmacology 53, 281–288.

Cardoso Lima, T., Mota, M.M., Barbosa-Filho, J.M., Viana Dos Santos, M.R., De Sousa, D.P., 2012. Structural relationships and vasorelaxant activity of monoterpenes. DARU J Pharm Sci 20, 23. https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-23

Chaves, O.S., Teles, Y.C.F., Monteiro, M.M. de O., Mendes Junior, L.D.G., Agra, M.D.F., Braga, V.D.A., Silva, T.M.S., Souza, M.D.F.V. de, 2017. Alkaloids and Phenolic Compounds from Sida rhombifolia L. (Malvaceae) and Vasorelaxant Activity of Two Indoquinoline Alkaloids. Molecules 22, 94. https://doi.org/10.3390/molecules22010094

Diebolt, M., Bucher Bernard, Andriantsitohaina Ramaroson, 2001. Wine Polyphenols Decrease Blood Pressure, Improve NO Vasodilatation, and Induce Gene Expression. Hypertension 38, 159–165. https://doi.org/10.1161/01.HYP.38.2.159

Fanta Yadang, S.A., Taiwe Sotoing, G., Ngatcha Zouakeu, K.S., Khan, M.A., Agbor, G.A., Ur-Rahman, N., Ngo Bum, E., 2019. Quantification of Bioactive Compounds and Evaluation of the Antioxidant Activity of *Carissa edulis* Valh (Apocynaceae) Leaves. The Scientific World Journal 2019, 1–9. https://doi.org/10.1155/2019/7549620

Houngbeme, A.G., Gandonou, C., Yehouenou, B., Kpoviessi, S.D.S., Sohounhloue, D., Moudachirou, M., Gbaguidi, F.A., 2014. Phytochemical analysis, toxicity and antibacterial activity of Benin medicinal plants extracts used in the treatment of sexually transmitted infections associated with HIV/AIDS. IJPSR 5, 1739-1745.

Jin, X., Yi, L., Chen, M., Chen, C., Chang, H., Zhang, T., Wang, L., Zhu, J., Zhang, Q., Mi, M., 2013. Delphinidin-3-Glucoside Protects against Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Mitochondrial Dysfunction in Vascular Endothelial Cells via the Sodium-Dependent Glucose Transporter SGLT1. PLOS ONE 8, e68617. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068617

Kuriyama, H., Kitamura, K., Itoh, T., Inoue, R., 1998. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. Physiological Reviews 78, 811–920.

Lin, Y.-L., Lin, J.-K., 1997. (−)-Epigallocatechin-3-gallate Blocks the Induction of Nitric Oxide Synthase by Down-Regulating Lipopolysaccharide-Induced Activity of Transcription Factor Nuclear Factor-κB. Mol Pharmacol 52, 465–472. https://doi.org/10.1124/mol.52.3.465

Liu, Y., Zhang, Y., Muema, F.W., Kimutai, F., Chen, G., Guo, M., 2021. Phenolic Compounds from Carissa spinarum Are Characterized by Their Antioxidant, Anti-Inflammatory and Hepatoprotective Activities. Antioxidants 10, 652.

Maione, F., Cicala, C., Musciacco, G., De Feo, V., Amat, A.G., Ialenti, A., Mascolo, N., 2013. Phenols, Alkaloids and Terpenes from Medicinal Plants with Antihypertensive and Vasorelaxant Activities. A Review of Natural Products as Leads to Potential Therapeutic Agents. Natural Product Communications 8, 1934578X1300800434. https://doi.org/10.1177/1934578X1300800434

Mendis, S., Lindholm, L.H., Mancia, G., Whitworth, J., Alderman, M., Lim, S., Heagerty, T., 2007. World Health Organization (WHO) and International Society of Hypertension (ISH) risk prediction charts: assessment of cardiovascular risk for prevention and control of cardiovascular disease in low and middle-income countries. Journal of Hypertension 25, 1578–1582. https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3282861fd3

Narendhirakannan, R.T., Subramanian, S., Kandaswamy, M., 2007. Anti-inflammatory and lysosomal stability actions of Cleome gynandra L. studied in adjuvant induced arthritic rats. Food and Chemical Toxicology 45, 1001–1012. https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.12.009

Ndiaye, M., Chataigneau, M., Lobysheva, I., Chataigneau, T., Schini-Kerth, V.B., 2005. Red wine polyphenols-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. The FASEB Journal 19, 1–20. https://doi.org/10.1096/fj.04-2146fje

Oak, M.-H., Auger, C., Belcastro, E., Park, S.-H., Lee, H.-H., Schini-Kerth, V.B., 2018. Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium. Free Radical Biology and Medicine, Redox Signalling in Plants and Implications for Mammalian Physiology 122, 161–170. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.018

Paredes, M.D., Romecín, P., Atucha, N.M., O'Valle, F., Castillo, J., Ortiz, M.C., García-Estañ, J., 2018. Beneficial Effects of Different Flavonoids on Vascular and Renal Function in L-NAME Hypertensive Rats. Nutrients 10, 484. https://doi.org/10.3390/nu10040484

Schini-Kerth, V.B., Auger, C., Kim, J.-H., Étienne-Selloum, N., Chataigneau, T., 2010. Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. Pflugers Arch - Eur J Physiol 459, 853–862. https://doi.org/10.1007/s00424-010-0806-4

Schymanski, E.L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H.P., Hollender, J., 2014. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. ACS Publications.

Sen, S., Chakraborty, R., 2017. Revival, modernization and integration of Indian traditional herbal medicine in clinical practice: Importance, challenges and future. Journal of Traditional and Complementary Medicine 7, 234–244. https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.05.006

Sun, Y.-H., Zhao, J., Jin, H.-T., Cao, Y., Ming, T., Zhang, L.-L., Hu, M.-Y., Hamlati, H., Pang, S.-B., Ma, X.-P., 2013. Vasorelaxant effects of the extracts and some flavonoids from the buds of Coreopsis tinctoria. Pharmaceutical Biology 51, 1158–1164. https://doi.org/10.3109/13880209.2013.782320

Tokoudagba, J.-M., Auger, C., Bréant, L., N'Gom, S., Chabert, P., Idris-Khodja, N., Gbaguidi, F., Gbenou, J., Moudachirou, M., Lobstein, A., Schini-Kerth, V.B., 2010. Procyanidin-rich fractions from Parkia biglobosa (Mimosaceae) leaves cause redox-sensitive endothelium-dependent relaxation involving NO and EDHF in porcine coronary artery. Journal of Ethnopharmacology 132, 246–250. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.08.031

Wang, H.-P., Lu, J.-F., Zhang, G.-L., Li, X.-Y., Peng, H.-Y., Lu, Y., Zhao, L., Ye, Z.-G., Bruce, I.C., Xia, Q., Qian, L.-B., 2014. Endothelium-dependent and -independent vasorelaxant actions and mechanisms induced by total flavonoids of Elsholtzia splendens in rat aortas. Environmental Toxicology and Pharmacology 38, 453–459. https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.07.019

Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., Piao, G., 2016. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. Molecules 21, 559. https://doi.org/10.3390/molecules21050559

Zgheel, F., Perrier, S., Remila, L., Houngue, U., Mazzucotelli, J.-P., Morel, O., Auger, C., Schini-Kerth, V.B., 2019. EPA:DHA 6:1 is a superior omega-3 PUFAs formulation attenuating platelets-induced contractile responses in porcine coronary and human internal mammary artery by targeting the serotonin pathway via an increased endothelial formation of nitric oxide. European Journal of Pharmacology 853, 41–48. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.03.022

Figure legends

Figure 1. The crude extract of *Carissa edulis* **(A)** induced greater endothelium-dependent relaxations than that of *Diodia scandens* **(B)** and *Cleome gynandra* **(C)** in porcine coronary artery rings. Results are shown as means ± S.E.M. of 4-6 experiments. *P < 0.05 vs respective control with endothelium.

Figure 2. (A) The butanolic fraction of *Carissa edulis* (CEBF) is more active than the crude extract and the other types of fractions. **(B)** CEBF induced endothelium-dependent relaxations that lasted for at least 60 min whereas those to bradykinin (BK) were transient and returned to the pre-contractile level after 5 min. Both the crude extract- **(C)** and the butanolic fraction- **(D)** induced relaxations involved predominantly NO in porcine coronary arteries with endothelium. Results are shown as means ± S.E.M. of 4-5 experiments. *P < 0.05 vs the respective control.

Figure 3. The butanolic fraction of *Carissa edulis* inhibits contractile responses to KCl **(A)**, $CaCl_2$ **(B)**, U46619 **(C),** and serotonin **(D)** in porcine coronary artery rings with endothelium. Role of endothelium-derived NO was assessed using N^G-Nitro-L-arginine (300 µM) **(E)**. Results are shown as means ± S.E.M. of 4-6 experiments. *P < 0.05 as compared to control.

Figure 4. The butanolic extract of *Carissa edulis* induced relaxations of rat aortic rings with but not without endothelium. Results are shown as means ± S.E.M. of 4-5 experiments. *P < 0.05 vs control with endothelium.

Figure 5. Exposure of (A) porcine coronary artery rings with endothelium and (B) rat aortic rings with endothelium to the butanolic fraction of *Carissa edulis* caused the accumulation of polyphenols predominantly in the endothelium and in a concentration-dependent manner. Rings were exposed to the butanolic fraction for 3 min before being exposed to the Neu reagent for 5 min to assess the uptake of polyphenols using confocal microscopy. Results are shown as means ± S.E.M. of 4 experiments. * P < 0.05 vs control

Figure 1

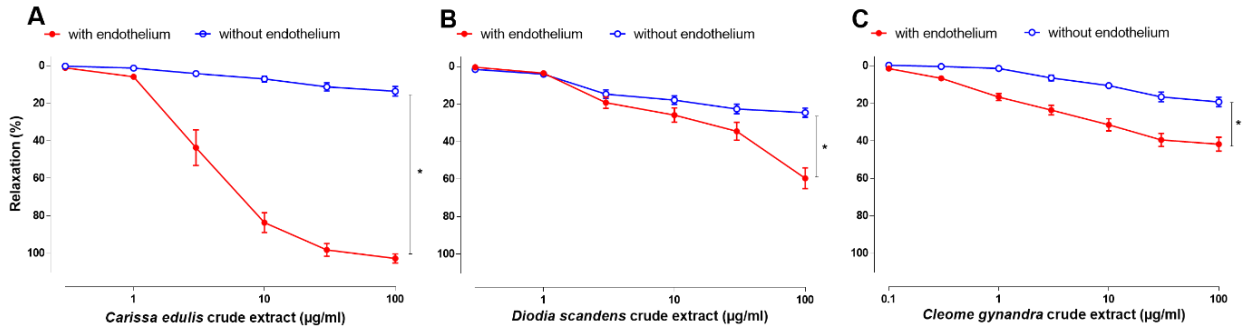


Figure 2

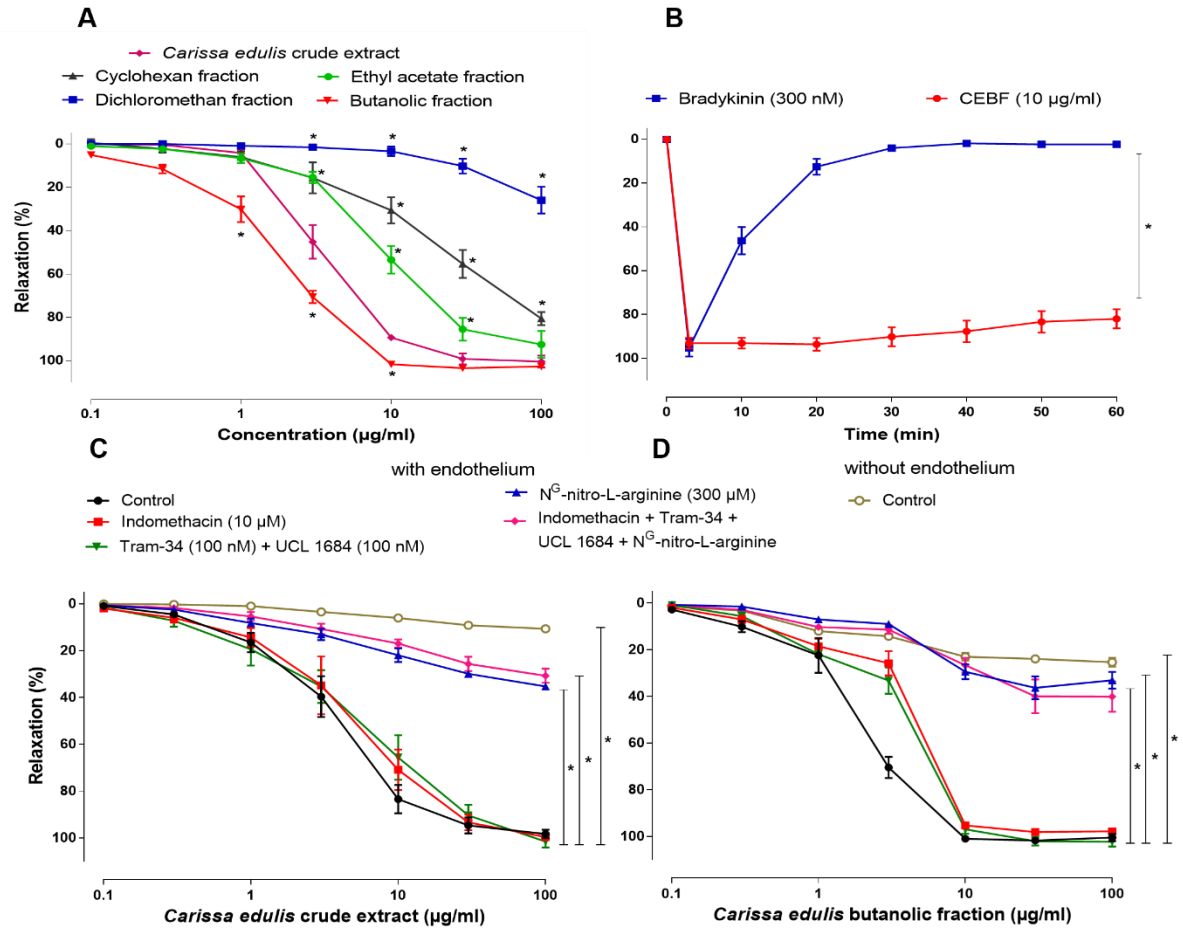


Figure 3

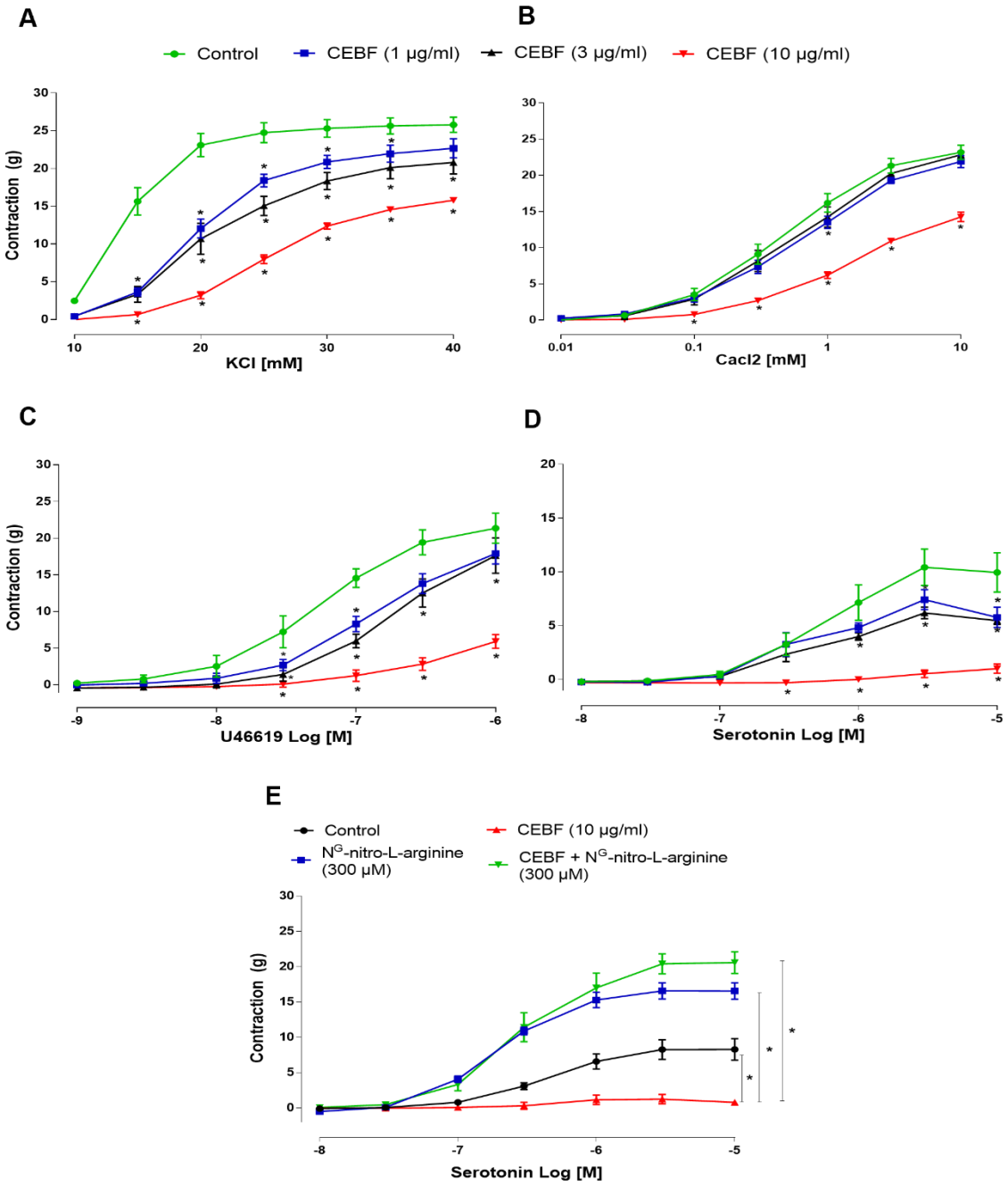

A
Control
CEBF (1 µg/ml)
CEBF (3 µg/ml)
CEBF (10 µg/ml)
Contraction (g)
KCl [mM]
B
Cacl2 [mM]
C
U46619 Log [M]
D
Serotonin Log [M]
E
Control
N^G-nitro-L-arginine (300 µM)
CEBF (10 µg/ml)
CEBF + N^G-nitro-L-arginine (300 µM)
Contraction (g)
Serotonin Log [M]

Figure 4

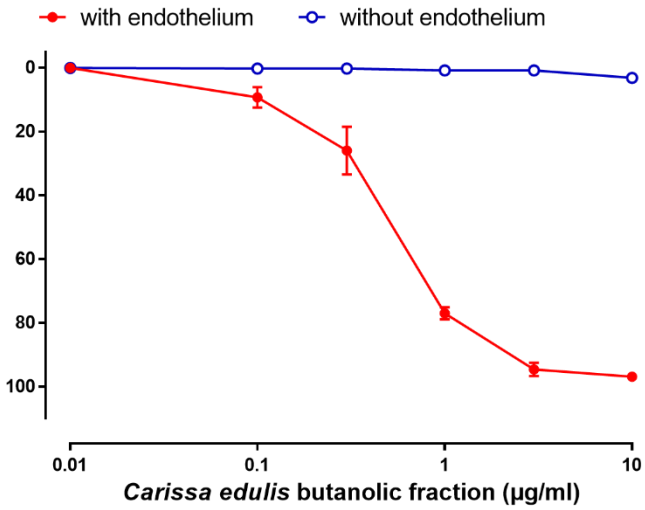


Figure 5

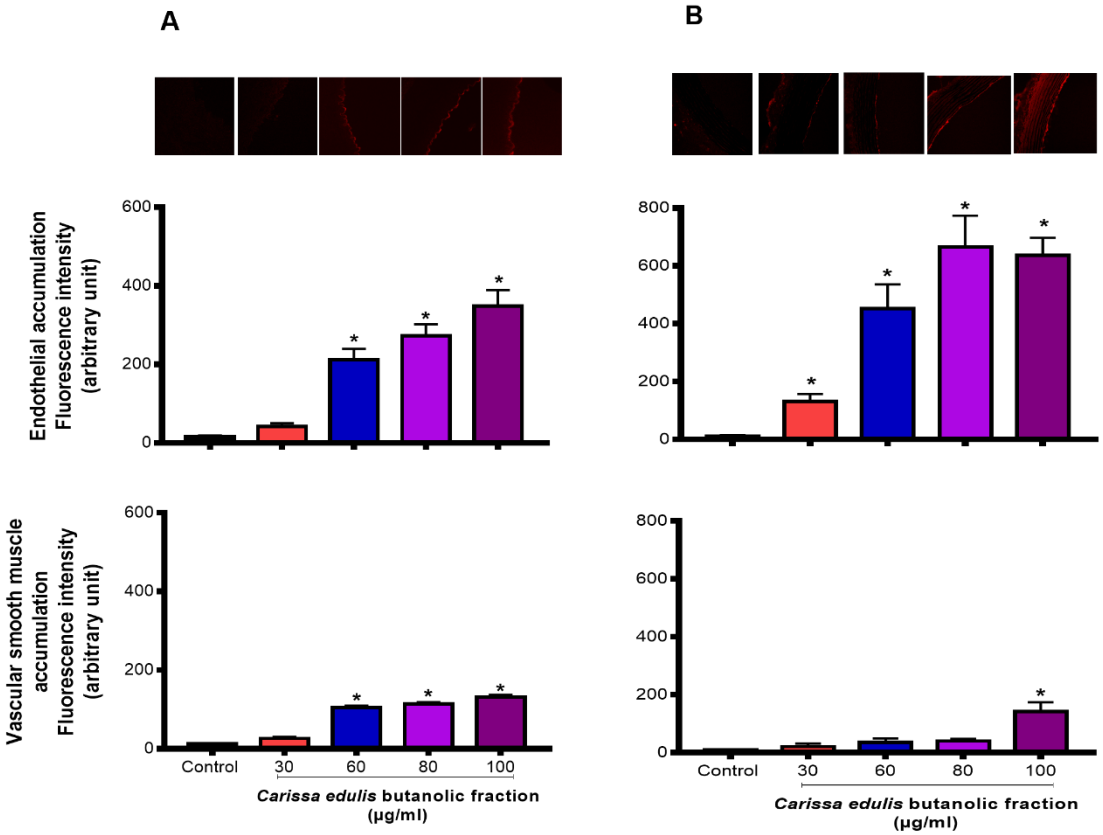


Table 1: Chemical compounds analysis

Name	Molecular formula	Exact Mass (g/mol)	Measured m/z	Ion	Δm/z (ppm)	mSigma
Ethyl beta-D-glucopyranoside	$C_8H_{16}O_6$	208.094688	247.05802	$[M+K]^+$	0.346	3.8
Germanaism D	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610.15338491	611.16146	$[M+H]^+$	1.456	9.0
Genistein 7-O-(2''-p-coumaroylglucoside)	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578.142426296	579.15025	$[M+H]^+$	0.894	5.0
alpha-Ketoglutaric acid	$C_5H_6O_5$	146.021523	129.01819	$[M-H2O+H]^+$	-0.344	6.0
Cinchonanin IIa	$C_{39}H_{32}O_{15}$	740.17412	741.18305	$[M+H]^+$	2.184	8.0
Randioside	$C_{16}H_{20}O_{10}$	372,10564683	373.11326	$[M+H]^+$	0.825	16.5
trans-2-Hexenyl acetate	$C_8H_{14}O_2$	142.09938	143.10667	$[M+H]^+$	0.184	4.3
Plumiepoxide	$C_{21}H_{26}O_{13}$	486.13734092	487.17514	$[M+H]^+$	1.246	10.5
5,7,4'-Trihydroxyisoflavone 7-O-beta-D-glucopyranoside-4'-O-[(beta-D-gucopyranosyl)-(1->2)-beta-D-glucopyranoside]	$C_{33}H_{40}O_{20}$	756.21129372	757.22015	$[M+H]^+$	2.088	9.0
Tectorigenin 7-O-gentiobioside	$C_{28}H_{32}O_{16}$	624.169035	625.17731	$[M+H]^+$	1.300	5.6
Patuletin 7-[6''-(2-methylbutyryl)-glucoside]	$C_{27}H_{30}O_{14}$	578.523	579.17190	$[M+H]^+$	1.684	18.2
Catechin 3-O-rutinoside	$C_{27}H_{34}O_{15}$	598.18977	599.19802	$[M+H]^+$	1.746	19.7
6-C-Glucosylquercetin	$C_{21}H_{20}$	464.095490	465.10325	$[M+H]^+$	0.852	11.0
Cimicifugic acid E	$C_{21}H_{20}O_{10}$	432.105647				
Foliasalacioside B2	$C_{24}H_{40}O_{11}$	504.25706212	505.26442	$[M+H]^+$	0.041	7.6
7-Hydroxy-10-deoxyeucommiol	$C_9H_{16}O_4$	188.104859	203.09166	$[M+H]^+$	1.333	9.2
Oligandriortholactone	$C_{23}H_{30}O_9$	450.188983	451.19693	$[M+H]^+$	1.637	15.4
Ethyl plakortide Z	$C_{16}H_{30}O_4$	286.21440945	269.21128	$[M-H2O+H]^+$	0.598	6.4
alpha-Ketopantoate	$C_7H_{12}O_3$	144.078644241	145.08589	$[M+H]^+$	-0.199	5.7
5-Hydroxycoumarin	$C_9H_6O_3$	162.031694	163.03902	$[M+H]^+$	0.062	3.7
Coumarin	$C_9H_6O_2$	146.036779	147.04399	$[M+H]^+$	-0.451	5.4
Cordytropolone	$C_9H_8O_4$	180.042259	181.04965	$[M+H]^+$	0.649	7.5
2-Furoic acid	$C_5H_4O_3$	112.016044	113.02331	$[M+H]^+$	-0.297	3.6
2-Oxobutyric acid	$C_4H_6O_3$	102.031694	103.03915	$[M+H]^+$	1.775	6.4
2-Acetolactate	$C_5H_8O_4$	132.042259	133.04952	$[M+H]^+$	-0.054	7.9
Citramalic acid	$C_5H_8O_5$	148.037173	149.04435	$[M+H]^+$	-0.650	6.7
Isocitric acid	$C_6H_8O_7$	192.027003	193.03451	$[M+H]^+$	1.120	5.1
3-Hydroxybenzoic acid	$C_7H_6O_3$	138.031694	139.03886	$[M+H]^+$	-0.784	5.2
Cyanomaclurin	$C_{15}H_{12}O_6$	288.063388	289.07099	$[M+H]^+$	1.119	14.6
n-Butyl-beta-D-fructopyranoside	$C_{10}H_{20}O_6$	236.125988	237.13373	$[M+H]^+$	1.975	10.5
Lucidin 3-O-primeveroside	$C_{26}H_{28}O_{14}$	564.147906	565.15595	$[M+H]^+$	1.344	13.9
Conduritol A	$C_6H_{10}O_4$	146.057909	147.06517	$[M+H]^+$	-0.130	7.0
Cnidioside A	$C_{17}H_{20}O_9$	368.110732	369.11847	$[M+H]^+$	1.280	1.1
Pyruvic acid	$C_3H_4O_3$	88.016044	89.02343	$[M+H]^+$	1.403	1.2
Tagitinin A	$C_{19}H_{28}O_7$	368.183503	369.19109	$[M+H]^+$	0.849	20.7

L-Dehydroascorbate	$C_6H_5O_6$	173.008613	157.01342	$[M-H2O+H]^+$	1.559	10.2
2-Ketoisovalerate	$C_5H_8O_3$	116.047344	117.05463	$[M+H]^+$	0.075	4.8
Nodosin	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594.15847025	595.16653	$[M+H]^+$	1.362	2.1
Itaconic acid	$C_5H_6O_4$	130.026609	131.02662	$[M+H]^+$	0.122	11.3
Penitricin D	$C_4H_4O_2$	84.021129	85.02836	$[M+H]^+$	-0.432	7.54
Suberic acid	$C_8H_{14}O_4$	174.089209	175.09663	$[M+H]^+$	0.987	7.94
2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	$C_6H_8O_4$	144.042252	145.04945	$[M+H]^+$	-0.583	-
Clandonensine	$C_{12}H_{20}O_7$	276.120903	277.12828	$[M+H]^+$	0.379	14.5
3beta-Hydroxy-5alpha-pregn-16-en-20-one	$C_{21}H_{32}O_2$	316.24023	299.23712	$[M-H2O+H]^+$	0.788	14.5
Alatol	$C_{17}H_{18}O_6$	318.110338	319.17538	$[M+H]^+$	0.790	17.2
Jioglutin C	$C_{11}H_{18}O_6$	246.110338	233.10232	$[M+H]^+$	1.466	10.6
Phosphate	H_3O_4P	97.97689557	98.98438	$[M+H]^+$	2.114	-
4-(4'-Hydroxy-3'-methylbutoxy)benzaldehyde	$C_8H_8O_3$	152.047344	231.09944	$[M+H]^+$	1.174	13.0
3R-(3R-hydroxybutyryloxy)butyric acid	$C_8H_{14}O_5$	190.084122	173.08072	$[M-H2O+H]^+$	-0.680	2.2
2-Senecioyl-4-vinylphenol	$C_{13}H_{14}O_2$	202.09938	203.10640	$[M+H]^+$	-1.241	10.0
Jioglutolide	$C_9H_{14}O_4$	186.089209	187.09618	$[M+H]^+$	-1.658	8.3
Hydroxypyruvic acid	$C_3H_4O_4$	104.010959	105.01836	$[M+H]^+$	1.164	4.8
Fucoserratene	C_8H_{12}	108.0939	109.10115	$[M+H]^+$	-0.229	2.0
Ononitol	$C_7H_{14}O_6$	194.07904	195.08658	$[M+H]^+$	1.370	9.5
Foliasalacioside B2	$C_{24}H_{40}O_{11}$	504.56800	505.26442	$[M+H]^+$	0.041	7.6
Botrytinone	$C_7H_{10}O_4$	158.057909	159.06514	$[M+H]^+$	-0.419	6.5
Dearabinosyl pneumonanthoside	$C_{19}H_{30}O_7$	370.199154	371.20678	$[M+H]^+$	0.944	21.8
(+)-Cyclophellitol	$C_7H_{12}O_5$	176.068473	177.07603	$[M+H]^+$	1.591	20.7
Laurentiquinone C	$C_{18}H_{22}O_7$	350.136553	452.11836	$[M+H]^+$	0.588	2.8
L-(-)-Malic acid	$C_4H_6O_5$	134.021523	135.02871	$[M+H]^+$	-0.652	7.3
Dracunculifoside B	$C_{22}H_{22}O_{12}$	478.111126	479.11868	$[M+H]^+$	0.370	4.8
Annularin C	$C_{10}H_{14}O_4$	198.089209	215.09173	$[M+H]^+$	1.527	10.0
Integristerone A	$C_{27}H_{44}O_8$	496.303618	497.31151	$[M+H]^+$	1.059	10.5
Calocedimer A	$C_{30}H_{46}O_2$	438.34978071	439.35710	$[M+H]^+$	0.120	4.0
Sarmentol A	$C_{13}H_{26}O_3$	230.1881947	231.19586	$[M+H]^+$	1.472	9.2
Cyclonervilasterol	$C_{29}H_{46}O$	410.35486609	411.36226	$[M+H]^+$	0.315	16.3
Yardenone A	$C_{30}H_{48}O_6$	504.345089	505.35252	$[M+H]^+$	0.301	3.5
Dendronesterone B	$C_{28}H_{44}O$	396.339216	397.34686	$[M+H]^+$	0.925	29.9
10-Hydroxyaloin B	$C_{21}H_{22}O_{10}$	434.121307	435.12896	$[M+H]^+$	1.211	29.1
3-Methyl-2-butenoic acid	$C_5H_8O_2$	100.052429494	101.05977	$[M+H]^+$	0.765	5.9
(-)-Amurensisin	$C_{22}H_{16}O_{10}$	440.074347	441.08202	$[M+H]^+$	0.954	7.3
Oligandrumin B	$C_{17}H_{24}O_7$	340.15220312	341.15969	$[M+H]^+$	0.615	18.2
Hyperxanthone F	$C_{16}H_{12}O_7$	316.05830274	317.05864	$[M+H]^+$	1.077	1.8
Globostelletin	$C_{30}H_{44}O_4$	468.32396	469.33148	$[M+H]^+$	0.851	7.8
Podolactone B	$C_{19}H_{22}O_9$	394.126382	395.13438	$[M+H]^+$	1.825	23.0
2-Hydroxycampholonic acid	$C_{10}H_{16}O_4$	200.104859	201.11232	$[M+H]^+$	0.921	8.4
Succinic anhydride	$C_4H_4O_3$	100.016044	101.02340	$[M+H]^+$	0.772	5.2
Suranone	$C_{24}H_{38}O_3$	374.28209508	375.28937	$[M+H]^+$	-0.017	24.5
Lepidimoide	$C_{12}H_{18}O_{10}$	322.089997	345.07977	$[M+H]^+$	1.792	18.2

Moniliformin	$C_4H_2O_3$	98.000394	99.00773	$[M+H]^+$	0.592	3.6
Didemnimide A	$C_{15}H_{10}N_4O_2$	278.080376	279.08697	$[M+H]^+$	2.642	14.1
5-Hydroxy-1-methoxyxanthone	$C_{14}H_{10}O_4$	242.057909	243.06549	$[M+H]^+$	1.262	12.0
Leptoclinidamine B	$C_{16}H_{19}N_5O_5$	361.138619	362.14561	$[M+H]^+$	-0.788	20.7
L-Galactono-1,4-lactone	$C_6H_{10}O_6$	178.047738	179.05519	$[M+H]^+$	0.672	8.6
(-)-(1R)-8-Hydroxy-4-p-menthen-3-one	$C_{10}H_{16}O_2$	168.11503	169.12227	$[M+H]^+$	-0.035	6.1
Zinolol	$C_{14}H_{21}NO_8$	331.126717	332.13428	$[M+H]^+$	0.878	16.5
Tuberostemospironine	$C_{13}H_{19}NO_4$	253.131408	254.13877	$[M+H]^+$	0.371	3.9
N-Methylpyrrolidine	$C_5H_{11}N$	85.089149	86.09647	$[M+H]^+$	0.486	3.0
2-Oxo-N-acetyldopamine	$C_{10}H_{11}NO_4$	209.068808	210.07646	$[M+H]^+$	1.773	6.3
L-Tryptophan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	204.089878	205.09742	$[M+H]^+$	1.277	3.5
6-Hydroxykynurenic acid	$C_{10}H_7NO_4$	205.037508	206.04507	$[M+H]^+$	1.592	3.9
Kaempferide 3-rhamnoside-7-(6''-succinylglucoside)	$C_{32}H_{36}O_{18}$	708.190164	709.19821	$[M+H]^+$	1.106	24.9
YUA 001	$C_{13}H_{19}NO_2$	221	222.14917	$[M+H]^+$	1.426	9.0
2R-Hydroxymethyl-3S-hydroxypyrrolidine	$C_5H_{11}NO_2$	117.078979	118.08615	$[M+H]^+$	-0.882	2.0
Spinamycin	$C_{43}H_{74}N_2O_{14}$	842.514005	287.13976	$[M+H]^+$	2.588	12.3
Betalamic acid	$C_9H_9NO_5$	211.048072	212.05570	$[M+H]^+$	1.489	8.8
Pyroglutamic acid	$C_5H_7NO_3$	129.042593	130.04988	$[M+H]^+$	0.077	5.0
Lutessine	$C_{19}H_{21}NO_6$	359.376	360.14477	$[M+H]^+$	1.545	19.4
Guvacoline	$C_7H_{11}NO_2$	141.078979	142.08624	$[M+H]^+$	-0.088	3.5
Salinosporamide H	$C_{15}H_{21}NO_4$	279.147058	280.15456	$[M+H]^+$	0.205	8.3
2-Pyrrolidone	C_4H_7NO	85.052764	86.06028	[M+H]+	2.752	-
L-Pipecolic acid	$C_6H_{11}NO_2$	129.078979	130.08613	$[M+H]^+$	-1.018	2.7
L-Tyrosine	$C_9H_{11}NO_3$	181.073893	182.08144	$[M+H]^+$	0.987	6.3

Résumé article 2

La dysfonction endothéliale liée à l'âge, caractérisée par une altération des relaxations dépendantes de l'endothélium et une augmentation du stress oxydatif vasculaire, est un événement clé favorisant l'augmentation du tonus vasculaire et de la pression artérielle, ainsi que le développement de maladies cardiovasculaires. L'objectif de l'étude est d'examiner si *Carissa edulis*, peut améliorer la dysfonction endothéliale liée à l'âge et, si oui, de déterminer les mécanismes sous-jacents.

Les branches principale et secondaire de l'artère mésentérique et de l'aorte thoracique de rats d'âge moyen (40 semaines) qui avaient reçu quotidiennement 90 mg/kg d'extrait brut *de Carissa edulis* (CECE) dans l'eau potable pendant deux semaines ont été étudiées et comparées à celles de rats d'âge moyen et de jeunes rats (12 semaines) témoins. La réactivité vasculaire a été évaluée à l'aide de chambres à organes isolés, l'absorption de polyphénols dans les segments d'aorte thoracique de rat à l'aide du réactif Neu et de la fraction butanolique de *Carissa edulis* (CEBF, la fraction la plus active), le stress oxydatif à l'aide des sondes rédox-sensibles dihydroéthidium et MitoSox, et le niveau d'expression des protéines cibles par immunofluorescence dans les branches principale et secondaire de l'artère mésentérique.

Les résultats de cette étude ont montré que le vieillissement était associé à une dysfonction endothéliale caractérisée par une réduction de la relaxation à l'acétylcholine et une augmentation de la réponse contractile à la phényléphrine dans les anneaux d'artère mésentérique principale et d'aorte thoracique. En revanche, les relaxations au nitroprussiate de sodium (donneur de NO) et au levcromakalim (un activateur des canaux K_{ATP}) étaient similaires chez les rats jeunes et d'âge moyen. La dysfonction endothéliale était également associée à une augmentation de la formation vasculaire et mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et à une augmentation du niveau d'expression de la NO synthase endothéliale (eNOS), de la nitrotyrosine, et du système angiotensine local (ACE et AT_1R) dans

les branches principale et secondaire de l'artère mésentérique. Le traitement par CECE a amélioré la relaxation médiée par le NO. Il a aussi normalisé la réponse contractile à la phényléphrine, la formation vasculaire et mitochondriale de ROS et les niveaux d'expression de eNOS, nitrotyrosine, ACE et AT_1R. L'exposition de sections aortiques de jeunes rats à la CEBF a entraîné une accumulation préférentielle de polyphénols dans l'endothélium. Cette accumulation est réduite par la sotagliflozine, un double inhibiteur des co-transporteurs sodium-glucose (SGLT) 1 et 2, et par l'empagliflozine, un inhibiteur sélectif du SGLT2. Une accumulation de polyphénols a été observée dans toute la paroi artérielle de l'aorte de rats d'âge moyen après une consommation de CECE pendant deux semaines.

En conclusion, la prise de CECE a amélioré la dysfonction endothéliale liée à l'âge chez les rats d'âge moyen en améliorant les relaxations dépendantes de l'endothélium, en normalisant les réponses contractiles et en réduisant le stress oxydatif et le système angiotensine local. L'effet bénéfique implique un meilleur équilibre endothélial eNOS/NO-ROS, vraisemblablement après l'accumulation de polyphénols dans les cellules endothéliales via SGLT1 et SGLT2. De telles effets protecteurs vasculaires pourraient contribuer à expliquer l'utilisation de *Carissa edulis* dans la médecine traditionnelle pour traiter les pathologies vasculaires.

Intake of *Carissa edulis* improves an established age-related endothelial dysfunction by restoring the eNOS/NO-ROS balance and by reducing the pro-oxidant local angiotensin system: Role of endothelial SGLT1 and 2

Ursula Houngue[1,2], Lamia Remila[1], Ahmed B. Chaker[1], Jean-Marie Tokoudagba[2], Cyril Auger[1], Fernand Gbaguidi[2], Valérie Schini-Kerth[1*]

(1) INSERM UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, University of Strasbourg, Strasbourg, France

(2) Medicinal Organic Chemistry Laboratory, Faculty of Health Sciences, University of Abomey-Calavi, Cotonou, Benin

Name and complete address of corresponding author:

Valérie B. Schini-Kerth

INSERM UMR 1260, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg

1, rue Eugène Boeckel

67084 Strasbourg, France

Phone : +33 3 68 85 41 27

Fax : +33 3 68 85 43 13

Email : valerie.schini-kerth@unistra.fr

Abstract

Background: Age-related endothelial dysfunction as characterized by impaired endothelium-dependent relaxations and increased vascular oxidative stress is a key event promoting enhanced vascular tone and blood pressure, and the development of cardiovascular diseases.

Aim: The aim of the study was to investigate whether *Carissa edulis*, a plant traditionally used for the treatment of vascular disease such as hypertension in Benin, can improve age-related endothelial dysfunction and, if so, to determine the underlying mechanisms.

Study design: The main and secondary branch of the mesenteric artery, and the thoracic aorta from middle-aged (40 weeks) rats that had received daily 90 mg/kg/day of *Carissa edulis* crude extract (CECE) in the drinking water for two weeks were investigated and compared to those of control middle-aged rats and control young (12-week-old) rats. Vascular reactivity was assessed using organ chambers, uptake of polyphenols in rat thoracic aortic segments using Neu reagent and the butanolic fraction of *Carissa edulis* (CEBF, the most active fraction), oxidative stress using dihydroethidium and MitoSox, and the expression level of target proteins by immunofluorescence staining in the main and secondary branch of the mesenteric artery.

Results: Ageing is associated with an endothelial dysfunction characterized by a reduced relaxation to acetylcholine and an increased contractile response to phenylephrine in the main mesenteric artery and aorta rings. In contrast, relaxations to sodium nitroprusside (NO donor) and levcromakalim (an activator of K_{ATP} channels) were similar in the middle-aged and young rats. Endothelial dysfunction was associated with an increased vascular and mitochondrial formation of reactive oxygen species (ROS), and an increased expression level of endothelial NO synthase (eNOS), nitrotyrosine, and of the local angiotensin system (ACE and AT1R) in the main and secondary branch of the mesenteric artery. CECE treatment improved the NO-mediated relaxation, normalized the contractile response to phenylephrine, and the vascular

and mitochondrial formation of ROS and the expression level of eNOS, nitrotyrosine, ACE and AT1R. Exposure of aortic sections of young rats to CEBF resulted in a preferential accumulation of polyphenols in the endothelium, that is reduced by the dual sodium-glucose co-transporter (SGLT) 1 and 2 inhibitor, sotagliflozin, and by the selective SGLT2 inhibitor, empagliflozin. In the aorta of middle-aged rats following a 2-week intake of CECE, an accumulation of polyphenols was observed throughout the arterial wall. Exposure of aortic sections of CECE-treated middle-aged rats to CEBF resulted in an increased polyphenol signal predominantly in the endothelium that was prevented by sotagliflozin and empagliflozin.

Conclusion: CECE intake improves age-related endothelial dysfunction in middle-aged rats by restoring endothelium-dependent relaxations and by reducing oxidative stress and the local angiotensin system. The beneficial effect involves an improved endothelial eNOS/NO-ROS balance possibly after the accumulation of polyphenols in endothelial cells via SGLT1 and SGLT2.

Keywords: CECE, Ageing, Endothelial dysfunction, Oxidative stress, Nitric oxide

Introduction

Ageing is associated with an increased risk of cardiovascular disease (CVD). Indeed, the risk rises sharply after the age of 40 with a 50% increased risk of having chronic CVD, 85% for hypertension and 20% for chronic heart failure (Benjamin et al., 2018; Lakatta, 2015). Under physiological conditions, the endothelium plays an essential role in the control of vascular homeostasis by regulating blood fluidity and fibrinolysis, vascular tone, angiogenesis, monocyte / leukocyte adhesion and platelet aggregation mostly via the generation of vasoprotective factors such as nitric oxide (NO) and endothelium-dependent hyperpolarization (EDH). Ageing is associated with the development of an endothelial dysfunction that is characterized by an unbalance between endothelium-derived relaxing factors and endothelium-derived vasoconstrictor factors including prostanoids. Endothelial dysfunction predisposes the vascular system to vasoconstriction, and pro-atherothrombotic and pro-inflammatory responses promoting cardiovascular disease (Grover-Páez and Zavalza-Gómez, 2009; Sun et al., 2016). Oxidative stress is a major cause of ageing-related endothelial dysfunction mainly by reducing the bioavailability of NO subsequent to uncoupling of endothelial NO synthase (eNOS) (Barrows et al., 2019) and by promoting arterial stiffness (Donato et al., 2018). Hence, the age-related endothelial dysfunction appears as an important therapeutic goal in preventing CVD in the elderly people (Seals et al., 2011).

Plants have formed the basis of sophisticated traditional medicine (TM) systems that have existed for thousands of years and continue to provide humanity with new remedies (Beyene et al., 2016; Gurib-Fakim, 2006; Petrovska, 2012). Medicinal plants still play an important role in primary health care in many countries in sub-Saharan Africa. Eighty percent of the more than 1 billion people in the 54 African countries, especially those living in rural areas, use TM for their primary healthcare needs (Tilburt and Kaptchuk, 2008).

Carissa edulis is one of plants traditionally used for the treatment of hypertension. Studies have shown that this plant contains polyphenols like flavonoids, which can increase the bioavailability of NO and reduce oxidative stress (Maaliki et al., 2019). Indeed, polyphenol-rich products such as red wine extracts prevented the development of endothelial dysfunction by normalizing the endothelial formation of NO and the excessive vascular formation of superoxide anions and the expression of NADPH oxidase subunits in experimental models of CV risk factors including hypertension and ageing (Sarr et al., 2006; Schini-Kerth et al., 2010a).

Therefore, the aim of the present study was to investigate whether short-term oral intake of CECE by middle-aged Wistar rats can improve endothelial dysfunction and, if so, to determine the mechanisms involved.

1. Materials and Methods

1.1. Ethics statement

This study was done in accordance with the guide of animal care and use in laboratory, published by US National Institute of Health (Bethesda, MD, USA; NIH publication number 85-23, revised 1996). The present protocol was authorized by the French Ministry of Higher Education, Research, and Innovation and by the local Ethics Committee (Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg). All experiments were performed in a registered animal yard within Faculty of Pharmacy (Authorization number #7626-2016111715542930).

1.2. Preparation of Carissa edulis extract

Leaves were dried and ground into powder. 100 g were macerated at room temperature with ethanol-water (6:4, v/v) for 72 h. The filtered extracts were combined and evaporated under reduced pressure to obtain a dry extract (yield 25%).

1.3. Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich Chimie S.A.R.L., St.-Quentin-Fallavier, France).

1.4. In vivo treatment of rats

Male Wistar rats obtained from Janvier-labs, (Le Genest-Saint-Isle, France) were kept in the animal facility with controlled temperature (22 °C), 12 h light/dark cycle. They were given free access to standard food and water from the age of 12 to 40 weeks. They were then assigned to three groups. Middle-aged rats received either water or *Carissa edulis* extract (90 mg/kg/day) in the drinking water for two weeks while young rats (12 weeks), used as control, received water. After treatment, rats were weighed and euthanized by an intra-peritoneal injection of a mixture of ketamine/xylazine (120/10 mg/kg) before collection of organs.

1.5. Vascular reactivity studies

Main mesenteric artery and thoracic aorta were cleaned of connective tissue and cut into rings (2-3 mm) before suspension in organ baths containing oxygenated (95% O_2, 5% CO_2) Krebs bicarbonate solution (composition in mM: NaCl 119, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.18, $MgSO_4$ 1.18, $CaCl_2$ 1.25, $NaHCO_3$ 25 and D-glucose 11, pH 7.4, 37 °C). The resting tension was set at 1 g for main mesenteric arteries and 2 g for thoracic aorta before determination of changes in isometric tension. After the equilibration period, rings were exposed to Krebs bicarbonate solution containing a high concentration of potassium (80 mM) until reproducible contractile responses were obtained. To check the presence of a functional endothelium, rings were contracted with phenylephrine (PE, 1 µM) before the induction of a relaxation to acetylcholine (ACh, 1 µM). For the determination of contractile responses, rings were subjected to a concentration-contraction curves in response to PE. To assess the endothelium-dependent relaxations, rings were contracted with PE (1 µM) before the construction of concentration-relaxation curves in response to ACh.

To characterise the different pathways mediating relaxation, rings were incubated for 30 min with a pharmacological agent before the construction of a concentration-response curve. The role of NO-mediated relaxations was studied in rings incubated with both indomethacin (10 µM, a non-selective COX inhibitor) and TRAM-34 plus UCL-1684 (1 µM each, inhibitors of IK_{Ca} and SK_{Ca}, respectively). To study EDH-mediated relaxation, rings were incubated with indomethacin and N^G-nitro-L-arginine (L-NA, 300 µM, an eNOS inhibitor) to prevent the release of vasoactive prostanoids and NO, respectively. To study the role of cyclooxygenase-derived vasoactive prostanoids, rings were incubated with indomethacin (10 µM). To evaluate the vascular smooth muscle function, rings were incubated with indomethacin, L-NA and TRAM-34 plus UCL-1684, then contracted with PE (1 µM) before a concentration-relaxation curve to either sodium nitroprusside (SNP, a NO donor) or levcromakalim (Lev, an ATP-sensitive potassium channels opener) was constructed.

1.6. Ex vivo evaluation of the vascular uptake of Carissa edulis polyphenols

Rings of the thoracic aorta were washed with Krebs solution and placed in 24-well plates containing MCDB131 culture medium (Gibco, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) supplemented with fungizone (250 µg/ml), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 IU/ml), L-glutamine (2 mM, all from Lonza Levallois-Perret, France). Thoracic aorta rings of young rats and middle-aged rats following a 2-week intake of CECE were incubated with CEBF (60 µg/ml) for 3 min at 37 °C and 5% CO_2. To characterize mechanisms contributing to the accumulation of polyphenols in endothelial cells, we studied the involvement of Na^+/glucose co-transporters (SGLT) 1 and 2 according to Jin et al., 2013 with some modifications. Thoracic aorta rings were incubated with either a dual SGLT1/2 inhibitor sotagliflozin (100 nM) or a selective SGLT 2 inhibitor (empagliflozin, 100 nM) for 5 min at 37 °C. They were then washed twice with PBS before incubation with PBS containing 0.4% of 2-aminoethyl diphenyl borate for 5 min at 37 °C. Subsequently, rings were washed with cold

PBS, snap-frozen with liquid nitrogen in HistoMold containing frozen section media (FSC 22, Leica Biosystems, Nanterre, France, before being cryosectioned at 14 μm and mounted on Superfrost plus slides (ThermoFisher) with Dako medium (fluorescence editing medium, Dako, Agilent Technologies France, Les Ulis, France) and dried for 20 min at room temperature. Slides were then analyzed on the same day using a confocal laser scanning microscope (Leica TSC SPE). Quantitative analysis of fluorescence was performed using Image J software (version 1.6 for Windows, NIH).

1.7. Immunofluorescence studies

Rings of main and secondary branch of the mesenteric artery were embedded in HistoMolds containing frozen section media (FSC 22, Leica Biosystems, Nanterre, France) and were snap-frozen in liquid nitrogen. Rings were cryosectioned at 14 μm and stored at -40 °C until use. Sections were defrosted with phosphate buffer saline (PBS) and fixed during 30 min with 4% (w/v) paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) and then incubated with blocking/permeabilizing buffer (PBS containing 1 % bovine serum albumin (BSA) (w/v) and 0.5 % Triton X-100 (w/v)) for 30 min at room temperature. After buffer removal, all sections, excluding negative controls, were incubated for 1 h at 4 °C with a primary antibody against either eNOS (1/100, Cat. 610297, BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France), nitrotyrosine (1/500, Cat. 05-233, EMD Millipore, Billerica MA, USA), ACE (1/200, Cat.250450, Abbiotec, San Diego, USA) or AT_1R (1/200, Cat. ab124505, Abcam, Paris, France). All sections were washed 3 times with PBS prior to incubation with either anti-rabbit or anti-mouse fluorescent secondary antibody (1/400, Alexa fluor 633 conjugates, Invitrogen) for 1 h at room temperature in the dark. After washing 3 times with PBS, sections were incubated with 1 mg/ml 4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Thermo Fisher) during 5 min at room temperature, in order to counterstain nuclei. Slides were washed 3 times with PBS and mounted under coverslip using fluorescence mounting medium (Dako,

Agilent Technologies France, Les Ulis, France) and dried for 20 min at room temperature. Slides were then analyzed with confocal laser-scanning microscope (Leica SP2 UV DM IRBE; leica, Heidelberg, Germany) with a 20X magnification lens. The level of fluorescence was quantified by using Image J software (version 1.49 for Windows, NIH).

1.8. Determination of the level of oxidative stress

The level of ROS in the main and the secondary branch of the mesenteric artery and in the mitochondria were determined using the redox-sensitive fluorescent probe dihydroethidium (DHE, Invitrogen, ThermoFischer) and MitoSox probe (MitoSox^{TM}, Invitrogen, Thermofischer), respectively. Cryosections of thoracic aorta (25 μm) were defrosted with PBS and incubated with either DHE (2.5 μM) or MitoSox (2.5 μM) for 30 min at 37 °C in the dark. After washing 2 times with PBS, the sections were mounted under a coverslip using fluorescence mounting medium (Dako, Agilent Technologies France, Les Ulis, France) and dried for 20 min at room temperature. Images were acquired using a confocal laser-scanning microscope (Leica SP2 UV DM IRBE; leica, Heidelberg, Germany) with a 20X magnification lens. Quantitative analysis was performed using Image J software (version 1.49 for Windows, NIH).

1.9. Statistical analysis

Data are expressed as means ± standard error mean (S.E.M) for n different experiments and analyzed by Graphpad Prism (Version 7). Statistical variance between different groups was determined by applying Two-way Anova test for vascular reactivity studies and One-way Anova test for quantitative confocal microscopy results, followed by Bonferroni's Multiple Comparison *post hoc* test. Group differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

2. Results

2.1. CECE treatment improves the age-related endothelial dysfunction in the main mesenteric artery and the thoracic aorta

Both in the mesenteric artery and the aortic rings with endothelium from middle-aged rats, contractile responses to phenylephrine were increased and relaxations to acetylcholine were blunted in comparison to rings from young rats (Figures 1 A, B, E, F). Treatment of middle-aged rats with CECE normalized contractile responses to phenylephrine and relaxations to acetylcholine similar to those of young rats (Figures 1 A, B, E, F). The concentration-dependent relaxation curves to sodium nitroprusside and levcromakalim in the main mesenteric artery and the thoracic aorta were similar in young and middle-aged rats, and they were also not affected by treatment of middle-aged rats with CECE indicating normal vascular smooth muscle function (Figures 1 C, D, G, H).

2.2. eNOS-derived NO mediates the improved phenylephrine-induced contractile response and acetylcholine-induced relaxation of middle-aged rats treated by CECE

In the main mesenteric artery ring, the increased contractile response to phenylephrine of middle-aged rats was affected neither by indomethacin not by the subsequent addition of L-NA, and significantly reduced in the presence of indomethacin in combination of TRAM-34 plus UCL-1684; similar effects were observed in young rats (Figures 2 A,B). In contrast, in mesenteric artery rings of middle-aged rats treated with CECE, the normalized phenylephrine-induced contractile response was slightly but significantly increased by indomethacin, markedly increased by the subsequent addition of L-NA whereas TRAM-34 plus UCL-1684 was without effect demonstrating the involvement of NO and, to some extent, of relaxing prostanoids (Figure 2C).

In the thoracic aorta ring, neither indomethacin nor L-NA affected phenylephrine-induced contractions in young rats (Figure 2D). However, the increased contractile response to

phenylephrine in middle-aged rats was markedly reduced by indomethacin and not affected by L-NA indicating an age-related increased formation of vasocontracting prostanoids (Figure 2 E). In contrast, the normalized contractile response by the CECE treatment was associated with a pronounced enhancement of the contractile response by L-NA whereas indomethacin was without effect (Figure 2 F). Thus, the CECE-induced normalization of the contractile response in middle-aged rats is mediated by the eNOS-derived NO-mediated blunting of the contractile response associated with the abolition of the prostanoid-mediated vasoconstrictor responses.

In mesenteric artery rings, acetylcholine-induced relaxations of young, middle-aged rats and middle-aged rats treated with CECE were affected neither by indomethacin nor by the subsequent addition of TRAM-34 plus UCL1684 (Figure 3). Similarly, indomethacin did not affect relaxations to acetylcholine in aortic rings of all three groups (Figure 4). In contrast, relaxations in the mesenteric artery rings and aortic rings were markedly reduced by L-NA indicating a major role of NO (Figures 3, 4).

2.3. Accumulation of Carissa edulis polyphenols in the endothelium of the thoracic aorta: Role of Na+/glucose co-transporters 1 and 2

Exposure of aortic rings of young rats to CEBF and subsequently to Neu reagent allowing the detection of polyphenols, was associated with the appearance of a fluorescence signal that was most pronounced in the endothelium compared to the low level of the vascular smooth muscle (Figure 5A). The increased endothelial and vascular smooth muscle signals were significantly reduced by sotagliflozin, a dual SGLT1 and 2 inhibitor, and by empagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor (Figure 5A). A higher level of fluorescence was detected throughout the aortic wall of CECE-treated middle-aged rats compared to the weak signal of young rats (Figure 5). Exposure of aortic rings of CECE-treated rats to CEBF further enhanced the fluorescence signal particularly in the endothelium (Figure 5B). The CEBF-induced increase of the fluorescence signal was prevented by sotagliflozin and empagliflozin

(Figure 5B). Thus, these observations indicate that the *in vivo* treatment of middle-aged rats with CECE caused an accumulation of polyphenols in the aorta predominantly in the endothelium, and that this effect is enhanced further following the *ex vivo* exposure of aortic rings to CEBF. They further indicate that this effect is sensitive to inhibition by SGLT1/2 and 2 inhibitors.

2.4. CECE treatment improves the eNOS-NO/ROS balance in the main and resistance mesenteric arteries of middle-aged rats: Role of the local angiotensin system

Since ageing is characterized by an increased level of oxidative stress in the arterial wall (Khodja et al., 2012), the formation of ROS was assessed in both the main and secondary branch of the mesenteric artery using dihydroethidium, a redox-sensitive fluorescent probe, and Mitosox, a redox-sensitive fluorescent probe that targets mitochondria. The main and resistance mesenteric arteries of middle-aged rats had higher levels of DHE fluorescence signal throughout the arterial wall, and of Mitosox fluorescence compared to those of young rats (Figures 6, 7). The CECE treatment of middle-aged rats was associated with decreased levels of DHE and Mitosox fluorescence signals that reached levels similar to those observed in young rats (Figures 6, 7).

Moreover, the angiotensin system has been involved in the ageing-related endothelial dysfunction and vascular oxidative stress (Shan et al., 2014). Therefore, the expression level of the angiotensin II type 1 receptor (AT_1R) and angiotensin-converting enzyme (ACE) was assessed by immunofluorescence in the main and resistance mesenteric arteries of young and middle-aged rats. An increased expression level of both AT_1R and ACE was observed in sections of middle-aged rats compared to young rats (Figures 6, 7). The CECE treatment of middle-aged rats was associated with significantly reduced expression levels of both AT_1R and

ACE in the main and resistance mesenteric arteries, and they reached similar levels as those observed in young rats (Figures 6, 7).

Since ageing is associated with blunted NO-mediated relaxations, the expression level of proteins involved in the NO pathway was assessed by immunofluorescence in the main and the resistance mesenteric arteries. The expression level of eNOS observed predominantly in the endothelium of the main and resistance mesenteric arteries of middle-aged rats was significantly higher than those of young rats (Figures 6, 7), demonstrating most likely a compensatory mechanism. Similarly, both main and resistance mesenteric arteries of middle-aged rats had higher levels of nitrotyrosine throughout the arterial wall compared to those of young rats (Figures 6, 7). The CECE treatment of middle-aged rats normalized the expression level of eNOS and nitrotyrosine (Figures 6, 7)**.**

Discussion

The major findings of the present study indicate that oral intake of a crude extract of *Carissa edulis* by middle-aged rats for two weeks improved an established age-related endothelial dysfunction and vascular and mitochondrial oxidative stress most likely subsequent to the normalization of the local angiotensin system. They further indicate that *Carissa edulis* polyphenols accumulate in the arterial wall predominantly in endothelial cells via Na^+/glucose co-transporter1 and 2. The benefit of the CECE treatment has been observed at a relatively low dose of CECE (90 mg/kg/day) in rats, which is equivalent to about 0.87 g/day of CECE in a 60 kg human (Reagan-Shaw et al., 2008).

Several studies have indicated that ageing is associated with an endothelial dysfunction characterized by blunted endothelium-dependent relaxations, an early indicator of major cardiovascular risk factors (Idris-Khodja and Schini-Kerth, 2012). In conductance arteries such the aorta, endothelium-dependent relaxations to ACh involve mainly a NO component

(Furchgott and Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1988b) whereas in the coronary artery and resistance arteries the relaxation involves a NO component and often also, to some extent, an EDH component (Chen et al., 1988). Therefore, the present study has examined the effect of CECE treatment on ageing-related endothelial dysfunction in the aorta, the main mesenteric artery, and in resistance mesenteric arteries to determine whether ageing affects the NO and/or EDH components, and markers of endothelial dysfunction. Vascular reactivity studies have indicated that the ACh-induced NO-mediated relaxation as assessed in the main mesenteric artery in the presence of indomethacin plus TRAM-34 plus UCL-1684, and in the thoracic aorta in the presence of indomethacin are significantly reduced in middle-aged rats. The findings indicate also that EDH-mediated relaxation as assessed in the presence of indomethacin and NLA contributes minimally to ACh-induced relaxation in the mesenteric artery of young and middle-aged rats. Thus, these findings indicate that ageing is associated with a blunted NO component of the endothelium-dependent relaxation. These findings are consistent with previous ones indicating that ageing-related endothelial dysfunction involves blunted NO-mediated relaxations in the rat mesenteric artery (Dal-Ros et al., 2012a; Matz et al., 2000) and the aorta (Lee et al., 2011), and a gradual alteration of the NO pathway in the femoral artery of 22-week-old compared to 7-week-old mice (Puzserova et al., 2014). In addition, the present study also showed that ageing is associated with an increased contractile response in the mesenteric artery and aorta in middle-aged rats compared to young ones. Since indomethacin normalized contractile response in the aorta but not the mesenteric artery of middle-aged rats, it can be attributed to the formation of vasocontractile prostanoids.

Treatment of middle-aged rats with a low dose of CECE significantly improved NO-mediated relaxations and contractile responses in the mesenteric artery and aorta. The normalized contractile responses were markedly enhanced in the presence of an eNOS inhibitor, indicating an increased basal release of NO. The findings are in accordance with

previous ones indicating an improved endothelium-dependent relaxation in 51-week-old middle-aged rats after intake of 100 mg/kg/day of red wine polyphenols in the drinking water for 4 weeks (Dal-Ros et al., 2012a), and in 46-week-old middle-aged rats after intake of 750 mg/kg/day of *Moringa oleifera* seed powder for 4 weeks (Randriamboavonjy et al., 2019).

The CECE treatment-induced improvement of an established ageing-related NO-mediated relaxation is most likely due to the ability to decrease the high level of vascular and mitochondrial oxidative stress in the middle-aged rat. Indeed, high levels of oxidative stress involving predominantly superoxide anions and hydrogen peroxide have been observed throughout the arterial wall in several types of old arteries (Csiszar et al., 2002; Dal-Ros et al., 2012a, 2011; Farooq et al., 2020; Idris-Khodja and Schini-Kerth, 2012; van der Loo et al., 2000, present findings). Moreover, oxidative stress has been shown to contribute to ageing-related endothelial dysfunction, in part, by reducing the bioavailability of NO and oxidizing BH4 an essential cofactor of eNOS (Higashi et al., 2012; Schmidt and Alp, 2007). Indeed, oxidized BH4 promotes uncoupling of eNOS, which will further increase the formation of ROS (Kirkwood and Kowald, 2012). The increased expression level of eNOS in the mesenteric artery and aorta of middle-aged rats is most likely part of a compensatory mechanism. An improved NO and formation of ROS is also indicated by the reduced fluorescence level of nitrotyrosine in the mesenteric artery and the aorta of CECE-treated middle-aged rats. A previous study has also shown that *Carissa edulis* is rich in flavonoids with antioxidant properties (Fanta Yadang et al., 2019). Angiotensin II, the main effector hormone of the renin-angiotensin system, is a potent vasoconstrictor that increases peripheral vascular resistance and elevates blood pressure (Nguyen Dinh Cat and Touyz, 2011). The local vascular angiotensin system often plays a crucial role in endothelial dysfunction and vascular oxidative stress mostly due to the activation of NADPH oxidase mediated by AT_1R (Whaley-Connell et al., 2011). Previous studies have shown that an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor and an

AT_1R antagonist markedly improved age-related endothelial dysfunction, in part, by decreasing the level of vascular oxidative stress (Goto et al., 2000a; Khodja et al., 2012). The present findings support a role of the angiotensin system in ageing-related endothelial dysfunction and oxidative stress since an increased expression of both ACE and AT_1R was observed in the main and resistance mesenteric arteries of middle-aged rats. These findings are in line with a previous study indicating an activation of the angiotensin system of 12- and 24-month old mice compared to 2-month-old. (Yoon et al., 2016). Of interest, oral intake of CECE by middle-aged rats normalized the expression level of ACE and AT_1R in the main and resistance mesenteric arteries of middle-aged rats to a level similar to that observed in young rats. A previous study has also shown that resveratrol exerted protective effects on old kidneys by reducing oxidative stress, inflammation, and fibrosis through suppression of the formation of Ang II (Jang et al., 2018). In addition, the omega-3 polyunsaturated fatty acid formulation EPA:DHA 6:1 reduced the local angiotensin/AT1R/NADPH oxidase pathway to improve the endothelial function in the mesenteric artery of old rats (Farooq et al., 2020).

The present findings also provide evidence that CECE polyphenols can rapidly accumulate preferentially in the endothelium of the thoracic aorta of young and middle-aged rats. Moreover, the intake of CECE in the drinking water by middle-aged rat was associated with an accumulation of polyphenols in the arterial wall. Since the uptake of polyphenols was prevented by sotagliflozin, a dual SGLT1 and 2 inhibitor, and by empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, it suggests a role of SGLT1 and 2. A previous study using a molecular docking approach has shown that *Hibiscus. sabdariffa* (Hib) can interact with SGLT-1 (Kartinah et al., 2019). Moreover, flavonoids such as the quercetin glucosides isoquercitrin and spiraeosid competitively inhibited Na^+-dependent mucosal uptake of the non-metabolisable glucose analogue methyl-α-d-glucopyranoside via SGLT-1 (Ader et al., 2001).

Conclusion

Ageing is associated with the development of an endothelial dysfunction, which involves a reduced NO-mediated endothelium-dependent relaxation, a reduced basal formation NO and the induction of increased contractile responses. Moreover, the endothelial dysfunction is related to increased vascular oxidative stress and activation of the local vascular angiotensin system. Oral intake of *Carissa edulis* crude extract for two weeks by middle-aged rats significantly restored the protective endothelial function by increasing the NO-mediated relaxation and control of vascular tone, and by normalizing the local angiotensin system and the subsequent development of oxidative stress.

Acknowledgments:

UH was the recipient of a fellowship by the French Government.

Conflicts of interest:

The authors declare no conflict of interest.

References

Ader, P., Blöck, M., Pietzsch, S., Wolffram, S., 2001. Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1). Cancer Letters 162, 175–180. https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00645-5

Barrows, I.R., Ramezani, A., Raj, D.S., 2019. Inflammation, Immunity, and Oxidative Stress in Hypertension—Partners in Crime? Advances in Chronic Kidney Disease 26, 122–130. https://doi.org/10.1053/j.ackd.2019.03.001

Benjamin, E.J., Virani, S.S., Callaway, C.W., Chamberlain, A.M., Chang, A.R., Cheng, S., Chiuve, S.E., Cushman, M., Delling, F.N., Deo, R., 2018. Heart disease and stroke statistics—2018 update: a report from the American Heart Association. Circulation 137, e67–e492.

Beyene, Belay, Beyene, Belachew, Deribe, H., 2016. Review on application and management of medicinal plants for the livelihood of the local community. Journal of Resources Development and Management 22, 33–39.

Chen, G., Suzuki, H., Weston, A.H., 1988. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. British journal of pharmacology 95, 1165–1174.

Csiszar, A., Ungvari, Z., Edwards, J.G., Kaminski, P., Wolin, M.S., Koller, A., Kaley, G., 2002. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. Circulation research 90, 1159–1166.

Dal-Ros, S., Bronner, C., Auger, C., Schini-Kerth, V.B., 2012a. Red wine polyphenols improve an established aging-related endothelial dysfunction in the mesenteric artery of middle-aged rats: Role of oxidative stress. Biochemical and Biophysical Research Communications 419, 381–387. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.031

Dal-Ros, S., Bronner, C., Auger, C., Schini-Kerth, V.B., 2012b. Red wine polyphenols improve an established aging-related endothelial dysfunction in the mesenteric artery of middle-aged rats: Role of oxidative stress. Biochemical and Biophysical Research Communications 419, 381–387. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.031

Dal-Ros, S., Zoll, J., Lang, A.-L., Auger, C., Keller, N., Bronner, C., Geny, B., Schini-Kerth, V.B., 2011. Chronic intake of red wine polyphenols by young rats prevents aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance: Role of NADPH oxidase. Biochemical and Biophysical Research Communications 404, 743–749. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.060

Donato, A.J., Machin, D.R., Lesniewski, L.A., 2018. Mechanisms of dysfunction in the aging vasculature and role in age-related disease. Circulation Research 123, 825–848.

Fanta Yadang, S.A., Taiwe Sotoing, G., Ngatcha Zouakeu, K.S., Khan, M.A., Agbor, G.A., Ur-Rahman, N., Ngo Bum, E., 2019. Quantification of Bioactive Compounds and Evaluation of the Antioxidant Activity of *Carissa edulis* Valh (Apocynaceae) Leaves. The Scientific World Journal 2019, 1–9. https://doi.org/10.1155/2019/7549620

Farooq, M.A., Gaertner, S., Amoura, L., Niazi, Z.R., Park, S.-H., Qureshi, A.W., Oak, M.-H., Toti, F., Schini-Kerth, V.B., Auger, C., 2020. Intake of omega-3 formulation EPA:DHA 6:1 by old rats for 2 weeks improved endothelium-dependent relaxations and normalized the expression level of ACE/AT1R/NADPH oxidase and the formation of ROS in the mesenteric artery. Biochemical Pharmacology, Natural Products and the Hallmarks of Chronic Diseases 173, 113749. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113749

Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. nature 288, 373–376.

Goto, K., Fujii, K., Onaka, U., Abe, I., Fujishima, M., 2000. Renin-Angiotensin System Blockade Improves Endothelial Dysfunction in Hypertension. Hypertension 36, 575–580. https://doi.org/10.1161/01.HYP.36.4.575

Grover-Páez, F., Zavalza-Gómez, A.B., 2009. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. Diabetes Research and Clinical Practice 84, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.12.013

Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular aspects of Medicine 27, 1–93.

Higashi, Y., Kihara, Y., Noma, K., 2012. Endothelial dysfunction and hypertension in aging. Hypertension Research 35, 1039–1047. https://doi.org/10.1038/hr.2012.138

Idris-Khodja, N., Schini-Kerth, V., 2012. Thymoquinone improves aging-related endothelial dysfunction in the rat mesenteric artery. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 385, 749–758. https://doi.org/10.1007/s00210-012-0749-8

Jang, I.-A., Kim, E.N., Lim, J.H., Kim, M.Y., Ban, T.H., Yoon, H.E., Park, C.W., Chang, Y.S., Choi, B.S., 2018. Effects of Resveratrol on the Renin-Angiotensin System in the Aging Kidney. Nutrients 10, 1741. https://doi.org/10.3390/nu10111741

Jin, X., Yi, L., Chen, M., Chen, C., Chang, H., Zhang, T., Wang, L., Zhu, J., Zhang, Q., Mi, M., 2013. Delphinidin-3-Glucoside Protects against Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Mitochondrial Dysfunction in Vascular Endothelial Cells via the Sodium-Dependent Glucose Transporter SGLT1. PLOS ONE 8, e68617. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068617

Kartinah, N.T., Fadilah, F., Ibrahim, E.I., Suryati, Y., 2019. The Potential of Hibiscus sabdariffa Linn in Inducing Glucagon-Like Peptide-1 via SGLT-1 and GLPR in DM Rats. BioMed Research International 2019, e8724824. https://doi.org/10.1155/2019/8724824

Khodja, N.I., Chataigneau, T., Auger, C., Schini-Kerth, V.B., 2012. Grape-Derived Polyphenols Improve Aging-Related Endothelial Dysfunction in Rat Mesenteric Artery: Role of Oxidative Stress and the Angiotensin System. PLOS ONE 7, e32039. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032039

Kirkwood, T.B.L., Kowald, A., 2012. The free-radical theory of ageing – older, wiser and still alive. BioEssays 34, 692–700. https://doi.org/10.1002/bies.201200014

Lakatta, E.G., 2015. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? Journal of molecular and cellular cardiology 83, 1–13.

Lee, J.-O., Oak, M.-H., Jung, S.H., Park, D.H., Auger, C., Kim, K.R., Lee, S.-W., Schini-Kerth, V.B., 2011. An ethanolic extract of Lindera obtusiloba stems causes NO-mediated endothelium-dependent relaxations in rat aortic rings and prevents angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 383, 635. https://doi.org/10.1007/s00210-011-0643-9

Maaliki, D., Shaito, A.A., Pintus, G., El-Yazbi, A., Eid, A.H., 2019. Flavonoids in hypertension: a brief review of the underlying mechanisms. Current Opinion in Pharmacology, Cardiovascular and renal 45, 57–65. https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.04.014

Matz, R.L., De Sotomayor, M.A., Schott, C., Stoclet, J.-C., Andriantsitohaina, R., 2000. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. British journal of pharmacology 131, 303–311.

Nguyen Dinh Cat, A., Touyz, R.M., 2011. Cell Signaling of Angiotensin II on Vascular Tone: Novel Mechanisms. Curr Hypertens Rep 13, 122–128. https://doi.org/10.1007/s11906-011-0187-x

Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S., 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 333, 664–666.

Petrovska, B.B., 2012. Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacogn Rev 6, 1–5. https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849

Puzserova, A., Ilovska, V., Balis, P., Slezak, P., Bernatova, I., 2014. Age-Related Alterations in Endothelial Function of Femoral Artery in Young SHR and WKY Rats. BioMed Research International 2014, e658479. https://doi.org/10.1155/2014/658479

Randriamboavonjy, J.I., Heurtebise, S., Pacaud, P., Loirand, G., Tesse, A., 2019. Moringa oleifera Seeds Improve Aging-Related Endothelial Dysfunction in Wistar Rats. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2019, e2567198. https://doi.org/10.1155/2019/2567198

Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. The FASEB Journal 22, 659–661. https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF

Sarr, M., Chataigneau, M., Martins, S., Schott, C., Elbedoui, J., Oak, M., Muller, B., Chataigneau, T., Schinikerth, V., 2006. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: Role of NADPH oxidase. Cardiovascular Research 71, 794–802. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.05.022

Schini-Kerth, V.B., Auger, C., Étienne-Selloum, N., Chataigneau, T., 2010. Polyphenol-Induced Endothelium-Dependent Relaxations, in: Advances in Pharmacology. Elsevier, pp. 133–175. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385061-4.00006-4

Schmidt, T.S., Alp, N.J., 2007. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. Clinical science 113, 47–63.

Seals, D.R., Jablonski, K.L., Donato, A.J., 2011. Aging and vascular endothelial function in humans. Clinical Science 120, 357–375. https://doi.org/10.1042/CS20100476

Shan, H., Guo, D., Li, X., Zhao, X., Li, W., Bai, X., 2014. From autophagy to senescence and apoptosis in Angiotensin II-treated vascular endothelial cells. APMIS 122, 985–992. https://doi.org/10.1111/apm.12242

Sun, H.-J., Hou, B., Wang, X., Zhu, X.-X., Li, K.-X., Qiu, L.-Y., 2016. Endothelial dysfunction and cardiometabolic diseases: Role of long non-coding RNAs. Life Sciences 167, 6–11. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.11.005

Tilburt, J.C., Kaptchuk, T.J., 2008. Herbal medicine research and global health: an ethical analysis. Bulletin of the World Health Organization 86, 594–599.

van der Loo, B., Labugger, R., Skepper, J.N., Bachschmid, M., Kilo, J., Powell, J.M., Palacios-Callender, M., Erusalimsky, J.D., Quaschning, T., Malinski, T., Gygi, D., Ullrich, V., Lüscher, T.F., 2000. Enhanced Peroxynitrite Formation Is Associated with Vascular Aging. Journal of Experimental Medicine 192, 1731–1744. https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1731

Whaley-Connell, A., McCullough, P.A., Sowers, J.R., 2011. The role of oxidative stress in the metabolic syndrome. Reviews in cardiovascular medicine 12, 21–29.

Yoon, H.E., Kim, E.N., Kim, M.Y., Lim, J.H., Jang, I., Ban, T.H., Shin, S.J., Park, C.W.,

Chang, Y.S., Choi, B.S., 2016. Age-associated changes in the vascular renin-angiotensin

system in mice. Oxidative medicine and cellular longevity 2016.

Figure legends

Figure 1: CECE improves the age-related endothelial dysfunction in the main mesenteric artery and the thoracic aorta. The main mesenteric artery rings (A, B) and the thoracic aorta rings (E, F) with endothelium suspended in organ chambers were subjected to a concentration-contraction curve to phenylephrine or contracted with phenylephrine (PE, 1 µM) before the addition of increasing concentrations of acetylcholine (ACh). To study the function of the vascular smooth muscle, main mesenteric artery rings (C, D) and thoracic aorta rings (G, H) with endothelium were contracted with PE (1 µM) before the construction of a concentration-relaxation curve either to sodium nitroprusside (SNP, a NO donor) or levcromakalim (Lev, an ATP-sensitive potassium channels opener) in the presence of L-NA and TRAM-34 plus UCL-1684 and indomethacin to prevent the contribution of NO, EDH and vasoactive prostanoids, respectively. Results are expressed in g of tension (A) or in % relaxations (A, B, C-H) as means ± SEM of 5-7 rats per group. $*P < 0.05$ vs. control young rats, $^{\#}P < 0.05$ vs. control middle-aged rats.

Figure 2: CECE normalizes contractile responses in the main mesenteric artery and the thoracic aorta of middle-aged rats: Role of vasoactive prostanoids and NO. Mesenteric artery rings (A-C) and aortic rings (D-F) were subjected to increasing concentrations of PE to construct a concentration-contractile response curve under either control conditions, in the presence of indomethacin (10 µM, cyclooxygenases inhibitor), or following the subsequent addition of either L-NA (NOS inhibitor, 300 µM) or TRAM-34 plus UCL-1684 (inhibitors of endothelium-dependent hyperpolarization, 1 µM each) for 30 min. Results are expressed in g of tension as means ± SEM of 5-7 rats per group. $*P < 0.05$ vs. respective control.

Figure 3: CECE improves endothelium-dependent relaxations in the main mesenteric artery of middle-aged rats: Role of vasoactive prostanoids, NO and EDH. Mesenteric artery rings were contracted with phenylephrine (PE, 1 µM) before the addition of increasing concentrations of acetylcholine (ACh) under either control conditions, in the presence of indomethacin (10 µM, cyclooxygenases inhibitor), or following the subsequent addition of either L-NA (NOS inhibitor, 300 µM) or TRAM-34 plus UCL-1684 (inhibitors of endothelium-dependent hyperpolarization, 1 µM each) for 30 min. Results are expressed in % relaxation as means ± SEM of 5-7 rats per group. **P* < 0.05 vs. respective control.

Figure 4: CECE improves endothelium-dependent relaxations in the aorta of middle-aged rats: Role of vasoactive prostanoids and NO. Aortic rings were contracted with phenylephrine (PE, 1 µM) before the addition of increasing concentrations of acetylcholine (ACh) under either control conditions or in the presence of indomethacin (10 µM, cyclooxygenases inhibitor), and also following the subsequent addition of L-NA (NOS inhibitor, 300 µM) for 30 min. Results are expressed in % relaxation as means ± SEM of 5-7 rats per group. **P* < 0.05 vs. respective control.

Figure 5: Accumulation of polyphenols of CEBF in the thoracic aorta of young rats: Role of Na^+/glucose co-transporters (SGLTs)1 and 2. (A) Aortic rings of young rats and (B) CECE-treated rats were incubated in the absence or presence of a dual inhibitor of sodium/glucose co-transporters (SGLT)1 and 2 (sotagliflozine, 100 nM) or a selective SGLT2 inhibitors (empagliflozin, 100 nM) before the addition of CEBF (60 µg/ml).Thereafter, rings were exposed to 0.4% of 2-aminoethyl diphenyl borate (Neu reagent) for 5 min and the level of fluorescence was determined using confocal microscopy. Results are shown as means ± S.E.M. of 4 experiments. **P* < 0.01 vs control.

Figure 6: CECE treatment improves the age-related increased vascular and mitochondrial oxidative stress and the over-expression of the local angiotensin system in the main mesenteric artery. (A-B) The level of ROS in the arterial wall and mitochondria of the main mesenteric artery were determined by fluorescence histochemistry using the redox-sensitive fluorescent probe dihydroethidium (DHE, 2.5 µM) and MitoSOX probe (2.5 µM), respectively. (C-F) The expression level of target proteins (eNOS, nitrotyrosine and of the local angiotensin system AT_1 receptor (AT_1R) and angiotensin-converting enzyme (ACE)) were determined in cryosections of the main mesenteric artery. Fluorescence signals were observed using a confocal laser-scanning microscope. Results are expressed as means ± SEM of 4 rats per group. $^{*}P < 0.05$ vs. young rats, $^{\#}P < 0.05$ vs. middle-aged rats.

Figure 7: CECE treatment improves the age-related increased vascular and mitochondrial oxidative stress and the over-expression of the local angiotensin system in the secondary branch of the mesenteric artery. (A-B) The level of ROS in the arterial wall and mitochondria of the main mesenteric artery were determined by fluorescence histochemistry using dihydroethidium (DHE, 2.5 µM) and MitoSOX probe (2.5 µM), respectively. (C-F) The expression level of target proteins (eNOS, nitrotyrosine and of the local angiotensin system AT_1 receptor (AT_1R) and angiotensin-converting enzyme (ACE)) were determined in cryosections of the secondary branch of the mesenteric artery. Fluorescence signals were observed using a confocal laser-scanning microscope. Results are expressed as means ± SEM of 4 rats per group. $^{*}P < 0.05$ vs. young rats, $^{\#}P < 0.05$ vs. middle-aged rats.

Figure 1

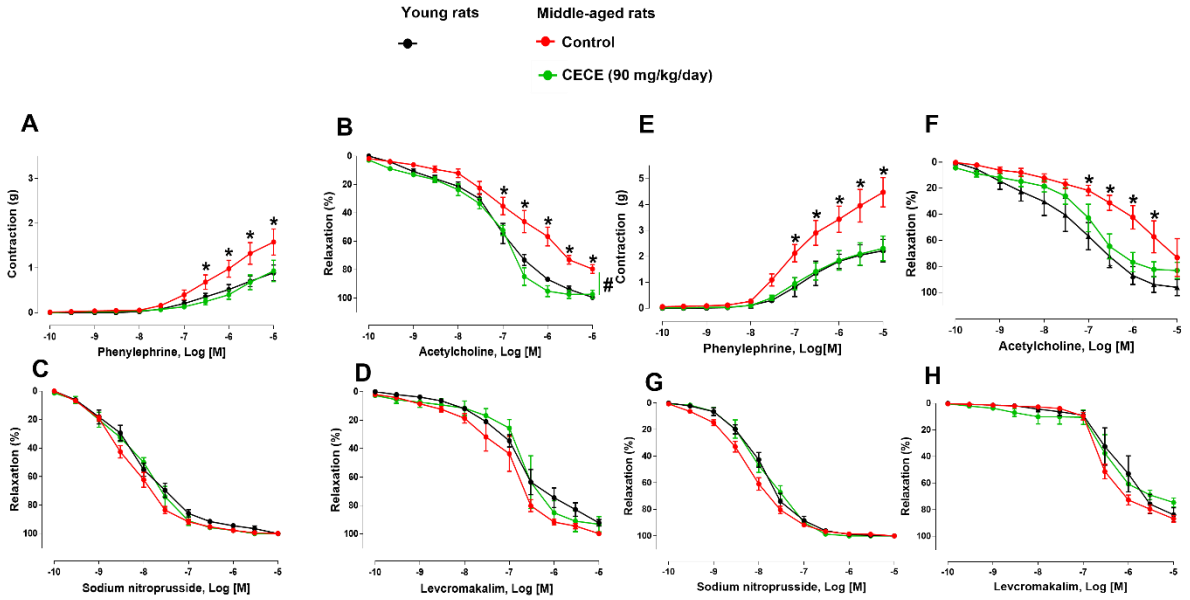


Figure 2

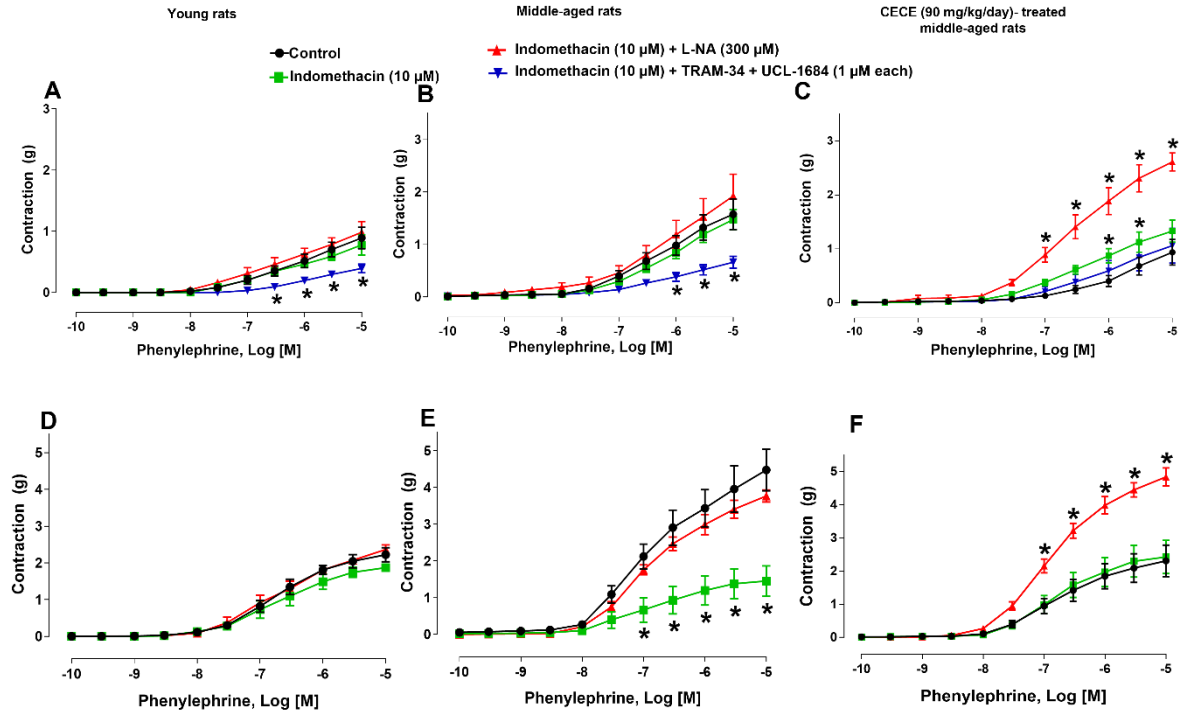


Figure 3

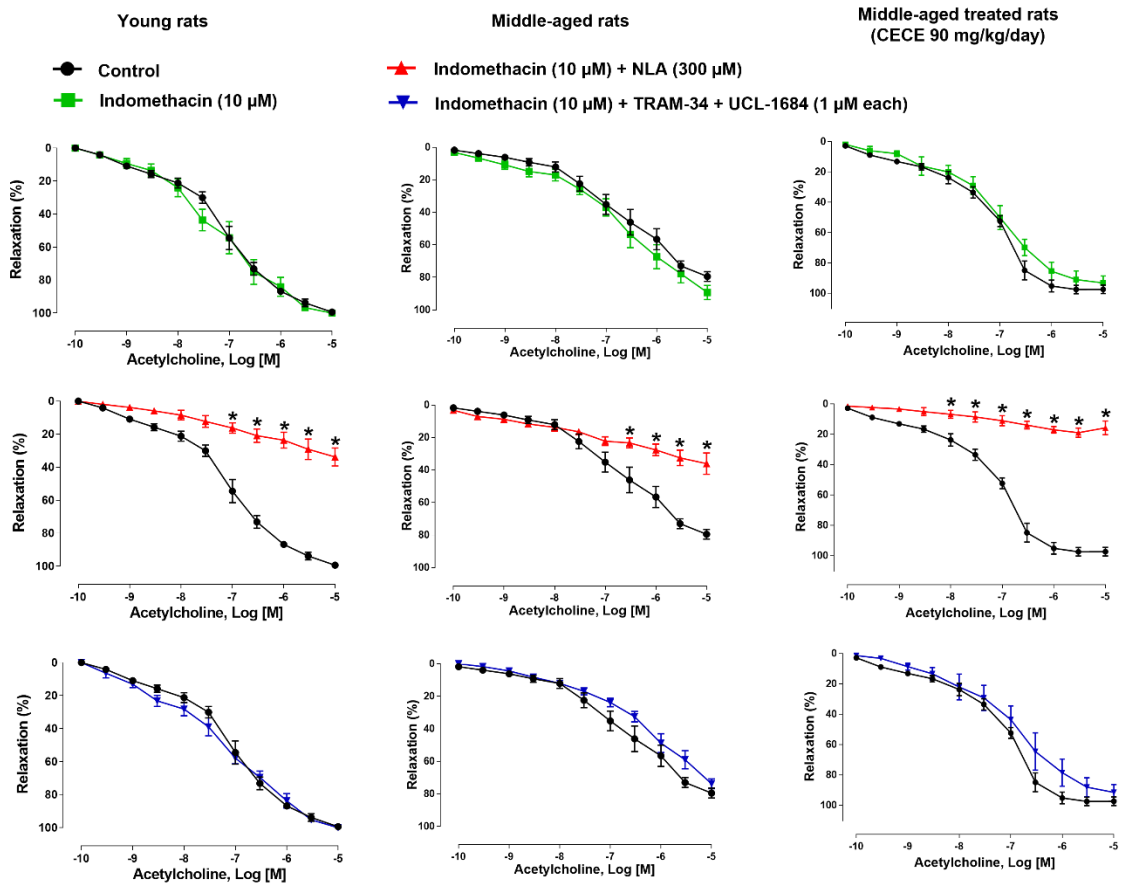


Figure 4

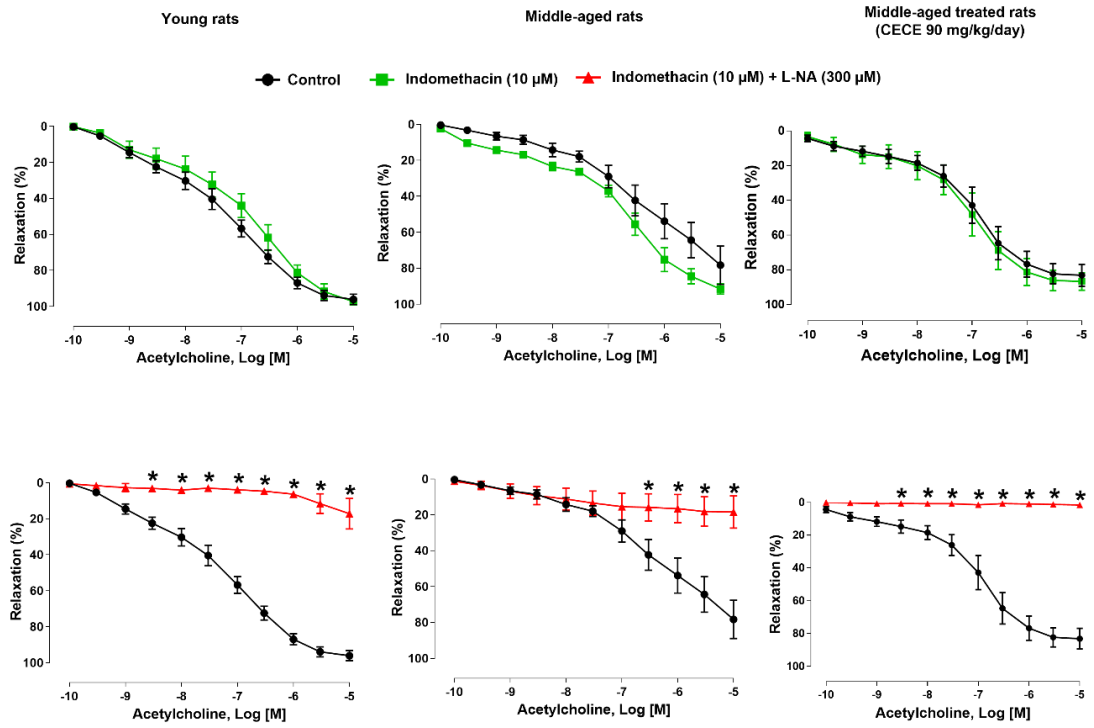


Figure 5

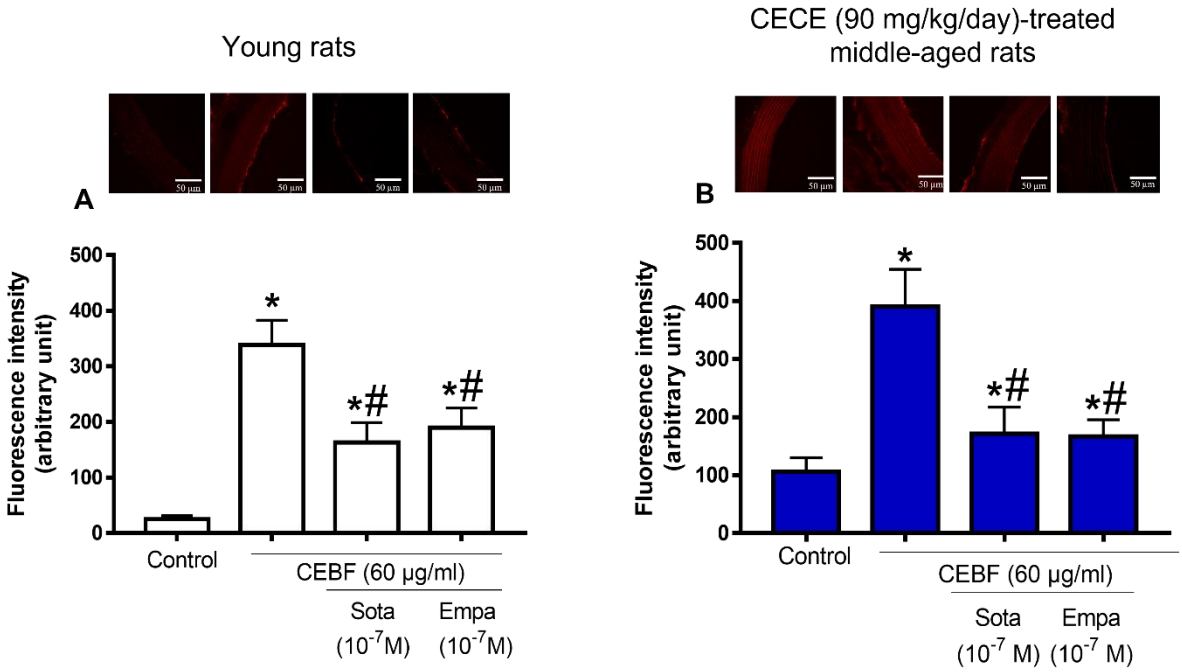


Figure 6

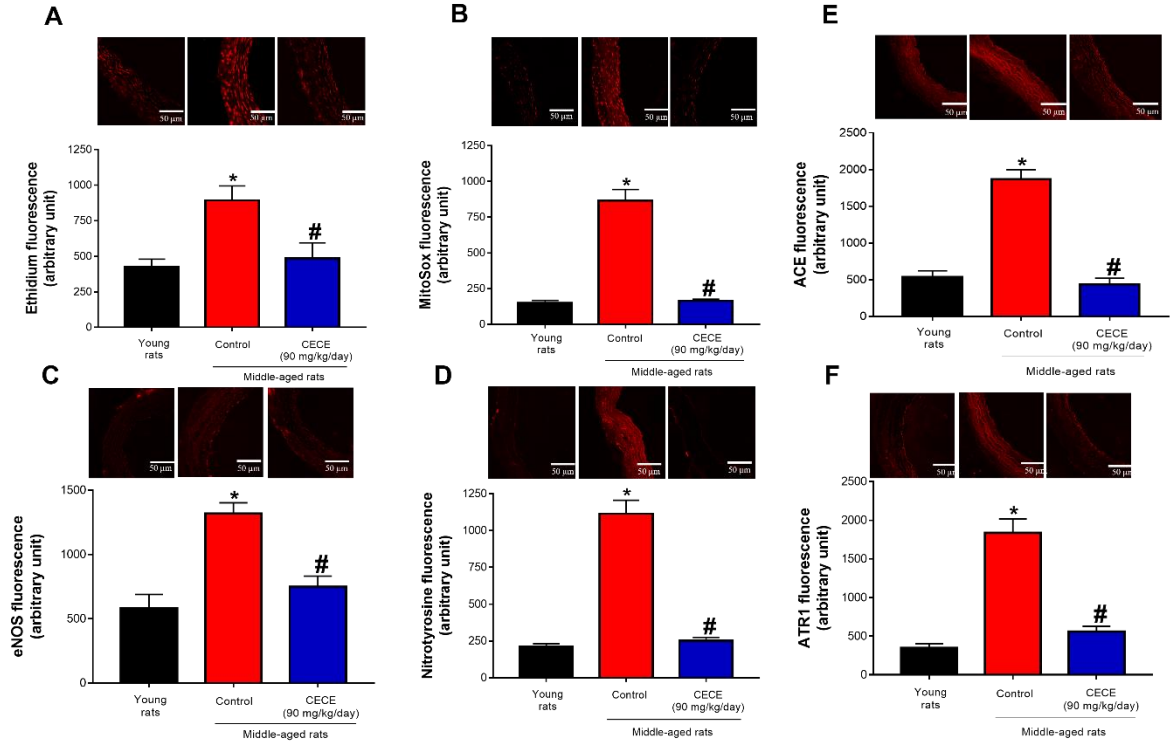
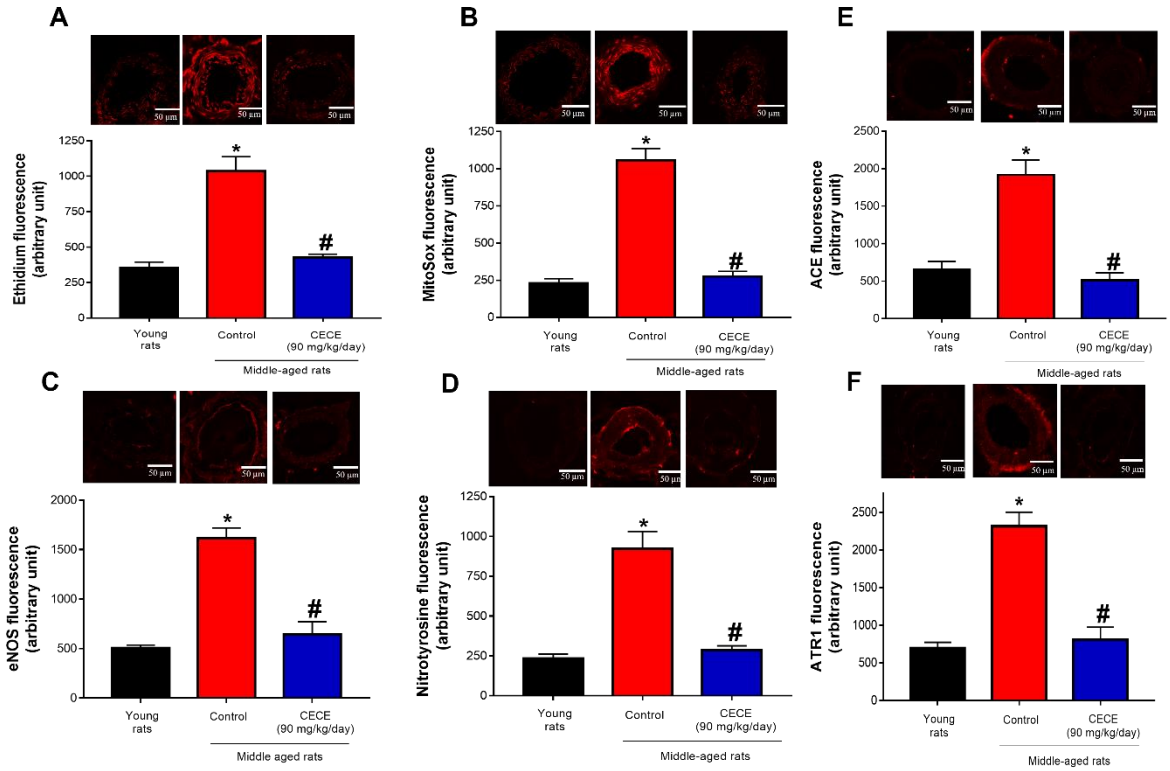


Figure 7


A
B
E
C
D
F
Ethidium fluorescence (arbitrary unit)
MitoSox fluorescence (arbitrary unit)
ACE fluorescence (arbitrary unit)
eNOS fluorescence (arbitrary unit)
Nitrotyrosine fluorescence (arbitrary unit)
ATR1 fluorescence (arbitrary unit)
Young rats
Control
CECE (90 mg/kg/day)
Middle-aged rats
50 µm
*
#

Discussion générale

Dysfonction endothéliale liée à l'âge et hypertension

Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent la principale cause de décès à l'échelle mondiale. Environ 17,9 millions de personnes sont mortes de MCV en 2019, soit 32 % de tous les décès mondiaux (WHO, 2020) contre 17,7 millions en 2017 (Yusuf et al., 2020). L'hypertension et les complications associées, notamment les accidents vasculaires cérébraux et les infarctus du myocarde, ont atteint des niveaux pandémiques (Mills et al., 2020). Indépendamment du fait que les progrès actuels dans le domaine de la médecine ont permis à l'homme de lutter contre plusieurs affections, les MCV sont toujours considérées comme une cause mondiale de morbidité et de mortalité en particulier dans les pays en développement. En effet, plus de trois quarts des décès dus aux MCV ont lieu dans des pays à revenu faible et intermédiaire (Mendis, 2017; WHO, 2020).

L'endothélium est une fine couche de cellules squameuses qui tapissent la surface intérieure de tous les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques. C'est un constituant important des vaisseaux sanguins qui joue un rôle essentiel dans l'homéostasie cardiovasculaire en régulant la fluidité sanguine et la fibrinolyse, le tonus vasculaire, l'angiogenèse, l'adhésion monocyte / leucocyte et l'agrégation plaquettaire. En raison de ses jonctions cellule à cellule spécialisées et étroites, l'endothélium forme une barrière qui limite sélectivement le mouvement des macromolécules (Rahimi, 2017). Un équilibre critique entre les facteurs de relaxation et de contraction dérivés de l'endothélium maintient le tonus vasculaire. Lorsque cet équilibre est perturbé, il prédispose le système vasculaire à la vasoconstriction, à l'adhérence des leucocytes, à l'activation plaquettaire, à la mitogenèse, au stress oxydant, à la thrombose, à l'altération de la coagulation, à l'inflammation vasculaire et aux maladies cardiovasculaires : c'est la dysfonction endothéliale (Grover-Páez and Zavalza-Gómez, 2009; Sun et al., 2016). Plusieurs études précliniques et cliniques ont montré que l'hypertension est associée à un dysfonctionnement endothélial (Higashi and Yoshizumi, 2004; Scolaro et al., 2018).

L’hypertension artérielle est associée à une réduction de 0,62 % de la fonction endothéliale quantifiée par la vasodilatation médiée par le flux (FMD) (Gonzalez and Selwyn, 2003).

La prévalence de l'hypertension augmente considérablement avec l'âge. Le vieillissement peut modifier la structure et la fonction des composants vasculaires, tels que l'endothélium, l’intima et les cellules musculaires lisses, entraînant une augmentation du risque de développement de maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires, liées à l'hypertension (Butt et al., 2010; Folkow and Svanborg, 1993; Wei, 1992). Le vieillissement est associé à des altérations de la structure vasculaire et de la fonction endothéliale à travers diverses voies, y compris le stress oxydatif, la sénescence cellulaire et l'inflammation (El Assar et al., 2013).

Plantes et hypertension

Les plantes ont formé la base de la médecine traditionnelle. Ils existent depuis des milliers d'années et continuent de fournir à l'humanité de nouveaux remèdes contre diverses affections (Beyene et al., 2016; Gurib-Fakim, 2006; Petrovska, 2012). Ces plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle deviennent populaires en tant que sources thérapeutiques, en particulier lorsqu'elles sont accompagnées de preuves scientifiques de leur pertinence clinique. La phytothérapie est une tradition séculaire pratiquée dans le monde et qui implique l'utilisation de plantes entières ou de parties de plantes (feuilles, fleurs, fruits, tiges, racines ou rhizomes) pour maintenir le bien-être général d'un individu (WHO, 2019). À l'échelle mondiale, 60 % des populations développées et plus de 80 % des populations en voie de développement et sous-développées du monde dépendent désormais de la phytothérapie pour leurs besoins de santé (WHO, 2008). En Afrique, l'on estime que 60 à 90 % de l'ensemble de la population utilise la phytomédecine dans la gestion des maladies, y compris l’hypertension (Balogun and Ashafa, 2019), en partie sur la base de sa disponibilité et de son aspect moins couteux par rapport aux médicaments conventionnels (Nunes et al., 2015).

En effet, plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle ont montré leur efficacité dans le traitement de certaines maladies, présentant parfois relativement peu d'effets secondaires cliniques et étant souvent plus abordables que la thérapeutique moderne (Nair et al., 2013). De nombreuses études se sont consacrées à la détermination des propriétés pharmacologiques des composés phytochimiques dérivés des plantes dans la gestion de plusieurs maladies, notamment l'hypertension (Al Disi et al., 2016; Chukwuma et al., 2019). Les données des essais cliniques, y compris des essais contrôlés randomisés ont établi que les régimes à base de plantes constituent un moyen efficace de lutte contre l'hypertension artérielle, même si les mécanismes précis sont encore inconnus (Joshi et al., 2020). Lors d'un essai visant à évaluer les effets des fruits et légumes (les fruits tels que les pommes, les abricots, les oranges, les pêches, les poires, les raisins secs et les fraises étaient majoritairement fournis et les légumes tels que les carottes, les choux-fleurs, les aubergines, la laitue, les pommes de terre, les épinards, les tomates et les courgettes étaient les plus consommés) sur l'acidose métabolique chez 199 participants atteints d'une insuffisance rénale chronique (IRC) de stade I ou II, les chercheurs ont constaté que 2 à 4 tasses de fruits et légumes permettaient de réduire significativement la pression artérielle systolique de 2,4 ± 2,3 mmHg ($P < 0,001$) chez les personnes atteintes d'une IRC de stade 1 et de 5,4 ± 4,6 mmHg ($P < 0,001$) chez les personnes atteintes d'une IRC de stade 2, après 30 jours de traitement, par rapport aux témoins n'ayant reçu aucune intervention (Goraya et al., 2012). Les attributs d'un régime à base de plantes incluant les fruits, les légumes, les légumineuses et les céréales complètes qui peuvent abaisser la pression artérielle comprennent une teneur en énergie plus faible entraînant souvent une perte de poids (Aucott et al., 2005; Barnard et al., 2019), une teneur en sodium plus faible (Clarys et al., 2014; O'Shaughnessy and Karet, 2004), une teneur en potassium accrue (Addison, 1928; Binia et al., 2015; Cappuccio and MacGregor, 1991; Filippini et al., 2017), une réduction du stress oxydatif (Paur et al., 2011; Zhang and Tsao, 2016), une biodisponibilité plus élevée du NO vasodilatateur (Ashworth and

Bescos, 2017; DeMartino et al., 2019) et des effets bénéfiques sur le microbiome (Wang et al., 2016; Yang et al., 2015). Les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques d'un certain nombre de plantes médicinales qui sont actuellement utilisées pour traiter l'hypertension par les communautés africaines sont attribuées à la présence de constituants phytochimiques bioactifs (Gurib-Fakim, 2006). Toutefois, les informations scientifiquement solides sur le sujet sont rares et des recherches supplémentaires sur les composés bioactifs et l'action des plantes médicinales ayant des propriétés antihypertensives doivent être menées (Eddouks et al., 2002; Liwa, 2015). La plupart des plantes médicinales utilisées pour traiter l'hypertension possèdent une activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Des études basées sur un test *in vitro* développé par Elbl et Wagner (1991) pour étudier l'activité de l'ACE ont montré que ces plantes inhibent l'enzyme ACE de plus de 50 % (Duncan et al., 1999; Ramesar et al., 2008). De plus, elles agissent en augmentant la biodisponibilité du NO, en réduisant le stress oxydatif vasculaires ou en modulant l'activité des canaux ioniques vasculaires Ca^{2+} K^{+} (Maaliki et al., 2019). Les extraits méthanoliques et aqueux de certaines plantes traditionnelles comme *Amaranthus hybridus*, *Amaranthus dubius, Justica flava, Asystasia gangetica* et *Tulbaguia violacea*, entre autres, présentent une activité inhibitrice significative de l'ACE (Mackraj and Ramesar, 2007).

Une enquête ethnobotanique menée au Bénin dans les régions du Zou et de la Colline en février 2015 a permis de recenser douze plantes traditionnellement utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle par la population mais dont on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique après consultation des diverses banques de données. L'analyse phytochimique et le screening biologique de ces plantes ont permis d'identifier les deux les plus actives : *Carissa edulis* et *Diodia scandens.* Pour notre étude, nous nous sommes intéressés à ces deux plantes médicinales auxquelles nous avons ajouté *Cleome gynandra* qui, de plus en plus, est également utilisé dans certaines régions du Bénin. Des extraits éthanol/eau

(6:4, v/v) de ces trois plantes ont été réalisés sur base de leur solubilité dans ce mélange de solvant et dans l'optique de rester dans les conditions traditionnelles d'utilisation.

Rôle de l'endothélium dans la relaxation médiée par *Carissa edulis*

Les premières expériences visaient à étudier le rôle de l'endothélium dans les relaxations induites par C. edulis, D. scandens et C. gynandra sur des artères coronaires porcines à l'aide d'études de réactivité vasculaire. Sur ces artères coronaires porcines, l'élimination de l'endothélium a entrainé une diminution presque complète de la relaxation induite par les plantes. L'extrait total de C. edulis (CECE) a montré une activité vasorelaxante plus importante comparativement aux deux autres plantes. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Tokoudagba et *al.* sur *Parkia Biglobosa* une plante utilisée également pour la prise en charge de l'hypertension artérielle (Tokoudagba et al., 2010b). Après fractionnement successif de l'extrait total de C. edulis avec du cyclohexane, du dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle et du butanol suivi de l'étude de la réactivité vasculaire de chacune des fractions, CEBF a montré une activité plus importante que l'extrait total tandis que les extraits d'acétate d'éthyle, de dichlorométhane et de cyclohexane ont été significativement moins actifs. De plus, les résultats indiquent pour CEBF une activité relaxante maximale et constante sur 60 min tandis que l'activité relaxante de la bradykinine utilisée comme agoniste physiologique était transitoire atteignant une valeur maximale après 5 min, et, par la suite, diminuait progressivement pour revenir à la ligne de base. Cette activité soutenue et persistante de CEBF sur l'endothélium est intéressante pour mieux contrôler le tonus vasculaire et protéger la paroi artérielle.

Ensuite, nous avons caractérisé les mécanismes impliqués dans la relaxation dépendante de l'endothélium en étudiant les différentes voies y compris celle du NO, de l'EDH et des prostanoïdes. Les résultats ont montré que la relaxation dépendante de l'endothélium de CECE et CEBF est abolie par la L-NA, un inhibiteur de la NOS, et n'est pas été affectée par l'inhibition des cyclooxygénases ou de l'EDH ; ce qui indique l'implication exclusive du NO.

Des fonctions vasculaires importantes telles que la relaxation des vaisseaux et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire sont régulées par le NO (Boo and Jo, 2003b). Ces résultats sont en accord avec une étude sur les composés polyphénoliques du vin rouge (Ndiaye et al., 2005a), et au moins en partie, avec une autre montrant le rôle majeur du NO et dans une certaine mesure celui de l'EDH dans la relaxation induite par *Dicksonia sellowiana* (Rattmann et al., 2012). CEBF a également entrainé sur les anneaux avec endothélium, une inhibition concentration-dépendante des réponses contractiles induites par le KCl, le $CaCl_2$, le U46619 et la sérotonine indiquant que l'effet inhibiteur de CEBF est efficace contre plusieurs voies de transduction du signal conduisant à l'activation Ca^{2+}-dépendante des protéines contractiles. Ces observations sont en accord avec celles obtenues avec l'extrait de racine de *Berberis orthobotrys* qui a inhibé les réponses contractiles au KCl, $CaCl_2$ et au U46619 à des concentrations plus importantes (10, 30 et 100 µg/ml) (Alamgeer et al., 2016). L'effet inhibiteur de CEBF sur les réponses contractiles à la sérotonine est très prononcé et est prévenu par un inhibiteur de la NOS, ce qui implique un rôle majeur de la formation endothéliale de NO. Une étude précédente a également montré que la formulation d'acides gras polyinsaturés oméga-3 EPA:DHA 6:1 inhibe fortement les contractions induites par la sérotonine dans les anneaux d'artère coronaire de porc, principalement en stimulant une formation endothéliale accrue de NO (Zgheel et al., 2019).

Les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes de *Carissa edulis* pourraient être responsables de son activité vasorelaxante

Notre étude a montré une importante accumulation vasculaire dose-dépendante de polyphénols dans l'endothélium et seulement une accumulation mineure dans le muscle lisse vasculaire, dans les artères coronaires porcines et l'aorte thoracique de rat. Il a été montré que les polyphénols augmentent l'activité catalytique de la eNOS pour favoriser la formation du NO, et qu'ils stimulent l'expression de la eNOS dans les cellules endothéliales, y compris les cellules endothéliales humaines (Leikert et al., 2002; Schini-Kerth et al., 2010b). L'étude de la teneur

totale en polyphénols a révélé que l'extrait total de ***Carissa edulis*** et sa fraction butanolique sont riches en polyphénols. Des études antérieures ont rapporté que les polyphénols constituent les principes actifs majeurs d'un large éventail de plantes médicinales utilisées pour la protection vasculaire (Andriambeloson et al., 1997). Ils sont impliqués dans la relaxation dépendante de l'endothélium des anneaux aortiques de rat (Diebolt et al., 2001) et des artères coronaires porcines (Ndiaye et al., 2005b). La présence de composés phénoliques est très répandue parmi les plantes et les produits végétaux. Les polyphénols d'origine végétale peuvent induire une relaxation dépendante de l'endothélium suite à l'activation rédox-sensible de la kinase Src entraînant l'activation de la voie PI3-kinase/Akt de la eNOS (Anselm et al., 2009). L'analyse de CEBF par LC-HRMS a révélé la présence de nombreux composés de la famille des polyphénols, terpènes et alcaloïdes. Des études réalisées sur plusieurs plantes dont l'activité antihypertensive/vasorelaxante a été validée ont indiqué la présence des molécules d'intérêt parmi lesquelles les polyphénols sont les constituants majeurs suivis des terpènes et des alcaloïdes (Maione et al., 2013b). Leur effet antihypertenseur implique entre autres l'inhibition de l'ACE, l'inhibition des canaux calciques, l'activation de la eNOS et l'activation de l'adénylyl cyclase (Maione et al., 2013b). Les polyphénols présents dans la fraction butanolique de ***Carissa edulis*** sont les flavonoïdes, les acides phénoliques, la coumarine et l'anthraquinone. Les flavonoïdes (sous-groupes : flavones, flavanones, isoflavones, flavan-3-ols, anthocyanes et flavonols) sont le plus grand groupe de composés phénoliques trouvés dans les plantes et se sont avérés être les composés actifs les plus courants dans la plupart des espèces végétales à activité antihypertensive (Maaliki et al., 2019). Sun et *al.* ont montré que la lutéoline et la quercétine des bourgeons de *Coreopsis tinctoria* ont une relaxation efficace sur des anneaux d'aorte de rat précontractés à la phényléphrine (Sun et al., 2013b). Les flavonoïdes totaux d'*Elsholtzia splendens* relâchent l'aorte de rat indépendamment de la présence de l'endothélium (Wang et al., 2014b). Paredes et *al.* ont évalué l'effet antihypertenseur de

plusieurs extraits végétaux riches en flavonoïdes (citron, pamplemousse + orange amère, et cacao) sur un modèle de rat hypertendu suite à l'infusion chronique (6 semaines) de l'inhibiteur de la synthèse de NO, le L-NAME. Les résultats ont montré que les extraits riches en flavonoïdes diminuent la pression artérielle induite par l'administration chronique de L-NAME chez le rat. De plus, l'apigénine un flavonoïde purifié induit également la relaxation de l'aorte avec une composante dépendante et une indépendante du NO, et augmente l'excrétion urinaire de nitrite chez les rats (Paredes et al., 2018b). Le pouvoir vasorelaxant des terpènes a également été étudié. Cardoso Lima et *al.,* ont montré dans leur étude que les terpènes oxygénés et non oxygénés induisaient une relaxation dépendante de l'endothélium de l'artère mésentérique supérieure du rat (Cardoso Lima et al., 2012b). Ils agissent via des mécanismes qui impliquent l'inhibition de l'influx de Ca^{2+} dans le muscle lisse vasculaire, la réduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la stimulation de la synthèse de NO (Alves-Silva et al., 2016). Les effets vasodilatateurs des alcaloïdes ont également été étudiés. Matsuo et *al.* ont étudié les effets de quatre alcaloïdes indoliques (Villocarines A–D) isolés des feuilles d'*Uncaria villosa* sur des anneaux d'aorte de rat. Les études ont montré que la Villocarine A entraine une activité vasorelaxante sur l'anneau aortique du rat. Cet effet vasorelaxant serait principalement dû à l'inhibition de l'influx de calcium associé à l'activation de récepteurs membranaires (ROC) et de canaux calciques voltage-dépendants (VDC) et aussi en partie à la libération accrue du NO par les cellules endothéliales et à l'ouverture de canaux K^+ voltage dépendant (Matsuo et al., 2011). Wicha et *al.* ont également étudié les effets de la néférine sur des anneaux d'aortes isolées de rat hypertendus suite à l'administration chronique (4 semaines) de L-NAME. Ils ont montré dans que cette molécule induit une activité vasorelaxante médiée par la voie eNOS/NO/sGC (Wicha et al., 2020).

Effet de *Carissa edulis* sur la dysfonction endothéliale liée à l'âge

Le vieillissement est considéré comme étant un facteur de risque majeur de MCV tant chez l'homme qu'au niveau expérimental. Plusieurs études cliniques ont montré que la vasodilatation dépendante de l'endothélium diminue progressivement avec l'âge. Cette observation a été faite de façon constante dans les artères de conduction telles que les artères coronaires (Egashira et al., 1993), l'artère brachiale *in vivo* (Taddei et al., 1995) et l'artère basilaire *ex vivo* (Hatake et al., 1990) mais aussi dans les vaisseaux de résistance (Lyons et al., 1997; Singh et al., 2002) et se produit plus tôt chez les hommes que chez les femmes (Celermajer et al., 1994). Des études précliniques ont montré que le vieillissement est associé à une diminution de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium en raison d'une production accrue de facteurs de contraction dérivés de l'endothélium (EDCF), d'un stress oxydatif et/ou d'une diminution de la production de facteurs vasodilatateurs, notamment le NO et l'EDH (El Assar De La Fuente et al., 2012). La présente étude a impliqué des expériences sur des artères de conductance (aorte de rat) et de résistance (artère mésentérique principale de rat) pour la caractérisation des mécanismes sous-jacents à la régulation du tonus vasculaire par l'extrait total de *Carissa edulis*. L'étude s'est concentrée sur l'effet d'une dose de 90 mg/kg/j de *Carissa edulis* chez des rats d'âge moyen ingérée dans l'eau de boisson pendant deux semaines. Cette dose de 90 mg/kg/j chez le rat équivaut à 0,87 g/j de CECE pour un homme de 60 kg (Reagan-Shaw et al., 2008) et se situe dans la fourchette des doses rapportées dans différentes études cliniques, allant de allant de 0,18 à 10 g/jour (Appel et al., 1993; Bhatt et al., 2019; Delgado-Lista et al., 2012; Enns et al., 2014; Jeansen et al., 2018; Miller et al., 2014). Les résultats indiquent que chez les rats de 40 semaines, la dysfonction endothéliale liée à l'âge est caractérisée par une relaxation dépendante de l'endothélium à l'ACh considérablement diminuée et une contraction vasculaire à la PE accrue. En effet, la dysfonction endothéliale est due à un déséquilibre entre les facteurs relaxants (EDRFs) et les facteurs contracturants dérivés de l'endothélium (EDCFs), à la suite d'une formation réduite et/ou une dégradation accrue des

EDRFs et/ou à une surproduction des EDCFs (Khodja et al., 2012). Une telle dysfonction endothéliale est également observée au cours du vieillissement physiologique, qui se caractérise par une diminution progressive de la biodisponibilité du NO (Imaoka et al., 1999), une réduction de la composante EDHF (Goto et al., 2000b), une formation accrue des EDCFs, en particulier de ROS (Hamilton et al., 2001) ainsi qu'une formation accrue de prostanoïdes dérivés de la cyclooxygénase (Vanhoutte and Tang, 2008). Le traitement avec CECE a amélioré de manière significative la régulation du tonus vasculaire par le NO d'origine endothéliale. En effet, une forte augmentation des réponses contractiles induites par la PE a été observée en présence d'un inhibiteur de la NOS, indiquant une augmentation de la libération basale de NO dans l'artère mésentérique principale et l'aorte thoracique. Nos résultats sont en adéquation avec ceux de Dal-Ros et *al.* chez des rats d'âge moyen de 51 semaines ayant reçu 100 mg/kg/j de polyphénols du vin rouge dans l'eau de boisson pendant 4 semaines (Dal-Ros et al., 2012c) et ceux de Randriamboavonjy et *al*. chez des rats d'âge moyen de 46 semaines ayant reçu 750 mg/kg/j de poudre de graines de *Moringa oleifera* pendant 4 semaines (Randriamboavonjy et al., 2019).

Effet de *Carissa edulis* sur le stress oxydatif vasculaire lié à l'âge

L'augmentation du stress oxydant vasculaire et les dommages associés ont été rapportés dans le cadre du vieillissement et de divers facteurs de risque de maladies cardiovasculaires tels que l'hypertension artérielle (Ungvari et al., 2008). Le stress oxydant lié au vieillissement est un facteur majeur de la dysfonction endothéliale et pourrait être due à la fois à une augmentation de la formation des ROS et/ou à une diminution de l'inactivation de ces ROS par les mécanismes de défenses antioxydantes cellulaires (El Assar et al., 2013). Ainsi, l'infusion de vitamine C est associée à une augmentation du flux sanguin dans l'avant-bras en réponse à l'ACh chez des sujets âgés et hypertendus (Taddei et al., 2001a). La sonde redox-sensible dihydroéthidium (DHE) nous a permis de mesurer le niveau de formation des ROS dans des

sections congelées de l'artère mésentérique principale et secondaire. Le DHE est oxydé par les ROS intracellulaires pour générer de l'éthidium qui se lie ensuite à l'ADN du noyau et donne une forte fluorescence rouge à des longueurs d'onde d'excitation comprises entre 500 et 530 et d'émission comprises entre 590 et 620 nm (Owusu-Ansah et al., 2008). Les résultats obtenus montrent une augmentation significative du marquage à l'éthidium dans les sections vasculaires de rats âgés non traités par rapport aux rats jeunes, indiquant une augmentation du stress oxydant vasculaire. L'utilisation de la sonde fluorescente MitoSOX permettant de détecter la formation de ROS dans les mitochondries à donner des résultats similaires à ceux obtenus avec la DHE (Zielonka and Kalyanaraman, 2010). La théorie du stress oxydant lors du vieillissement part du principe que les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNS) induisent des dommages oxydatifs, provoquant un dysfonctionnement cellulaire et un déclin des fonctions physiologiques avec l'apparition de maladies dégénératives (Hano and Tungmunnithum, 2020).Le stress oxydant vasculaire peut provenir de plusieurs sources cellulaires dont la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, la eNOS découplée, les COXs et la chaine respiratoire mitochondriale (El Assar et al., 2013). La production de ROS par la NADPH oxydase est principalement sous forme d'anion superoxyde qui peut réduire la biodisponibilité du NO en le transformant chimiquement en anion peroxynitrite ($ONOO^-$). De plus, l'anion peroxynitrite et l'anion superoxyde peuvent conduire à une formation supplémentaire de ROS en « découplant » la eNOS via l'oxydation du BH_4, un cofacteur essentiel de la eNOS, en BH_2 (Förstermann, 2010; Yang et al., 2009). L'infusion de BH_4 à des sujets hypertendus a conduit à une amélioration de la fonction endothéliale (Vásquez-Vivar et al., 2003). La surexpression de la eNOS dans les artères mésentériques principale et secondaire des rats âgés pourrait être due à un mécanisme de compensation de la réduction de la biodisponibilité du NO. Une augmentation de l'expression de la eNOS a précédemment été décrite dans l'aorte et l'artère mésentérique de rats âgés (Briones et al., 2005; Cernadas et al., 1998; Farooq et al., 2020).

L'angiotensine II joue un rôle important dans la régulation du système cardiovasculaire principalement par l'activation de ses récepteurs de type 1 et 2 (AT_1R et AT_2R, respectivement). L'augmentation du système angiotensine local a été associée à une dysfonction endothéliale et une augmentation du stress oxydant vasculaire *via* une activation de la NADPH oxydase induite par AT_1R chez des rats hypertendus (Harrison et al., 2003; Niazi et al., 2017; Rajagopalan et al., 1996). Le rôle clé du système angiotensine est mis en évidence par le fait que le traitement des rats âgés soit par un inhibiteur de l'ACE ou par un antagoniste du récepteur AT_1R conduit à une amélioration de la dysfonction endothéliale due, au moins partiellement, à une diminution du stress oxydant (Goto et al., 2000b; Kansui et al., 2002; Mukai et al., 2002). De surcroit, les souris chez qui AT_1R a été bloqué ont montré une augmentation de leur durée de vie et une amélioration des dommages cardiaques, une diminution de la formation des ROS et la normalisation de la fonction mitochondriale (Benigni et al., 2009). Le vieillissement a aussi été associé à une augmentation de l'expression de l'angiotensine II et de l'ACE dans le poumon et l'aorte de rats normotendus (Challah et al., 1997) et dans l'aorte de primates non-humains (Wang et al., 2003) alors qu'une augmentation liée à l'âge de l'expression de AT_1R, de l'angiotensine II et de l'ACE a été rapportée dans l'artère mésentérique de la souris (Yoon et al., 2016). Conformément à ces études, les présents résultats ont montré une augmentation significative des expressions de AT_1R et de l'ACE dans les sections d'artères mésentériques principales et secondaires de rats âgés non traités par rapport aux rats jeunes, indiquant une activation du système angiotensine local au niveau des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle. Sur un modèle de rat hypertendu par infusion chronique d'angiotensine II, la dysfonction endothéliale est associée à une augmentation du stress oxydant vasculaire due, du moins en partie, à une surexpression de AT_1R (Niazi et al., 2017).

L'activité de *Carissa edulis* implique les co-transporteurs Na-glucose (SGLTs)

Les cotransporteurs sodium-glucose (SGLTs) sont une famille de transporteurs de glucose, dont six isoformes ont été identifiées (SGLT1-SGLT6) (Chen et al., 2010). Parmi ces isoformes, SGLT1 et SGLT2 jouent un rôle essentiel dans la réabsorption rénale du glucose ; SGLT2 est responsable de la majorité de la réabsorption rénale du glucose (près de 90 %), tandis que SGLT1 représente environ 10 % de la réabsorption (Chao and Henry, 2010). L'inhibition des $SGLT_S$ entraîne une diminution significative de la glycémie en empêchant la réabsorption du glucose dans les reins. Par conséquent, les inhibiteurs des SGLTs ont été proposés comme nouveau traitement pour les patients diabétiques de type 2. Notre étude a montré une importante accumulation vasculaire dose-dépendante de polyphénols dans l'endothélium de l'aorte thoracique de rat. En présence d'Empagliflozine inhibiteur SGLT2 et de Sotagliflozine inhibiteur mixte SGLT1 et 2, nous avons observé une diminution de l'accumulation des polyphénols suggérant une implication des co-transporteurs Na/glucose. Kartinah et *al.* dans une étude *in silico* ont montré que l'extrait méthanolique *Hibiscus sabdariffa* (Hib) pouvait interagir avec SGLT1 (Kartinah et al., 2019). Des résultats similaires ont également été obtenus par Ader et *al.* qui montrent que les glucosides flavonoïdes tels que les glucosides de quercétine Q-3-Gluc et Q-4′-Gluc inhibent de manière compétitive l'absorption Na^+ dépendante du methyl-*α*-D-glucopyranoside via SGLT1 (Ader et al., 2001). Jin et *al.* ont montré que la delphinidine-3-glucoside s'accumule dans les cellules endothéliales via un mécanisme de transport impliquant SGLT1 (Jin et al., 2013).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans l'ensemble, notre étude a permis de prouver scientifiquement que l'extrait des feuilles de *Carissa edulis*, traditionnellement utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle au Bénin a un effet vasorelaxant sur les anneaux d'artères coronaires porcines et aorte de rats. L'activité de la plante est concentrée dans sa fraction butanolique dont la cinétique de relaxation a révélé qu'elle a un effet soutenu sur une période de 60 min tandis que l'activité de la bradykinine était transitoire atteignant une valeur maximale après 5 min, et, par la suite, diminuant vers la ligne de base. Un tel effet soutenu de la fraction révèle sa stabilité et pourrait être d'un intérêt majeur dans le contrôle prolongé du tonus vasculaire. La fraction butanolique de *Carissa edulis* (CEBF) est riche en polyphénols : composés considérés comme principes actifs d'un large éventail de plantes médicinales utilisées pour la protection vasculaire (Andriambeloson et al., 1997). Ils sont impliqués dans la relaxation dépendante de l'endothélium des anneaux aortiques de rat (Diebolt et al., 2001) et des artères coronaires porcines (Ndiaye et al., 2005b) en augmentant fortement la libération du NO, l'activité de la eNOS et son expression dans les cellules endothéliales humaines (Leikert et al., 2002). CEBF contient également des terpènes et des alcaloïdes : composés ayant aussi des propriétés vasorelaxantes (Alves-Silva et al., 2016; Wicha et al., 2020) et qui pourraient également être associées à son activité. L'effet vasorelaxant de *Carissa edulis* est strictement endothélium dépendant dû à l'accumulation des polyphénols préférentiellement au niveau de l'endothélium. Il est médié par le NO endothélial et pourrait impliquer les co-transporteurs Na/Glucose (SGLTs).

Les études *in vivo* ont indiqué que la dysfonction endothéliale liée au vieillissement chez le rat était associée à une formation réduite du NO endothélial et à un niveau accru de stress oxydatif dans toute la paroi artérielle, ce qui est en accord avec les études précédentes (Farooq et al., 2020). Le traitement avec 90 mg/kg/jour d'extrait total de *Carissa edulis* pendant

deux semaines a significativement amélioré la fonction endothéliale et restauré la relaxation médiée par le NO en réponse à l'ACh et a également augmenté la formation basale du NO dans l'artère mésentérique principale et l'aorte thoracique de rats d'âge moyen. La consommation de l'extrait est aussi capable de réduire fortement le niveau d'expression de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ACE) et de son récepteur de type 1 (AT_1R) impliqués dans la dysfonction endothéliale associée au vieillissement et à l'hypertension artérielle, et de réduire significativement le stress oxydant.

La consommation de polyphénols a été associée à une faible incidence des maladies cardiovasculaires (Tresserra-Rimbau et al., 2014) et un apport élevé en polyphénols a réduit la mortalité des sujets présentant des facteurs de risque cardiovasculaire par rapport à ceux dont l'apport en polyphénols était faible (Tresserra-Rimbau et al., 2014). En outre, les polyphénols peuvent améliorer la fonction vasculaire lors de la dysfonction endothéliale associée au vieillissement chez l'homme (Khurana et al., 2013; Santilli et al., 2015; Suganya et al., 2016). Des essais cliniques récents menés sur des patients souffrant d'une maladie coronarienne stable et ayant consommé du Resvératrol pendant trois mois ont montré une amélioration de la vasodilatation médiée par le flux (Magyar et al., 2012).

Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer la principale voie de signalisation qui mène à l'activation de la NO synthase endothéliale (eNOS) par *Carissa édulis* et en particulier le rôle de la voie PI-3-kinase/Akt, d'élucider le rôle des co-transporteurs Na/Glucose (SGLTs) dans l'accumulation des polyphénols de *Carissa édulis* au niveau de l'endothélium, d'identifier et d'isoler les métabolites cibles impliqués dans l'activité de *Carissa edulis* sur le système vasculaire. Enfin, il serait intéressant d'évaluer la capacité de *Carissa edulis* à prévenir et/ou ralentir le remodelage cardiaque associé aux maladies cardiovasculaires.

Références bibliographiques

Références

Abdu, K.B., Khan, M.E., Rumah, M.M., 2008. Antimicrobial activity and phytochemical screening of extracts from the root bark of Carissa edulis, against human/animal pathogens. Continental Journal of Tropical Medicine 2, 1.

Abdullahi, A.A., 2011. Trends and Challenges of Traditional Medicine in Africa. 1 8. https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i5S.5

Abu-Soud, H.M., Stuehr, D.J., 1993. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. PNAS 90, 10769–10772. https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10769

Achenbach, H., Waibel, R., Addae-Mensah, I., 1985. Sesquiterpenes from carissa edulis. Phytochemistry 24, 2325–2328. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83035-6

Achenbach, H., Waibel, R., Addae-Mensah, I., 1983. Lignans and other constituents from Carissa edulis. Phytochemistry 22, 749–753. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86976-9

Addison, W.L.T., 1928. The Use of Sodium Chloride, Potassium Chloride, Sodium Bromide, and Potassium Bromide in Cases of Arterial Hypertension which are Amenable to Potassium Chloride. Can Med Assoc J 18, 281–285.

Ader, P., Blöck, M., Pietzsch, S., Wolffram, S., 2001. Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1). Cancer Letters 162, 175–180. https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00645-5

Agapitov, A.V., Haynes, W.G., 2002. Role of endothelin in cardiovascular disease. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 3, 1–15. https://doi.org/10.3317/jraas.2002.001

Ajaiyeoba, E.O., 2000. Phytochemical and antimicrobial studies of Gynandropsis gynandra and Buchholzia coriaceae extracts. African journal of Biomedical research 3, 161–165.

Akah, P.A., Okogun, J.I., Ekpendu, T.O., 1993. Antioedema and analgesic actions ofDiodia scandens extract in rats and mice. Phytother. Res. 7, 317–319. https://doi.org/10.1002/ptr.2650070412

Akoègninou, A., Van der Burg, W.J., Van der Maesen, L.J.G., 2006. Flore analytique du Bénin. Backhuys Publishers.

Akpuaka, M.U., Chime, J.C., Igoli, J.O., 2018a. Phytochemical Analysis of n- Hexane and Ethylacetate Extracts of Diodia scandens Sw and Spectroscopic Identification of an Omega- 6 Fatty Acid and a Glyceryl Trilinoleoate. Physical Science International Journal 1–9. https://doi.org/10.9734/PSIJ/2018/42782

Akpuaka, M.U., Chime, J.C., Igoli, J.O., 2018b. Phytochemical Analysis of n- Hexane and Ethylacetate Extracts of Diodia scandens Sw and Spectroscopic Identification of an Omega- 6 Fatty Acid and a Glyceryl Trilinoleoate. Physical Science International Journal 1–9. https://doi.org/10.9734/PSIJ/2018/42782

Al Disi, S.S., Anwar, M.A., Eid, A.H., 2016. Anti-hypertensive herbs and their mechanisms of action: part I. Frontiers in pharmacology 6, 323.

Alamgeer, Auger, C., Chabert, P., Lugnier, C., Mushtaq, M.N., Schini-Kerth, V.B., 2018. Mechanisms underlying vasorelaxation induced in the porcine coronary arteries by Thymus linearis , Benth. Journal of Ethnopharmacology 225, 211–219. https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.07.010

Alamgeer, Chabert, P., Akhtar, M.S., Jabeen, Q., Delecolle, J., Heintz, D., Garo, E., Hamburger, M., Auger, C., Lugnier, C., Kim, H.-J., Oak, M.-H., Schini-Kerth, V.B., 2016. Endothelium-independent

vasorelaxant effect of a Berberis orthobotrys root extract via inhibition of phosphodiesterases in the porcine coronary artery. Phytomedicine 23, 793–799. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.04.005

Al-Awthan, Y.S., Salem Baha, O., 2019. Protective Role of Carissa edulis Ethanolic Extract Against Dimethoate-induced Hepatotoxicity in Guinea Pigs. Pakistan J. of Biological Sciences 22, 299–308. https://doi.org/10.3923/pjbs.2019.299.308

Alodeani, E.A., 2016. Isolated Burn Skin Pathogens: Screening Against Extract of Carissa Edulis Vahl and Computational Studies. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 8, 1610–1613.

Altschul, R., 1954. Endo-thelium. Its development, morphology, function, and pathology. Endo-thelium. Its development, morphology, function, and pathology.

Alves-Silva, M.J., Zuzarte, M., Marques, C., Salgueiro, L., Girao, H., 2016. Protective Effects of Terpenes on the Cardiovascular System: Current Advances and Future Perspectives. Current Medicinal Chemistry 23, 4559–4600.

Al-Youssef, H., Hassan, W.H.B., 2012. Phytochemical and Biological Studies of the Aerial Parts of Carissa edulis Growing in Saudi Arabia. Biomed. Pharmacol. J. 5, 9–18. https://doi.org/10.13005/bpj/314

Al-Youssef, H.M., Hassan, W.H.B., 2017. Chemical constituents of Carissa edulis Vahl. Arabian Journal of Chemistry 10, 109–113. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.01.004

Al-Youssef, H.M., Hassan, W.H.B., 2014a. Phytochemical and Pharmacological aspects of Carissa edulis VAHL: A review. Int. J. Curr. Res. Chem. Pharm. Sci 1, 12–24.

Al-Youssef, H.M., Hassan, W.H.B., 2014b. Phytochemical and Pharmacological aspects of Carissa edulis VAHL: A review. Int. J. Curr. Res. Chem. Pharm. Sci 1, 12–24.

Andriambeloson, E., Kleschyov, A.L., Muller, B., Beretz, A., Stoclet, J.C., Andriantsitohaina, R., 1997. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. British Journal of Pharmacology 120, 1053–1058. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701011

Ansari, I., Patil, D.T., 2018. A brief review on phytochemical and pharmacological profile of Carissa spiranum L. Asian J Pharm Clin Res 11, 12. https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i9.26316

Anselm, E., Socorro, V.F.M., Dal-Ros, S., Schott, C., Bronner, C., Schini-Kerth, V.B., 2009. Crataegus special extract WS 1442 causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src-and Akt-dependent activation of endothelial NO synthase but not via activation of estrogen receptors. Journal of cardiovascular pharmacology 53, 253–260.

Anter, E., Thomas, S.R., Schulz, E., Shapira, O.M., Vita, J.A., Keaney, J.F., 2004. Activation of Endothelial Nitric-oxide Synthase by the p38 MAPK in Response to Black Tea Polyphenols *. Journal of Biological Chemistry 279, 46637–46643. https://doi.org/10.1074/jbc.M405547200

Appel, L.J., Miller, E.R., III, Seidler, A.J., Whelton, P.K., 1993. Does Supplementation of Diet With “Fish Oil” Reduce Blood Pressure?: A Meta-analysis of Controlled Clinical Trials. Archives of Internal Medicine 153, 1429–1438. https://doi.org/10.1001/archinte.1993.00410120017003

Arias-Durán, L., Estrada-Soto, S., Hernández-Morales, M., Chávez-Silva, F., Navarrete-Vázquez, G., León-Rivera, I., Perea-Arango, I., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., 2020. Tracheal relaxation through calcium channel blockade of Achillea millefolium hexanic extract and its main

bioactive compounds. Journal of Ethnopharmacology 253, 112643. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112643

Arnal, J.-F., Dinh-Xuan, A.-T., Pueyo, M., Darblade, B., Rami, J., 1999. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 55, 1078–1087.

Arroyo, V., Angeli, P., Moreau, R., Jalan, R., Clària, J., Trebicka, J., Fernández, J., Gustot, T., Caraceni, P., Bernardi, M., 2021. The systemic inflammation hypothesis: Towards a new paradigm of acute decompensation and multiorgan failure in cirrhosis. Journal of Hepatology 74, 670–685. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.048

Arumugam, S., Sreedhar, R., Thandavarayan, R.A., Karuppagounder, V., Krishnamurthy, P., Suzuki, K., Nakamura, M., Watanabe, K., 2016. Angiotensin receptor blockers: Focus on cardiac and renal injury. Trends in Cardiovascular Medicine 26, 221–228. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.06.004

Ashworth, A., Bescos, R., 2017. Dietary nitrate and blood pressure: evolution of a new nutrient? Nutrition Research Reviews 30, 208–219. https://doi.org/10.1017/S0954422417000063

Asiedu-Larbi, J., Adjimani, J.P., Okine, L.K.N., Nyarko, A.K., Ocloo, A., 2020. ACUTE AND CHRONIC TOXICITY STUDIES OF THE AQUEOUS EXTRACT OF MIST DIODIA, ITS CONTRIBUTING PLANTS: Diodia scandens AND Aframomum melegueta IN MALE AND FEMALE SPRAGUE-DAWLEY RATS. Journal of Global Biosciences Vol 9, 7988–8013.

Assongba, Y.F., Essou, J.I., Adomou, C.A., Djego, M.J., 2021. Caractérisation morphologique de Cleome gynandra L. au Bénin. International Journal of Biological and Chemical Sciences 15, 185–199.

Aucott, L., Poobalan, A., Smith, W.C.S., Avenell, A., Jung, R., Broom, J., 2005. Effects of Weight Loss in Overweight/Obese Individuals and Long-Term Hypertension Outcomes. Hypertension 45, 1035–1041. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000165680.59733.d4

Awad, N., Niu, H., Ali, U., Morsi, Y., Lin, T., 2018. Electrospun Fibrous Scaffolds for Small-Diameter Blood Vessels: A Review. Membranes 8, 15. https://doi.org/10.3390/membranes8010015

Bala, A., Kar, B., Haldar, P.K., Mazumder, U.K., Bera, S., 2010. Evaluation of anticancer activity of Cleome gynandra on Ehrlich's Ascites Carcinoma treated mice. Journal of Ethnopharmacology 129, 131–134. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.03.010

Balogun, F.O., Ashafa, A.O.T., 2019. A Review of Plants Used in South African Traditional Medicine for the Management and Treatment of Hypertension. Planta Med 85, 312–334. https://doi.org/10.1055/a-0801-8771

Barnard, N.D., Kahleova, H., Levin, S.M., 2019. The Use of Plant-Based Diets for Obesity Treatment. International Journal of Disease Reversal and Prevention 1, 12 pp-12 pp. https://doi.org/10.22230/ijdrp.2019v1n1a11

Barrows, I.R., Ramezani, A., Raj, D.S., 2019. Inflammation, Immunity, and Oxidative Stress in Hypertension—Partners in Crime? Advances in Chronic Kidney Disease 26, 122–130. https://doi.org/10.1053/j.ackd.2019.03.001

Bautista, L.E., 2003. Inflammation, endothelial dysfunction, and the risk of high blood pressure: epidemiologic and biological evidence. Journal of Human Hypertension 17, 223–230. https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001537

Bavishi, C., Messerli, F.H., Kadosh, B., Ruilope, L.M., Kario, K., 2015. Role of neprilysin inhibitor combinations in hypertension: insights from hypertension and heart failure trials. European Heart Journal 36, 1967–1973. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv142

Beckman, J.S., Koppenol, W.H., 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. American Journal of Physiology-Cell Physiology 271, C1424–C1437.

Benigni, A., Corna, D., Zoja, C., Sonzogni, A., Latini, R., Salio, M., Conti, S., Rottoli, D., Longaretti, L., Cassis, P., 2009. Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. The Journal of clinical investigation 119, 524–530.

Benjamin, E.J., Virani, S.S., Callaway, C.W., Chamberlain, A.M., Chang, A.R., Cheng, S., Chiuve, S.E., Cushman, M., Delling, F.N., Deo, R., 2018. Heart disease and stroke statistics—2018 update: a report from the American Heart Association. Circulation 137, e67–e492.

Beyene, Belay, Beyene, Belachew, Deribe, H., 2016. Review on application and management of medicinal plants for the livelihood of the local community. Journal of Resources Development and Management 22, 33–39.

Bhatt, D.L., Steg, P.G., Miller, M., Brinton, E.A., Jacobson, T.A., Ketchum, S.B., Doyle, R.T., Juliano, R.A., Jiao, L., Granowitz, C., Tardif, J.-C., Ballantyne, C.M., 2019. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. New England Journal of Medicine 380, 11–22. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1812792

Binia, A., Jaeger, J., Hu, Y., Singh, A., Zimmermann, D., 2015. Daily potassium intake and sodium-to-potassium ratio in the reduction of blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. Journal of Hypertension 33, 1509–1520. https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000611

Blake, G.J., Rifai, N., Buring, J.E., Ridker, P.M., 2003. Blood Pressure, C-Reactive Protein, and Risk of Future Cardiovascular Events. Circulation 108, 2993–2999. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000104566.10178.AF

Boakye-Yiadom, M., Offei, D., Sapaty, C., Yeboah, R., Ocloo, A., 2017. Retrospectivestudy on Mist Diodia as an Antihypertensive.

Boo, Y.C., Jo, H., 2003a. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. American Journal of Physiology-Cell Physiology 285, C499–C508. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00122.2003

Boo, Y.C., Jo, H., 2003b. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. American Journal of Physiology-Cell Physiology 285, C499–C508. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00122.2003

Boutouyrie, P., Laurent, S., 2004. Remodelage des grosses et petites artères dans l'hypertension artérielle. Sang Thrombose Vaisseaux 16, 81–89.

Briones, A.M., Montoya, N., Giraldo, J., Vila, E., 2005. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. Autonomic and Autacoid Pharmacology 25, 155–162.

Broekaert, A., Godfraind, T., 1979. A comparison of the inhibitory effect of cinnarizine and papaverine on the noradrenaline-and calcium-evoked contraction of isolated rabbit aorta and mesenteric arteries. European Journal of Pharmacology 53, 281–288.

Bucci, M., Gratton, J.-P., Rudic, R.D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G., Sessa, W.C., 2000. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. Nature medicine 6, 1362–1367.

Butt, H.Z., Atturu, G., London, N.J., Sayers, R.D., Bown, M.J., 2010. Telomere Length Dynamics in Vascular Disease: A Review. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 40, 17–26. https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2010.04.012

Cappuccio, F.P., MacGregor, G.A., 1991. Does potassium supplementation lower blood pressure? A meta-analysis of published trials. J hypertens 9, 465–473.

Cardoso Lima, T., Mota, M.M., Barbosa-Filho, J.M., Viana Dos Santos, M.R., De Sousa, D.P., 2012a. Structural relationships and vasorelaxant activity of monoterpenes. DARU J Pharm Sci 20, 23. https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-23

Cardoso Lima, T., Mota, M.M., Barbosa-Filho, J.M., Viana Dos Santos, M.R., De Sousa, D.P., 2012b. Structural relationships and vasorelaxant activity of monoterpenes. DARU J Pharm Sci 20, 23. https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-23

Celermajer, D.S., Sorensen, K.E., Spiegelhalter, D.J., Georgakopoulos, D., Robinson, J., Deanfield, J.E., 1994. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. Journal of the American College of Cardiology 24, 471–476. https://doi.org/10.1016/0735-1097(94)90305-0

Cernadas, M.R., de Miguel, L.S., García-Durán, M., González-Fernández, F., Millás, I., Montón, M., Rodrigo, J., Rico, L., Fernández, P., de Frutos, T., 1998. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. Circulation Research 83, 279–286.

Challah, M., Nadaud, S., Philippe, M., Battle, T., Soubrier, F., Corman, B., Michel, J.B., 1997. Circulating and cellular markers of endothelial dysfunction with aging in rats. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 273, H1941–H1948.

Chan, Y., Fish, J.E., D'Abreo, C., Lin, S., Robb, G.B., Teichert, A.-M., Karantzoulis-Fegaras, F., Keightley, A., Steer, B.M., Marsden, P.A., 2004. The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation. Journal of Biological Chemistry 279, 35087–35100.

Chandradevan, M., Simoh, S., Mediani, A., Ismail, I.S., Abas, F., 2020. 1H NMR-Based Metabolomics Approach in Investigating the Chemical Profile, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Gynura procumbens and Cleome gynandra. Plant Foods Hum Nutr 75, 243–251. https://doi.org/10.1007/s11130-020-00805-3

Chao, E.C., Henry, R.R., 2010. SGLT2 inhibition—a novel strategy for diabetes treatment. Nature reviews drug discovery 9, 551–559.

Chatterjee, A., Catravas, J.D., 2008. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. Vascular Pharmacology, Includes Special Issue Section: Recent Advances on the Role of the Endothelium in Pulmonary Function and Disease 49, 134–140. https://doi.org/10.1016/j.vph.2008.06.008

Chaves, O.S., Teles, Y.C.F., Monteiro, M.M. de O., Mendes Junior, L.D.G., Agra, M.D.F., Braga, V.D.A., Silva, T.M.S., Souza, M.D.F.V. de, 2017. Alkaloids and Phenolic Compounds from Sida rhombifolia L. (Malvaceae) and Vasorelaxant Activity of Two Indoquinoline Alkaloids. Molecules 22, 94. https://doi.org/10.3390/molecules22010094

Chen, G., Suzuki, H., Weston, A.H., 1988. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. British journal of pharmacology 95, 1165–1174.

Chen, J., Williams, S., Ho, S., Loraine, H., Hagan, D., Whaley, J.M., Feder, J.N., 2010. Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT2 gene and related family members. Diabetes Therapy 1, 57–92.

Cheng, Y., Austin, S.C., Rocca, B., Koller, B.H., Coffman, T.M., Grosser, T., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A., 2002a. Role of Prostacyclin in the Cardiovascular Response to Thromboxane A2. Science 296, 539–541. https://doi.org/10.1126/science.1068711

Cheng, Y., Austin, S.C., Rocca, B., Koller, B.H., Coffman, T.M., Grosser, T., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A., 2002b. Role of Prostacyclin in the Cardiovascular Response to Thromboxane A2. Science 296, 539–541. https://doi.org/10.1126/science.1068711

Chlopicki, S., Gryglewski, R.J., 2004. Endothelial Secretory Function and Atherothrombosis, in: The Eicosanoids. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 267–276. https://doi.org/10.1002/0470020628.ch23

Christ, A., Temmerman, L., Legein, B., Daemen, M.J., Biessen, E.A., 2013. Dendritic cells in cardiovascular diseases: epiphenomenon, contributor, or therapeutic opportunity. Circulation 128, 2603–2613.

Chukwuma, C.I., Matsabisa, M.G., Ibrahim, M.A., Erukainure, O.L., Chabalala, M.H., Islam, Md.S., 2019. Medicinal plants with concomitant anti-diabetic and anti-hypertensive effects as potential sources of dual acting therapies against diabetes and hypertension: A review. Journal of Ethnopharmacology 235, 329–360. https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.024

Cipollone, F., Rocca, B., Patrono, C., 2004. Cyclooxygenase-2 expression and inhibition in atherothrombosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 24, 246–255.

Ciumărnean, L., Milaciu, M.V., Runcan, O., Vesa, Ștefan C., Răchișan, A.L., Negrean, V., Perné, M.-G., Donca, V.I., Alexescu, T.-G., Para, I., Dogaru, G., 2020. The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases. Molecules 25, 4320. https://doi.org/10.3390/molecules25184320

Clark, J.L., Zahradka, P., Taylor, C.G., 2015. Efficacy of flavonoids in the management of high blood pressure. Nutrition Reviews 73, 799–822. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv048

Clarys, P., Deliens, T., Huybrechts, I., Deriemaeker, P., Vanaelst, B., De Keyzer, W., Hebbelinck, M., Mullie, P., 2014. Comparison of Nutritional Quality of the Vegan, Vegetarian, Semi-Vegetarian, Pesco-Vegetarian and Omnivorous Diet. Nutrients 6, 1318–1332. https://doi.org/10.3390/nu6031318

Coleman, R.A., 1994. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. Pharmacol Rev 46, 205–229.

Cowley a. W., Miller J. P., Guyton a. C., 1971. Open-Loop Analysis of the Renin-Angiotensin System in the Dog. Circulation Research 28, 568–581. https://doi.org/10.1161/01.RES.28.5.568

Cranston, W.I., Juel-Jensen, B.E., 1962. The effects of spironolactone and chlorthalidone on arterial pressure. The Lancet 279, 1161–1164.

Crowley, S., Zhang, J., Herrera, M., Griffiths, R., Ruiz, P., Coffman, T., 2011. Role of AT(1) receptor-mediated salt retention in angiotensin II-dependent hypertension. American journal of physiology. Renal physiology 301, F1124-30. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00305.2011

Crowley, S.D., Frey, C.W., Gould, S.K., Griffiths, R., Ruiz, P., Burchette, J.L., Howell, D.N., Makhanova, N., Yan, M., Kim, H.-S., Tharaux, P.-L., Coffman, T.M., 2008. Stimulation of

lymphocyte responses by angiotensin II promotes kidney injury in hypertension. American Journal of Physiology-Renal Physiology 295, F515–F524. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00527.2007

Crowley, S.D., Gurley, S.B., Herrera, M.J., Ruiz, P., Griffiths, R., Kumar, A.P., Kim, H.-S., Smithies, O., Le, T.H., Coffman, T.M., 2006. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. PNAS 103, 17985–17990. https://doi.org/10.1073/pnas.0605545103

Csiszar, A., Ungvari, Z., Edwards, J.G., Kaminski, P., Wolin, M.S., Koller, A., Kaley, G., 2002. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. Circulation research 90, 1159–1166.

Dal-Ros, S., Bronner, C., Auger, C., Schini-Kerth, V.B., 2012a. Red wine polyphenols improve an established aging-related endothelial dysfunction in the mesenteric artery of middle-aged rats: Role of oxidative stress. Biochemical and Biophysical Research Communications 419, 381–387. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.031

Dal-Ros, S., Bronner, C., Auger, C., Schini-Kerth, V.B., 2012b. Red wine polyphenols improve an established aging-related endothelial dysfunction in the mesenteric artery of middle-aged rats: Role of oxidative stress. Biochemical and Biophysical Research Communications 419, 381–387. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.031

Dal-Ros, S., Bronner, C., Auger, C., Schini-Kerth, V.B., 2012c. Red wine polyphenols improve an established aging-related endothelial dysfunction in the mesenteric artery of middle-aged rats: role of oxidative stress. Biochemical and biophysical research communications 419, 381–387.

Dal-Ros, S., Zoll, J., Lang, A.-L., Auger, C., Keller, N., Bronner, C., Geny, B., Schini-Kerth, V.B., 2011. Chronic intake of red wine polyphenols by young rats prevents aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance: Role of NADPH oxidase. Biochemical and Biophysical Research Communications 404, 743–749. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.060

Dalziel, J.M., 1937. The useful plants of West Tropical Africa. The useful plants of West Tropical Africa.

Dangles, O., 2020. Le potentiel antioxydant des aliments : mythes et réalités. Cahiers de Nutrition et de Diététique 55, 176–183. https://doi.org/10.1016/j.cnd.2020.06.001

Dansi, A., Vodouhè, R., Azokpota, P., Yedomonhan, H., Assogba, P., Adjatin, A., Loko, Y.L., Dossou-Aminon, I., Akpagana, K., 2012. Diversity of the neglected and underutilized crop species of importance in Benin. The scientific world journal 2012.

Davis, M.E., Cai, H., Drummond, G.R., Harrison, D.G., 2001. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. Circulation research 89, 1073–1080.

De Mey, J.G., Vanhoutte, P.M., 1983. Anoxia and endothelium-dependent reactivity of the canine femoral artery. J. Physiol. 10.

De Mey, J.G., Vanhoutte, P.M., 1982. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. Circ Res 51, 439–447. https://doi.org/10.1161/01.RES.51.4.439

De Miguel, C., Rudemiller, N.P., Abais, J.M., Mattson, D.L., 2015. Inflammation and Hypertension: New Understandings and Potential Therapeutic Targets. Curr Hypertens Rep 17, 507. https://doi.org/10.1007/s11906-014-0507-z

Delgado-Lista, J., Perez-Martinez, P., Lopez-Miranda, J., Perez-Jimenez, F., 2012. Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a systematic review. British Journal of Nutrition 107, S201–S213. https://doi.org/10.1017/S0007114512001596

DeMartino, A.W., Kim-Shapiro, D.B., Patel, R.P., Gladwin, M.T., 2019. Nitrite and nitrate chemical biology and signalling. British Journal of Pharmacology 176, 228–245. https://doi.org/10.1111/bph.14484

Desormais, I., Amidou, S.A., Houehanou, Y.C., Houinato, S.D., Gbagouidi, G.N., Preux, P.M., Aboyans, V., Lacroix, P., 2019. The prevalence, awareness, management and control of hypertension in men and women in Benin, West Africa: the TAHES study. BMC Cardiovascular Disorders 19, 303. https://doi.org/10.1186/s12872-019-01273-7

Dey, T.B., Chakraborty, S., Jain, K.K., Sharma, A., Kuhad, R.C., 2016. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. Trends in Food Science & Technology 53, 60–74.

Diebolt, M., Bucher Bernard, Andriantsitohaina Ramaroson, 2001. Wine Polyphenols Decrease Blood Pressure, Improve NO Vasodilatation, and Induce Gene Expression. Hypertension 38, 159–165. https://doi.org/10.1161/01.HYP.38.2.159

Donato, A.J., Machin, D.R., Lesniewski, L.A., 2018. Mechanisms of dysfunction in the aging vasculature and role in age-related disease. Circulation Research 123, 825–848.

Dossou-Yovo, K.M., Diallo, A., Lawson-Evi, P., Darré, T., Bakoma, B., Eklu-Gadégbéku, K., 2020. Cytotoxicity, Acute, and Subacute Study of Hydroalcoholic Root Extract of Carissa spinarum L. on Wistar Rats. Journal of Medicinal Food. https://doi.org/10.1089/jmf.2020.0065

Dossou-Yovo, K.M., Diallo, A., Lawson-Evi, P., Kantati, Y.T., Darré, T., Bakoma, B., Eklu-Gadégbéku, K., 2021. A 90-Day Oral Toxicity of Hydroethanolic Root Extract of Carissa spinarum in Wistar Rats. Journal of Toxicology 2021, e5570206. https://doi.org/10.1155/2021/5570206

Dudzinski, D.M., Michel, T., 2007. Life history of eNOS: Partners and pathways. Cardiovascular Research 75, 247–260. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.03.023

Duncan, A.C., Jäger, A.K., van Staden, J., 1999. Screening of Zulu medicinal plants for angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. Journal of Ethnopharmacology 68, 63–70. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00097-5

During, A., Larondelle, Y., 2013. The O-methylation of chrysin markedly improves its intestinal anti-inflammatory properties: Structure–activity relationships of flavones. Biochemical Pharmacology 86, 1739–1746. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.10.003

Eble, J., Niland, S., 2009. The Extracellular Matrix of Blood Vessels. CPD 15, 1385–1400. https://doi.org/10.2174/138161209787846757

Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.-L., Jouad, H., 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). Journal of Ethnopharmacology 82, 97–103. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00164-2

Egashira, K., Inou, T., Hirooka, Y., Kai, H., Sugimachi, M., Suzuki, S., Kuga, T., Urabe, Y., Takeshita, A., 1993. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. Circulation 88, 77–81.

Eguchi Satoru, Kawai Tatsuo, Scalia Rosario, Rizzo Victor, 2018. Understanding Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling in Vascular Pathophysiology. Hypertension 71, 804–810. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10266

El Assar De La Fuente, M., Angulo Frutos, J., Vallejo Fernán, S., Peiró Vallejo, C., Sánchez-Ferrer, C.F., Rodríguez-Mañas, L., 2012. Mechanisms Involved in the Aging-Induced Vascular Dysfunction. Front. Physiol. 3. https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00132

El Assar, M., Angulo, J., Rodríguez-Mañas, L., 2013. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. Free Radical Biology and Medicine 65, 380–401. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.003

El-Fiky, F.K., Abou-Karam, M.A., Afify, E.A., 1996. Effect of Luffa aegyptiaca (seeds) and Carissa edulis (leaves) extracts on blood glucose level of normal and streptozotocin diabetic rats. J Ethnopharmacol 50, 43–47. https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01324-5

Enns, J.E., Yeganeh, A., Zarychanski, R., Abou-Setta, A.M., Friesen, C., Zahradka, P., Taylor, C.G., 2014. The impact of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the incidence of cardiovascular events and complications in peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis. BMC Cardiovasc Disord 14, 70. https://doi.org/10.1186/1471-2261-14-70

Essiett, U.A., Bala, D.N., Agbakahi, J.A., 2010. Pharmacognostic studies of the leaves and stem of Diodia scandens Sw in Nigeria. Archives of Applied Science Research 2, 184–198.

Fanta Yadang, S.A., Taiwe Sotoing, G., Ngatcha Zouakeu, K.S., Khan, M.A., Agbor, G.A., Ur-Rahman, N., Ngo Bum, E., 2019. Quantification of Bioactive Compounds and Evaluation of the Antioxidant Activity of *Carissa edulis* Valh (Apocynaceae) Leaves. The Scientific World Journal 2019, 1–9. https://doi.org/10.1155/2019/7549620

Farooq, M.A., Gaertner, S., Amoura, L., Niazi, Z.R., Park, S.-H., Qureshi, A.W., Oak, M.-H., Toti, F., Schini-Kerth, V.B., Auger, C., 2020. Intake of omega-3 formulation EPA:DHA 6:1 by old rats for 2 weeks improved endothelium-dependent relaxations and normalized the expression level of ACE/AT1R/NADPH oxidase and the formation of ROS in the mesenteric artery. Biochemical Pharmacology, Natural Products and the Hallmarks of Chronic Diseases 173, 113749. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113749

Félétou, M., Köhler, R., Vanhoutte, P.M., 2012. Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. Annals of Medicine 44, 694–716. https://doi.org/10.3109/07853890.2011.585658

Félétou, M., Vanhoutte, P.M., 2009. EDHF: an update. Clinical science 117, 139–155.

Ferreira, A.J., Murça, T.M., Fraga-Silva, R.A., Castro, C.H., Raizada, M.K., Santos, R.A., 2012. New cardiovascular and pulmonary therapeutic strategies based on the Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1–7)/MAS receptor axis. International Journal of Hypertension 2012.

Filippini, T., Violi, F., D'Amico, R., Vinceti, M., 2017. The effect of potassium supplementation on blood pressure in hypertensive subjects: A systematic review and meta-analysis. International Journal of Cardiology 230, 127–135. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.12.048

Fleming, I., Busse, R., 1999. Signal transduction of eNOS activation. Cardiovascular research 43, 532–541.

Folkow, B., Svanborg, A., 1993. Physiology of cardiovascular aging. Physiological Reviews 73, 725–764. https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.4.725

Förstermann, U., 2010. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology 459, 923–939.

Fournie-Zaluski, M.-C., Fassot, C., Valentin, B., Djordjijevic, D., Goazigo, A.R.-L., Corvol, P., Roques, B.P., Llorens-Cortes, C., 2004. Brain renin-angiotensin system blockade by systemically active aminopeptidase A inhibitors: A potential treatment of salt-dependent hypertension. PNAS 101, 7775–7780. https://doi.org/10.1073/pnas.0402312101

Fowsiya, J., Madhumitha, G., 2017. Preliminary phytochemical analysis, Antioxidant and cytotoxicity test ofCarissa edulisVahl dried fruits. IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 263, 022018. https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/2/022018

Fukutomi, M., Kario, K., 2010. Aging and hypertension. Expert Review of Cardiovascular Therapy 8, 1531–1539. https://doi.org/10.1586/erc.10.78

Furchgott, R.F., Vanhoutte, P.M., 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. The FASEB Journal 3, 2007–2018.

Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. nature 288, 373–376.

Fusi, F., Trezza, A., Tramaglino, M., Sgaragli, G., Saponara, S., Spiga, O., 2020. The beneficial health effects of flavonoids on the cardiovascular system: Focus on K+ channels. Pharmacological Research 152, 104625. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104625

Gao, Y., 2010. The multiple actions of NO. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology 459, 829–839.

Garland, C.J., Dora, K.A., 2017. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. Acta Physiol 219, 152–161. https://doi.org/10.1111/apha.12649

Garland, C.J., Hiley, C.R., Dora, K.A., 2011. EDHF: spreading the influence of the endothelium. British journal of pharmacology 164, 839–852.

Gechev, T.S., Hille, J., Woerdenbag, H.J., Benina, M., Mehterov, N., Toneva, V., Fernie, A.R., Mueller-Roeber, B., 2014. Natural products from resurrection plants: Potential for medical applications. Biotechnology Advances 32, 1091–1101.

Ghiadoni, L., Taddei, S., Agostino, V., Sudano, I., Di Legge, V., Meola, M., Di Venanzio, L., Salvetti, A., 1998. Endothelial Function and Common Carotid Artery Wall Thickening in Patients With Essential Hypertension. Hypertension 32, 25–32. https://doi.org/10.1161/01.HYP.32.1.25

Ghogare, U.R., Nirmal, S.A., Patil, R.Y., Kharya, M.D., 2009. Antinociceptive activity of Gynandropsis gynandra leaves. Natural Product Research 23, 327–333. https://doi.org/10.1080/14786410802047862

Gimbrone, M.A., 1980. Endothelial Dysfunction and the Pathogenesis of Atherosclerosis, in: Gotto, A.M., Smith, L.C., Allen, B. (Eds.), Atherosclerosis V. Springer US, New York, NY, pp. 415–425. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-6071-4_84

Gokce, N., Holbrook, M., Duffy, S.J., Demissie, S., Cupples, L.A., Biegelsen, E., Keaney Jr, J.F., Loscalzo, J., Vita, J.A., 2001. Effects of race and hypertension on flow-mediated and nitroglycerin-mediated dilation of the brachial artery. Hypertension 38, 1349–1354.

Gonzalez, M.A., Selwyn, A.P., 2003. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. The American journal of medicine 115, 99–106.

Goraya, N., Simoni, J., Jo, C., Wesson, D.E., 2012. Dietary acid reduction with fruits and vegetables or bicarbonate attenuates kidney injury in patients with a moderately reduced glomerular filtration rate due to hypertensive nephropathy. Kidney International 81, 86–93. https://doi.org/10.1038/ki.2011.313

Goto, K., Fujii, K., Onaka, U., Abe, I., Fujishima, M., 2000a. Renin-Angiotensin System Blockade Improves Endothelial Dysfunction in Hypertension. Hypertension 36, 575–580. https://doi.org/10.1161/01.HYP.36.4.575

Goto, K., Fujii, K., Onaka, U., Abe, I., Fujishima, M., 2000b. Angiotensin-converting enzyme inhibitor prevents age-related endothelial dysfunction. Hypertension 36, 581–587.

Goto, K., Ohtsubo, T., Kitazono, T., 2018. Endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) in hypertension: the role of endothelial ion channels. International Journal of Molecular Sciences 19, 315.

Grover-Páez, F., Zavalza-Gómez, A.B., 2009. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. Diabetes Research and Clinical Practice 84, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.12.013

Gryglewski, R.J., Palmer, R.M.J., Moncada, S., 1986. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. Nature 320, 454–456.

Guimaraes Cunha, P., Boutouyrie, P., M Nilsson, P., Laurent, S., 2017. Early Vascular Ageing (EVA): Definitions and Clinical Applicability. Current Hypertension Reviews 13, 8–15. https://doi.org/10.2174/1573402113666170413094319

Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular aspects of Medicine 27, 1–93.

Guzik, T.J., Hoch, N.E., Brown, K.A., McCann, L.A., Rahman, A., Dikalov, S., Goronzy, J., Weyand, C., Harrison, D.G., 2007. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II–induced hypertension and vascular dysfunction. Journal of Experimental Medicine 204, 2449–2460. https://doi.org/10.1084/jem.20070657

H Jorum, O., M Piero, N., 2016. Haematological Effects of Dichloromethane-Methanolic Leaf Extracts of Carissa edulis (Forssk.) Vahl in Normal Rat Models. J Hematol Thrombo Dis 04. https://doi.org/10.4172/2329-8790.1000232

Hamilton, C.A., Brosnan, M.J., McIntyre, M., Graham, D., Dominiczak, A.F., 2001. Superoxide Excess in Hypertension and Aging. Hypertension 37, 529–534. https://doi.org/10.1161/01.HYP.37.2.529

Hano, C., Tungmunnithum, D., 2020. Plant Polyphenols, More than Just Simple Natural Antioxidants: Oxidative Stress, Aging and Age-Related Diseases. Medicines 7, 26. https://doi.org/10.3390/medicines7050026

Harrison, D.G., Cai, H., Landmesser, U., Griendling, K.K., 2003. Interactions of angiotensin II with NAD (P) H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS 4, 51–61.

Hatake, K., Kakishita, E., Wakabayashi, I., Sakiyama, N., Hishida, S., 1990. Effect of aging on endothelium-dependent vascular relaxation of isolated human basilar artery to thrombin and bradykinin. Stroke 21, 1039–1043. https://doi.org/10.1161/01.STR.21.7.1039

Hegde, K., Joshi, A.B., 2010. Hepatoprotective and antioxidant effect of Carissa spinarum root extract against CCl4 and paracetamol-induced hepatic damage in rats. Bangladesh J Pharmacol 5, 73–76. https://doi.org/10.3329/bjp.v5i1.5681

Higashi, Y., Kihara, Y., Noma, K., 2012. Endothelial dysfunction and hypertension in aging. Hypertension Research 35, 1039–1047. https://doi.org/10.1038/hr.2012.138

Higashi, Y., Yoshizumi, M., 2004. Exercise and endothelial function: Role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. Pharmacology & Therapeutics 102, 87–96. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.02.003

Hirata, T., Narumiya, S., 2011. Prostanoid receptors. Chemical reviews 111, 6209–6230.

Houinato, D.S., Gbary, A.R., Houehanou, Y.C., Djrolo, F., Amoussou, M., Segnon-Agueh, J., Kpozehouen, A., Salamon, R., 2012. Prevalence of hypertension and associated risk factors in Benin. Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique 60, 95–102. https://doi.org/10.1016/j.respe.2011.09.010

Houngbeme, A.G., Gandonou, C., Yehouenou, B., Kpoviessi, S.D.S., Sohounhloue, D., Moudachirou, M., Gbaguidi, F.A., 2014. Phytochemical analysis, toxicity and antibacterial activity of Benin medicinal plants extracts used in the treatment of sexually transmitted infections associated with HIV/AIDS. IJPSR 5, 1739-1745.

Houssou, A.A., Yanogo, P.K., Kabor&e, J., Bokossa, A., Sawadogo, B., Antara, S., Houinato, D., Meda, N., 2020. Hypertension and associated factors in Atlantic region of Benin in 2015: A community-based study. Journal of Public Health and Epidemiology 12, 1–7.

Huang, P.L., 2009. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. Trends in Endocrinology & Metabolism 20, 295–302. https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.03.005

Hutchinson, J., Dalziel, J.M., Hepper, F.N., 1963. Flora of West Tropical Africa. Volume II. Flora of West Tropical Africa. Volume II.

Hynynen, M.M., Khalil, R.A., 2006. The Vascular Endothelin System in Hypertension - Recent Patents and Discoveries. Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery 1, 95–108. https://doi.org/10.2174/157489006775244263

Ibrahim, H., Abdulrahman, E.M., Shok, M., Ilyas, N., Musa, K.Y., Ukandu, I., 2007. Comparative analgesic activity of the root bark, stem bark, leaves, fruits and seeds of Carissa edulis VAHL (Apocynaceae). African Journal of Biotechnology 6, 1233–1235.

Ibrahim, H., Bolaji, R.O., Abdurahman, E., Shok, M., Ilyas, N., Habib, A., 2005. Preliminary phytochemical and antimicrobial studies of the leaves of Carissa edulis VAHL. Chem. Class J. 2, 15–18.

Ibrahim, H., Oyi, R.A., Ehinmidu, J.O., Musa, K.Y., Bright, N.T., 2010. Antimicrobial activity of the water extracts of the leaves and fruits of Carissa edulis Vahl (Apocynaceae). Journal of Medicinal Plants Research 4, 1028–1032.

Idris-Khodja, N., Schini-Kerth, V., 2012. Thymoquinone improves aging-related endothelial dysfunction in the rat mesenteric artery. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 385, 749–758. https://doi.org/10.1007/s00210-012-0749-8

Igreja, B., Pires, N.M., Bonifácio, M.J., Loureiro, A.I., Fernandes-Lopes, C., Wright, L.C., Soares-da-Silva, P., 2015. Blood pressure-decreasing effect of etamicastat alone and in combination with antihypertensive drugs in the spontaneously hypertensive rat. Hypertens Res 38, 30–38. https://doi.org/10.1038/hr.2014.143

Imanirampa, L., Alele, P.E., 2016. Antifungal activity of Cleome gynandra L. aerial parts for topical treatment of Tinea capitis: an in vitro evaluation. BMC Complement Altern Med 16, 194. https://doi.org/10.1186/s12906-016-1187-9

Imaoka, Y., Osanai, T., Kamada, T., Mio, Y., Satoh, K., Okumura, K., 1999. Nitric Oxide-Dependent Vasodilator Mechanism is Not Impaired by Hypertension But is Diminished with Aging in the Rat Aorta. Journal of Cardiovascular Pharmacology 33, 756–761.

Intengan, H.D., Schiffrin, E.L., 2001. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. Hypertension 38, 581–587.

Iwai, M., Horiuchi, M., 2009. Devil and angel in the renin–angiotensin system: ACE–angiotensin II–AT 1 receptor axis vs . ACE2–angiotensin-(1–7)–Mas receptor axis. Hypertension Research 32, 533–536. https://doi.org/10.1038/hr.2009.74

Jagadeeshwar Rao, R., Sampath Kumar, U., Venkat Reddy, S., Tiwari, A.K., Madhusudana Rao, J., 2005. Antioxidants and a new germacrane sesquiterpene from *Carissa spinarum*. Natural Product Research 19, 763–769. https://doi.org/10.1080/14786410512331330648

Janardhan, B., Shrikanth, V.M., Mirajkar, K.K., More, S.S., 2015. In vitro Anti-Snake Venom Properties of Carisssa spinarum Linn Leaf Extracts. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants 21, 283–293. https://doi.org/10.1080/10496475.2014.961627

Jang, I.-A., Kim, E.N., Lim, J.H., Kim, M.Y., Ban, T.H., Yoon, H.E., Park, C.W., Chang, Y.S., Choi, B.S., 2018. Effects of Resveratrol on the Renin-Angiotensin System in the Aging Kidney. Nutrients 10, 1741. https://doi.org/10.3390/nu10111741

Jankowski, V., Vanholder, R., van der Giet, M., Tölle, M., Karadogan, S., Gobom, J., Furkert, J., Oksche, A., Krause, E., Anh Tran, T.N., 2007. Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 27, 297–302.

Jeansen, S., Witkamp, R.F., Garthoff, J.A., van Helvoort, A., Calder, P.C., 2018. Fish oil LC-PUFAs do not affect blood coagulation parameters and bleeding manifestations: Analysis of 8 clinical studies with selected patient groups on omega-3-enriched medical nutrition. Clinical Nutrition 37, 948–957. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.03.027

Jin, X., Yi, L., Chen, M., Chen, C., Chang, H., Zhang, T., Wang, L., Zhu, J., Zhang, Q., Mi, M., 2013. Delphinidin-3-Glucoside Protects against Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Mitochondrial Dysfunction in Vascular Endothelial Cells via the Sodium-Dependent Glucose Transporter SGLT1. PLOS ONE 8, e68617. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068617

Joshi, S., Ettinger, L., Liebman, S.E., 2020. Plant-Based Diets and Hypertension. American Journal of Lifestyle Medicine 14, 397–405. https://doi.org/10.1177/1559827619875411

Joyner, M.J., Dietz, N.M., 1997. Nitric oxide and vasodilation in human limbs. Journal of Applied Physiology 83, 1785–1796. https://doi.org/10.1152/jappl.1997.83.6.1785

Kansui, Y., Fujii, K., Goto, K., Abe, I., Iida, M., 2002. Angiotensin II receptor antagonist improves age-related endothelial dysfunction. Journal of hypertension 20, 439–446.

Kario, K., Tamaki, Y., Okino, N., Gotou, H., Zhu, M., Zhang, J., 2016. LCZ696, a First-in-Class Angiotensin Receptor-Neprilysin Inhibitor: The First Clinical Experience in Patients With Severe Hypertension. The Journal of Clinical Hypertension 18, 308–314. https://doi.org/10.1111/jch.12667

Kartinah, N.T., Fadilah, F., Ibrahim, E.I., Suryati, Y., 2019. The Potential of Hibiscus sabdariffa Linn in Inducing Glucagon-Like Peptide-1 via SGLT-1 and GLPR in DM Rats. BioMed Research International 2019, e8724824. https://doi.org/10.1155/2019/8724824

Kaunda, J.S., Qin, X.-J., Yang, X.-Z., Mwitari, P.G., Zhu, H.-T., Wang, D., Zhang, Y.-J., 2020. Ten new glycosides, carissaedulosides A–J from the root barks of Carissa edulis and their cytotoxicities. Bioorganic Chemistry 102, 104097.

Kaunda, J.S., Zhang, Y.-J., 2017. The Genus Carissa: An Ethnopharmacological, Phytochemical and Pharmacological Review. Nat. Prod. Bioprospect. 7, 181–199. https://doi.org/10.1007/s13659-017-0123-0

Kebamo, S., 2015. Evaluation of Diuretic Activity of Different Solvent Fractions of Methanol Extract of Carissa edulis Root Bark in Rats. Med chem 5. https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000304

Kebenei, J.S., Ndalut, P.K., Sabah, A.O., 2011. Anti-plasmodial activity of Nortrachelogenin from the root bark of Carissa edulis (Vahl). International Journal of Applied Research in Natural Products 4, 1–5.

Khodja, N.I., Chataigneau, T., Auger, C., Schini-Kerth, V.B., 2012. Grape-Derived Polyphenols Improve Aging-Related Endothelial Dysfunction in Rat Mesenteric Artery: Role of Oxidative Stress and the Angiotensin System. PLOS ONE 7, e32039. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032039

Khurana, S., Venkataraman, K., Hollingsworth, A., Piche, M., Tai, T.C., 2013. Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging. Nutrients 5, 3779–3827. https://doi.org/10.3390/nu5103779

Kigen, G., Kamuren, Z., Njiru, E., Wanjohi, B., Kipkore, W., 2019. Ethnomedical Survey of the Plants Used by Traditional Healers in Narok County, Kenya. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2019, e8976937. https://doi.org/10.1155/2019/8976937

Kigen, G.K., Ronoh, H.K., Kipkore, W.K., Rotich, J.K., 2013. Current trends of traditional herbal medicine practice in Kenya: a review. African Journal of Pharmacology and Therapeutics 2.

Kipkore, W., Wanjohi, B., Rono, H., Kigen, G., 2014. A study of the medicinal plants used by the Marakwet Community in Kenya. Journal of ethnobiology and ethnomedicine 10, 1–22.

Kirabo, A., Fontana, V., Davies, S., Roberts, L.J., de Faria, A., Galindo, C., Wu, J., Bikineyeva, A., Dikalov, S., Loperena, R., 2014. Dendritic cell superoxide and isoketals activate T cells and promote angiotensin II hypertension (1153.2). The FASEB Journal 28, 1153–2.

Kirkwood, T.B.L., Kowald, A., 2012. The free-radical theory of ageing – older, wiser and still alive. BioEssays 34, 692–700. https://doi.org/10.1002/bies.201200014

Klein, B.G., 2013. Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology-E-Book. Elsevier Health Sciences.

Kowalczyk, A., Kleniewska, P., Kolodziejczyk, M., Skibska, B., Goraca, A., 2015. The Role of Endothelin-1 and Endothelin Receptor Antagonists in Inflammatory Response and Sepsis. Arch. Immunol. Ther. Exp. 63, 41–52. https://doi.org/10.1007/s00005-014-0310-1

Kuebler, W.M., Bonnet, S., Tabuchi, A., 2018. Inflammation and autoimmunity in pulmonary hypertension: is there a role for endothelial adhesion molecules? (2017 Grover Conference Series). Pulm Circ 8, 2045893218757596. https://doi.org/10.1177/2045893218757596

Kukovetz, W., Holzmann, S., Wurm, A., Pöch, G., 1979. Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries. Journal of cyclic nucleotide research 5, 469–476.

Kuriyama, H., Kitamura, K., Itoh, T., Inoue, R., 1998. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. Physiological Reviews 78, 811–920.

Kwarteng, A.O., Abogoom, J., Amoah, R.A., Nyadanu, D., Ghunney, T., Nyam, K.C., Ziyaaba, J.Z., Danso, E.O., Asiedu, D.D., Whyte, T., 2018. Current knowledge and breeding perspectives for the spider plant (Cleome gynandra L.): a potential for enhanced breeding of the plant in Africa. Genetic Resources and Crop Evolution 65, 1529–1550.

Laavola, M., Leppänen, T., Eräsalo, H., Hämäläinen, M., Nieminen, R., Moilanen, E., 2017. Anti-inflammatory effects of nortrachelogenin in murine J774 macrophages and in carrageenan-induced paw edema model in the mouse.

Lakatta, E.G., 2015. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? Journal of molecular and cellular cardiology 83, 1–13.

Lakatta, E.G., 2007. Central arterial aging and the epidemic of systolic hypertension and atherosclerosis. Journal of the American Society of Hypertension 1, 302–340. https://doi.org/10.1016/j.jash.2007.05.001

Landmesser, U., Harrison, D.G., 2001. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. Coronary artery disease 12, 455–461.

Laurent, S., Cockcroft, J., Van Bortel, L., Boutouyrie, P., Giannattasio, C., Hayoz, D., Pannier, B., Vlachopoulos, C., Wilkinson, I., Struijker-Boudier, H., 2007. Abridged version of the expert consensus document on arterial stiffness. Artery Research 1, 2–12. https://doi.org/10.1016/j.artres.2007.03.003

Le Cras, T.D., Xue, C., Rengasamy, A., Johns, R.A., 1996. Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 270, L164–L170.

Lee, J.-O., Oak, M.-H., Jung, S.H., Park, D.H., Auger, C., Kim, K.R., Lee, S.-W., Schini-Kerth, V.B., 2011. An ethanolic extract of Lindera obtusiloba stems causes NO-mediated endothelium-dependent relaxations in rat aortic rings and prevents angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 383, 635. https://doi.org/10.1007/s00210-011-0643-9

Leikert, J.F., Räthel, T.R., Wohlfart, P., Cheynier, V., Vollmar, A.M., Dirsch, V.M., 2002. Red Wine Polyphenols Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Subsequent Nitric Oxide Release From Endothelial Cells. Circulation 106, 1614–1617. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000034445.31543.43

Lemarié, C.A., Schiffrin, E.L., 2010. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 11, 19–31. https://doi.org/10.1177/1470320309347785

Leonard, O.P., Robert, S.S., Hoseah, A.M., Charles, M., Chepkorir, R., Ngoci, N.S., 2016. Phytochemical Characterization and Cytotoxicity of Carissa edulis, Azadirachta indica, Cassia siamea and Harrisonia abyssinica from Masumbi Village, Siaya County-Kenya. Journal of Scientific Research and Reports 1–10. https://doi.org/10.9734/JSRR/2016/23819

Leong, X.-F., Ng, C.-Y., Jaarin, K., 2015. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. BioMed Research International 2015, e528757. https://doi.org/10.1155/2015/528757

Lerman, A., Zeiher, A.M., 2005. Endothelial function: cardiac events. Circulation 111, 363–368.

Lerman, L.O., Chade, A.R., Sica, V., Napoli, C., 2005. Animal models of hypertension: An overview. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 146, 160–173. https://doi.org/10.1016/j.lab.2005.05.005

Lerman, L.O., Kurth, T.W., Touyz, R.M., Ellison, D.H., Chade, A., Crowley, S.D., Mattson, D.L., Mullins, J.J., Osborn, J., Eirin, A., Reckelhoff, J.F., Costantino, I., Coffman, T.M., null null, 2019. Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. Hypertension 73, e87–e120. https://doi.org/10.1161/HYP.0000000000000090

Leung, S.W.S., Vanhoutte, P.M., 2017. Endothelium-dependent hyperpolarization: age, gender and blood pressure, do they matter? Acta physiologica 219, 108–123.

Leverve, X., 2009. Stress oxydant et antioxydants? Cahiers de Nutrition et de Diététique 44, 219–224.

Li, Y., Li, Q.-Y., Ling, Q.-L., So, S.-P., Ruan, K.-H., 2019. A novel single-chain enzyme complex with chain reaction properties rapidly producing thromboxane A2 and exhibiting powerful anti-bleeding functions. Journal of Cellular and Molecular Medicine 23, 8343–8354. https://doi.org/10.1111/jcmm.14711

Lim, T.K., 2012a. Carissa spinarum, in: Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 240–246. https://doi.org/10.1007/978-90-481-8661-7_35

Lim, T.K., 2012b. Carissa spinarum, in: Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 240–246. https://doi.org/10.1007/978-90-481-8661-7_35

Lin, H.Y., Lee, Y.T., Chan, Y.W., Tse, G., 2016. Animal models for the study of primary and secondary hypertension in humans (Review). Biomedical Reports 5, 653–659. https://doi.org/10.3892/br.2016.784

Lin, Y.-L., Lin, J.-K., 1997. (−)-Epigallocatechin-3-gallate Blocks the Induction of Nitric Oxide Synthase by Down-Regulating Lipopolysaccharide-Induced Activity of Transcription Factor Nuclear Factor-κB. Mol Pharmacol 52, 465–472. https://doi.org/10.1124/mol.52.3.465

Lincone, O.L., Mungai, M.P., Chege, B.M., Wangechi, M.A., George, S.C., Kayaja, W.D., 2019. Myorelaxant effect of aqueous root bark extract of Carissa edulis (Forssk.) Vahl. is mediated through activation of nitric oxide synthase.

Liu, Y., Zhang, Y., Muema, F.W., Kimutai, F., Chen, G., Guo, M., 2021. Phenolic Compounds from Carissa spinarum Are Characterized by Their Antioxidant, Anti-Inflammatory and Hepatoprotective Activities. Antioxidants 10, 652.

Liwa, A.C., 2015. Herbal and alternative medicine utilization in Tanzanian adults admitted with hypertension-related conditions (PhD Thesis). Weill Medical College of Cornell University.

Logan, A.G., 2011. Hypertension in aging patients. Expert Review of Cardiovascular Therapy 9, 113–120. https://doi.org/10.1586/erc.10.171

Louten, J., Boniface, K., de Waal Malefyt, R., 2009. Development and function of TH17 cells in health and disease. Journal of Allergy and Clinical Immunology 123, 1004–1011.

Lucci, P., Saurina, J., Núñez, O., 2017. Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. TrAC Trends in Analytical Chemistry 88, 1–24. https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.12.006

Lüscher, T.F., Boulanger, C.M., Dohi, Y., Yang, Z., 1992. Endothelium-derived contracting factors. Hypertension 19, 117–130. https://doi.org/10.1161/01.HYP.19.2.117

Lyons, D., Roy, S., Patel, M., Benjamin, N., Swift, C.G., 1997. Impaired Nitric Oxide-Mediated Vasodilatation and Total Body Nitric Oxide Production in Healthy Old Age. Clinical Science 93, 519–525. https://doi.org/10.1042/cs0930519

Maaliki, D., Shaito, A.A., Pintus, G., El-Yazbi, A., Eid, A.H., 2019. Flavonoids in hypertension: a brief review of the underlying mechanisms. Current Opinion in Pharmacology, Cardiovascular and renal 45, 57–65. https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.04.014

Macarthur, H., Westfall, T.C., Wilken, G.H., 2008. Oxidative stress attenuates NO-induced modulation of sympathetic neurotransmission in the mesenteric arterial bed of spontaneously hypertensive rats. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 294, H183–H189. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01040.2007

Mackraj, I., Ramesar, S., 2007. ACE inhibitor activity of nutritive plants in Kwa-Zulu Natal. The FASEB Journal 21, A1247–A1247. https://doi.org/10.1096/fasebj.21.6.A1247-c

Maguire, J.J., Davenport, A.P., 2015. Endothelin Receptors and Their Antagonists. Seminars in Nephrology, The Renal Endothelin System in Health and Disease 35, 125–136. https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2015.02.002

Magyar, K., Halmosi, R., Palfi, A., Feher, G., Czopf, L., Fulop, A., Battyany, I., Sumegi, B., Toth, K., Szabados, E., 2012. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. Clinical Hemorheology and Microcirculation 50, 179–187. https://doi.org/10.3233/CH-2011-1424

Maione, F., Cicala, C., Musciacco, G., De Feo, V., Amat, A.G., Ialenti, A., Mascolo, N., 2013a. Phenols, Alkaloids and Terpenes from Medicinal Plants with Antihypertensive and Vasorelaxant Activities. A Review of Natural Products as Leads to Potential Therapeutic Agents. Natural Product Communications 8, 1934578X1300800434. https://doi.org/10.1177/1934578X1300800434

Maione, F., Cicala, C., Musciacco, G., De Feo, V., Amat, A.G., Ialenti, A., Mascolo, N., 2013b. Phenols, Alkaloids and Terpenes from Medicinal Plants with Antihypertensive and Vasorelaxant Activities. A Review of Natural Products as Leads to Potential Therapeutic Agents. Natural Product Communications 8, 1934578X1300800434. https://doi.org/10.1177/1934578X1300800434

Makumbele, F.P., Taylor, M., Stander, M., Anyasi, T.A., Jideani, A.I.O., 2019. Polyphenolic and Physicochemical Properties of Simple-Spined Num-Num (Carissa edulis) Fruit Harvested at Ripe Stage of Maturation. Molecules 24, 2630. https://doi.org/10.3390/molecules24142630

Mama Cisse, I., Alassani, A., Adjobimey, M., Alpha, B.I.A., Mikponhoue, R., Hinsou, A.V., Ayelo, P., 2020. Prevalence and Factors Associated High Blood Pressure among Women at the Market of Dantokpa in Benin in 2017. Occupational Diseases and Environmental Medicine 8, 91–98. https://doi.org/10.4236/odem.2020.83007

Masi, S., Uliana, M., Virdis, A., 2019. Angiotensin II and vascular damage in hypertension: Role of oxidative stress and sympathetic activation. Vascular Pharmacology 115, 13–17. https://doi.org/10.1016/j.vph.2019.01.004

Matsumoto, T., Goulopoulou, S., Taguchi, K., Tostes, R.C., Kobayashi, T., 2015. Constrictor prostanoids and uridine adenosine tetraphosphate: vascular mediators and therapeutic targets in hypertension and diabetes. British Journal of Pharmacology 172, 3980–4001. https://doi.org/10.1111/bph.13205

Matsuo, H., Okamoto, R., Zaima, K., Hirasawa, Y., Ismail, I.S., Lajis, N.H., Morita, H., 2011. New vasorelaxant indole alkaloids, villocarines A–D from Uncaria villosa. Bioorganic & Medicinal Chemistry 19, 4075–4079. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.05.014

Matz, R.L., De Sotomayor, M.A., Schott, C., Stoclet, J.-C., Andriantsitohaina, R., 2000. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. British journal of pharmacology 131, 303–311.

McKinley, M.P., O'Loughlin, V.D., Bidle, T.S., 2016. Anatomy & physiology: an integrative approach, 2e ed. McGraw-Hill Education, New York, NY.

McMaster, W.G., Kirabo, K., Madhur, M.S., Harrison, D.G., 2015. Inflammation, Immunity, and Hypertensive End-Organ Damage. Circulation Research 116, 1022–1033. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303697

Medvedev, A.E., Samsonov, V.I., Fomin, V.M., 2006. Rational structure of blood vessels. J Appl Mech Tech Phys 47, 324–329. https://doi.org/10.1007/s10808-006-0059-3

Mendis, S., 2017. Global progress in prevention of cardiovascular disease. Cardiovasc Diagn Ther 7, S32–S38. https://doi.org/10.21037/cdt.2017.03.06

Mendis, S., Lindholm, L.H., Mancia, G., Whitworth, J., Alderman, M., Lim, S., Heagerty, T., 2007. World Health Organization (WHO) and International Society of Hypertension (ISH) risk prediction charts: assessment of cardiovascular risk for prevention and control of cardiovascular disease in low and middle-income countries. Journal of Hypertension 25, 1578–1582. https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3282861fd3

Messerli, FranzH., Ventura, HectorO., Glade, LouisB., Sundgaard-Riise, K., Dunn, FrancisG., Frohlich, EdwardD., 1983. ESSENTIAL HYPERTENSION IN THE ELDERLY: HAEMODYNAMICS, INTRAVASCULAR VOLUME, PLASMA RENIN ACTIVITY, AND CIRCULATING CATECHOLAMINE LEVELS. The Lancet, Originally published as Volume 2, Issue 8357 322, 983–986. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)90977-7

Michel, T., Feron, O., 1997. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? The Journal of clinical investigation 100, 2146–2152.

Miller, P.E., Van Elswyk, M., Alexander, D.D., 2014. Long-Chain Omega-3 Fatty Acids Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid and Blood Pressure: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. American Journal of Hypertension 27, 885–896. https://doi.org/10.1093/ajh/hpu024

Mills, K.T., Stefanescu, A., He, J., 2020. The global epidemiology of hypertension. Nature Reviews Nephrology 16, 223–237. https://doi.org/10.1038/s41581-019-0244-2

Mimran, A., Ribstein, J., Jover, B., 1992. Aging and sodium homeostasis. Kidney Int Suppl 37, S107-113.

Mitchell, J.A., Ahmetaj-Shala, B., Kirkby, N.S., Wright, W.R., Mackenzie, L.S., Reed, D.M., Mohamed, N., 2015. Role of prostacyclin in pulmonary hypertension. Global Cardiology Science and Practice 2014, 53. https://doi.org/10.5339/gcsp.2014.53

Mittal, G.C., Aguwa, C.N., Ezeiru, V.U., Akubue, P.I., 1981. Preliminary pharmacological studies on antivenom action of Diodia scandens leaves. Nigerian Journal of Pharmacy 12, 432–436.

Moncada, S., Gryglewski, R.J., Bunting, S., Vane, J.R., 1976. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature 263, 663–665.

Moncada, S., Higgs, E.A., 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. British journal of pharmacology 147, S193–S201.

Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A., 1989. Biosynthesis of nitric oxide from l-arginine: A pathway for the regulation of cell function and communication. Biochemical Pharmacology 38, 1709–1715. https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90403-6

Moudachirou, M., Ayédoun, M.A., Gbénou, J.D., Garneau, F.-X., Gagnon, H., Jean, F.-I., 1998. Essential Oil of *Carissa edulis* Vahl. from Benin. Journal of Essential Oil Research 10, 195–196. https://doi.org/10.1080/10412905.1998.9700877

Mukai, Y., Shimokawa, H., Higashi, M., Morikawa, K., Matoba, T., Hiroki, J., Kunihiro, I., Talukder, H.M., Takeshita, A., 2002. Inhibition of renin-angiotensin system ameliorates endothelial dysfunction associated with aging in rats. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 22, 1445–1450.

Nair, S.S., Kavrekar, V., Mishra, A., 2013. Evaluation of in vitro antidiabetic activity of selected plant extracts. International Journal of Pharmaceutical Science Invention 2, 12–19.

Nakayama, T., 2006. Prostacyclin analogues: prevention of cardiovascular diseases. Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents) 4, 351–359.

Nantongo, J.S., Odoi, J.B., Abigaba, G., Gwali, S., 2018. Variability of phenolic and alkaloid content in different plant parts of Carissa edulis Vahl and Zanthoxylum chalybeum Engl. BMC Research Notes 11, 125. https://doi.org/10.1186/s13104-018-3238-4

Narendhirakannan, R.T., Subramanian, S., Kandaswamy, M., 2007. Anti-inflammatory and lysosomal stability actions of Cleome gynandra L. studied in adjuvant induced arthritic rats. Food and Chemical Toxicology 45, 1001–1012. https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.12.009

Narendhirakannan, R.T., Subramanian, S., Kandaswamy, M., 2005. Free radical scavenging activity of Cleome gynandra L. leaves on adjuvant induced arthritis in rats. Molecular and Cellular Biochemistry 276, 71–80.

Nazareth, M.S., Shreelakshmi, S.V., Shetty, N.P., 2021. Identification and Characterization of Polyphenols from Carissa spinarum Fruit and Evaluation of Their Antioxidant and Anti-quorum Sensing Activity. Curr Microbiol 78, 1277–1285. https://doi.org/10.1007/s00284-021-02381-4

Ndenga, E.A., Achigan-Dako, E.G., Mbugua, G., Maye, D., Ojanji, W., 2011. Agricultural diversification with indigenous vegetables for cash cropping and nutrition: examples from Rift Valley and Central Provinces in Kenya, in: II International Symposium on Underutilized Plant Species: Crops for the Future-Beyond Food Security 979. pp. 549–558.

Ndiaye, M., Chataigneau, M., Lobysheva, I., Chataigneau, T., Schini-Kerth, V.B., 2005a. Red wine polyphenols-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. The FASEB Journal 19, 1–20. https://doi.org/10.1096/fj.04-2146fje

Ndiaye, M., Chataigneau, M., Lobysheva, I., Chataigneau, T., Schini-Kerth, V.B., 2005b. Red wine polyphenols-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. The FASEB Journal 19, 1–20. https://doi.org/10.1096/fj.04-2146fje

Nedi, T., Mekonnen, N., Urga, K., 2004. Diuretic effect of the crude extracts of Carissa edulis in rats. Journal of Ethnopharmacology 95, 57–61. https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.017

Neugart, S., Baldermann, S., Ngwene, B., Wesonga, J., Schreiner, M., 2017. Indigenous leafy vegetables of Eastern Africa—A source of extraordinary secondary plant metabolites. Food Research International 100, 411–422.

Neumann, P., Gertzberg, N., Johnson, A., 2004. TNF-α induces a decrease in eNOS promoter activity. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 286, L452–L459.

Nguyen Dinh Cat, A., Touyz, R.M., 2011. Cell Signaling of Angiotensin II on Vascular Tone: Novel Mechanisms. Curr Hypertens Rep 13, 122–128. https://doi.org/10.1007/s11906-011-0187-x

Nguyen, H., Chiasson, V.L., Chatterjee, P., Kopriva, S.E., Young, K.J., Mitchell, B.M., 2013. Interleukin-17 causes Rho-kinase-mediated endothelial dysfunction and hypertension. Cardiovascular research 97, 696–704.

Niazi, Z.R., Silva, G.C., Ribeiro, T.P., León-González, A.J., Kassem, M., Mirajkar, A., Alvi, A., Abbas, M., Zgheel, F., Schini-Kerth, V.B., 2017. EPA: DHA 6: 1 prevents angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase-and COX-derived oxidative stress. Hypertension Research 40, 966–975.

Nilson, P.M., Boutouyrie, Laurent, S., 2009. Vascular Aging. Hypertension 54, 3–10. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.129114

Nilsson, P.M., Lurbe, E., Laurent, S., 2008. The early life origins of vascular ageing and cardiovascular risk: the EVA syndrome. Journal of Hypertension 26, 1049–1057. https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3282f82c3e

Njau, V.N., Maina, E.N., Anjili, C.O., Ingonga, J.M., Koech, J.C., Kariuki, H.W., Ngure, P.K., 2017. In vitro antileishmanial activity and phytochemical analysis of Carissa edulis against Leishmania major. African Journal of Pharmacology and Therapeutics 5.

Nunes, M.G.S., Bernardino, A., Martins, R.D., 2015. Use of medicinal plants by people with hypertension. Rev Rene 16, 775–781. https://doi.org/10.15253/2175-6783.2015000600002

Oak, M.-H., Auger, C., Belcastro, E., Park, S.-H., Lee, H.-H., Schini-Kerth, V.B., 2018. Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium. Free Radical Biology and Medicine, Redox Signalling in Plants and Implications for Mammalian Physiology 122, 161–170. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.018

Okafor, J.C., 2013. Tropical Plants in Health Care Delivery in Nigeria: A Practical Guide in the Treatment of Common Ailments and Conditions. BookBuilders, Editions Africa.

Okuda, T. t, Grollman, A., 1967. Passive transfer of autoimmune induced hypertension in the rat by lymph node cells. Texas reports on biology and medicine 25, 257–264.

Olou, B.A., Bio, A., Koko, E.I.K.D., Djego, G.J., Sinsin, A.B., 2018. Connaissances ethnobotaniques et valorisation de deux plantes antihypertensives (Carissa edulis L. et Crateva adansonii DC) au Sud et au Centre du Bénin (Afrique de l'Ouest). International Journal of Biological and Chemical Sciences 12, 2602–2614. https://doi.org/10.4314/ijbcs.v12i6.11

Olsen, M.E., Hall, J.E., Montani, J.P., Guyton, A.C., Langford, H.G., Cornell, J.E., 1985. Mechanisms of angiotensin II natriuresis and antinatriuresis. American Journal of Physiology-Renal Physiology 249, F299–F307. https://doi.org/10.1152/ajprenal.1985.249.2.F299

Omondi, E.O., Engels, C., Nambafu, G., Schreiner, M., Neugart, S., Abukutsa-Onyango, M., Winkelmann, T., 2017. Nutritional compound analysis and morphological characterization of spider plant (Cleome gynandra) - an African indigenous leafy vegetable. Food Research International 100, 284–295. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.050

Onuaguluchi, G., Nwafor, P., 1999. Pharmacological basis for the use of the antivenene water soluble extract of Diodia scandens as a laxative, oxytocic agent and a possible aphrodisiac in traditional medicine practice in eastern Nigeria. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives 13, 459–463.

Onuaguluchi, G., Okeke, P.C., 1989. Preliminary in vitro studies on the antagonistic effects of an ethanolic extract from Diodia scandens on Echis carinatus venom-induced changes in the clotting of human blood. Phytotherapy Research 3, 11–14.

Onyango, C.M., Kunyanga, C.N., Ontita, E.G., Narla, R.D., Kimenju, J.W., 2013. Current status on production and utilization of spider plant (Cleome gynandra L.) an underutilized leafy vegetable in Kenya. Genetic resources and crop evolution 60, 2183–2189.

Oparil, S., Schmieder, R.E., 2015. New Approaches in the Treatment of Hypertension. Circulation Research 116, 1074–1095. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303603

O'Shaughnessy, K.M., Karet, F.E., 2004. Salt handling and hypertension. J Clin Invest 113, 1075–1081. https://doi.org/10.1172/JCI21560

Osseni, R., Adanle, E., Adjagba, M., Bonaventure, A., Hountohotegbe, T., Bigot, A., Raphael, D., Anatole, L., 2017. Modification of biochemical and haematological parameters during 90-days subchronic toxicity assessment of Carissa edulis in Wistar rats. J. Toxicol. Environ. Health Sci. 9, 7–13. https://doi.org/10.5897/JTEHS2017.0379

Osseni, R., Akoha, S., Adjagba, M., Azonbakin, S., Lagnika, L., Awede, B., Bigot, A., Diouf, A., Darboux, R., Lalèyè, A., 2016. In vivo Toxicological Assessment of the Aqueous Extracts of the Leaves of Carissa edulis (Apocynaceae) in Wistar Rats. EJMP 15, 1–10. https://doi.org/10.9734/EJMP/2016/26083

Owusu-Ansah, E., Yavari, A., Banerjee, U., 2008. A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species. Protocol Exchange 10.

Pais, E., Meiselman, H.J., Alexy, T., 2010. Characteristics of Blood Vessels. Exercise Physiology: From a Cellular to an Integrative Approach 75, 183.

Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S., 1988a. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 333, 664–666.

Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S., 1988b. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 333, 664–666.

Paravicini, T.M., Touyz, R.M., 2006. Redox signaling in hypertension. Cardiovascular Research 71, 247–258. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.05.001

Paredes, M.D., Romecín, P., Atucha, N.M., O'Valle, F., Castillo, J., Ortiz, M.C., García-Estañ, J., 2018a. Beneficial Effects of Different Flavonoids on Vascular and Renal Function in L-NAME Hypertensive Rats. Nutrients 10, 484. https://doi.org/10.3390/nu10040484

Paredes, M.D., Romecín, P., Atucha, N.M., O'Valle, F., Castillo, J., Ortiz, M.C., García-Estañ, J., 2018b. Beneficial Effects of Different Flavonoids on Vascular and Renal Function in L-NAME Hypertensive Rats. Nutrients 10, 484. https://doi.org/10.3390/nu10040484

Patel, D., Kumar, R., Prasad, S., Hemalatha, S., 2011. Pharmacologically screened aphrodisiac plant-A review of current scientific literature. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 1, S131–S138. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60140-8

Patel, S., 2015. Food and Pharmaceutical Potential of Carissa Genus, in: Patel, S. (Ed.), Emerging Bioresources with Nutraceutical and Pharmaceutical Prospects, Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future. Springer International Publishing, Cham, pp. 31–41. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12847-4_4

Patrignani, P., Tacconelli, S., Sciulli, M.G., Capone, M.L., 2005. New insights into COX-2 biology and inhibition. Brain Research Reviews, Glial-Neuron Crosstalk in Neuroinflammation, Neurodegeneration and Neuroprotection 48, 352–359. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.12.024

Pauletto, P., Rattazzi, M., 2006. Inflammation and hypertension: the search for a link. Nephrology Dialysis Transplantation 21, 850–853. https://doi.org/10.1093/ndt/gfl019

Paulis, L., Steckelings, U.M., Unger, T., 2012. Key advances in antihypertensive treatment. Nat Rev Cardiol 9, 276–285. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.33

Paur, I., Carlsen, M.H., Halvorsen, B.L., Blomhoff, R., 2011. Antioxidants in Herbs and Spices: Roles in Oxidative Stress and Redox Signaling, in: Benzie, I.F.F., Wachtel-Galor, S. (Eds.), Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).

Pemmari, A., Leppänen, T., Paukkeri, E.-L., Scotece, M., Hämäläinen, M., Moilanen, E., 2018. Attenuating Effects of Nortrachelogenin on IL-4 and IL-13 Induced Alternative Macrophage Activation and on Bleomycin-Induced Dermal Fibrosis. J. Agric. Food Chem. 66, 13405–13413. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03023

Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., 2010. Flavonols and cardiovascular disease. Molecular Aspects of Medicine, Phytochemicals and Cardiovascular Protection 31, 478–494. https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.002

Petrovska, B.B., 2012. Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacogn Rev 6, 1–5. https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849

Peuhu, E., Paul, P., Remes, M., Holmbom, T., Eklund, P., Sjöholm, R., Eriksson, J.E., 2013. The antitumor lignan Nortrachelogenin sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced cell death by inhibition of the Akt pathway and growth factor signaling. Biochemical pharmacology 86, 571–583.

Pincemail, J., 2001. Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. Mise au point 7.

Ping-tao, L., Leeuwenberg, A.J.M., Middleton, D.J., 1996. Apocynaceae., in: Flora of China. Vol. 16. pp. 143–163.

Pinto, Y.M., Paul, M., Ganten, D., 1998. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. Cardiovascular Research 39, 77–88. https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00077-7

Pluchart, H., Khouri, C., Blaise, S., Roustit, M., Cracowski, J.-L., 2017. Targeting the Prostacyclin Pathway: Beyond Pulmonary Arterial Hypertension. Trends in Pharmacological Sciences 38, 512–523. https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.03.003

Preston, R.A., Ledford, M., Materson, B.J., Baltodano, N.M., Memon, A., Alonso, A., 2002. Effects of severe, uncontrolled hypertension on endothelial activation: soluble vascular cell adhesion molecule-1, soluble intercellular adhesion molecule-1 and von Willebrand factor. Journal of Hypertension 20, 871–877.

Puddu, P., Puddu, G., Zaca, F., Muscari, A., 2000. Endothelial dysfunction in hypertension. Acta Cardiol 55, 221–232. https://doi.org/10.2143/ac.55.4.2005744

Putney Jr, J.W., 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. Cell calcium 7, 1–12.

Puzserova, A., Ilovska, V., Balis, P., Slezak, P., Bernatova, I., 2014. Age-Related Alterations in Endothelial Function of Femoral Artery in Young SHR and WKY Rats. BioMed Research International 2014, e658479. https://doi.org/10.1155/2014/658479

Qian, J., Fulton, D., 2013. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. Front. Physiol. 4. https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00347

Rahimi, N., 2017. Defenders and Challengers of Endothelial Barrier Function. Front. Immunol. 8. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01847

Rajagopalan, S., Kurz, S., Münzel, T., Tarpey, M., Freeman, B.A., Griendling, K.K., Harrison, D.G., 1996. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. The Journal of clinical investigation 97, 1916–1923.

Ramesar, S., Baijnath, H., Govender, T., Mackraj, I., 2008. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor activity of nutritive plants in KwaZulu-Natal. Journal of medicinal food 11, 331–336.

Ramseyer, V.D., Garvin, J.L., 2013. Tumor necrosis factor-α: regulation of renal function and blood pressure. American Journal of Physiology-Renal Physiology 304, F1231–F1242.

Randriamboavonjy, J.I., Heurtebise, S., Pacaud, P., Loirand, G., Tesse, A., 2019. Moringa oleifera Seeds Improve Aging-Related Endothelial Dysfunction in Wistar Rats. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2019, e2567198. https://doi.org/10.1155/2019/2567198

Rao, E.S., Rao, P.R., Rao, B.G., Rao, T.M., 2013. Evaluation of hepatoprotective activity of Gynandropsis gynandra. Journal of Pharmacy Research 6, 928–932.

Rattmann, Y.D., Anselm, E., Kim, J.-H., Dal-Ros, S., Auger, C., Miguel, O.G., Santos, A.R.S., Chataigneau, T., Schini-Kerth, V.B., 2012. Natural Product Extract of Dicksonia sellowiana Induces Endothelium-Dependent Relaxations by a Redox-Sensitive Src- and Akt-Dependent Activation of eNOS in Porcine Coronary Arteries. J Vasc Res 49, 284–298. https://doi.org/10.1159/000336647

Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. The FASEB Journal 22, 659–661. https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF

Rosenbaum, D.P., Yan, A., Jacobs, J.W., 2018. Pharmacodynamics, Safety, and Tolerability of the NHE3 Inhibitor Tenapanor: Two Trials in Healthy Volunteers. Clin Drug Investig 38, 341–351. https://doi.org/10.1007/s40261-017-0614-0

Rubanyi, G.M., Vanhoutte, P.M., 1986a. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 250, H822–H827. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1986.250.5.H822

Rubanyi, G.M., Vanhoutte, P.M., 1986b. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 250, H822–H827. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1986.250.5.H822

Rucker, D., Dhamoon, A.S., 2021. Physiology, Thromboxane A2, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Runnie, I., Salleh, M.N., Mohamed, S., Head, R.J., Abeywardena, M.Y., 2004. Vasorelaxation induced by common edible tropical plant extracts in isolated rat aorta and mesenteric vascular bed. Journal of Ethnopharmacology 92, 311–316. https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.019

Sacerdoti, D., Pesce, P., Di Pascoli, M., Brocco, S., Cecchetto, L., Bolognesi, M., 2015. Arachidonic acid metabolites and endothelial dysfunction of portal hypertension. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, Eicosanoids and related compounds 120, 80–90. https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.05.008

Sandoo, A., van Zanten, J.J.V., Metsios, G.S., Carroll, D., Kitas, G.D., 2010. The endothelium and its role in regulating vascular tone. The open cardiovascular medicine journal 4, 302.

Sango, C., Marufu, L., Zimudzi, C., 2016. Phytochemical, Anti-nutrients and Toxicity Evaluation of Cleome gynandra and Solanum nigrum: Common Indigenous Vegetables in Zimbabwe. Biotechnology Journal International 1–11. https://doi.org/10.9734/BBJ/2016/25164

Santilli, F., D'Ardes, D., Davi, G., 2015. Oxidative stress in chronic vascular disease: from prediction to prevention. Vascular pharmacology 74, 23–37.

Sanwal, R., Chaudhary, A.K., 2011. Wound healing and antimicrobial potential of Carissa spinarum Linn. in albino mice. Journal of Ethnopharmacology 135, 792–796. https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.025

Sarki, A.M., Nduka, C.U., Stranges, S., Kandala, N.-B., Uthman, O.A., 2015. Prevalence of Hypertension in Low- and Middle-Income Countries. Medicine (Baltimore) 94. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001959

Sarr, M., Chataigneau, M., Martins, S., Schott, C., Elbedoui, J., Oak, M., Muller, B., Chataigneau, T., Schinikerth, V., 2006. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: Role of NADPH oxidase. Cardiovascular Research 71, 794–802. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.05.022

Satpathy, A.T., Wu, X., Albring, J.C., Murphy, K.M., 2012. Re (de) fining the dendritic cell lineage. Nature immunology 13, 1145–1154.

Savai, R., Pullamsetti, S.S., Kolbe, J., Bieniek, E., Voswinckel, R., Fink, L., Scheed, A., Ritter, C., Dahal, B.K., Vater, A., 2012. Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. American journal of respiratory and critical care medicine 186, 897–908.

Savoia, C., Sada, L., Zezza, L., Pucci, L., Lauri, F.M., Befani, A., Alonzo, A., Volpe, M., 2011. Vascular Inflammation and Endothelial Dysfunction in Experimental Hypertension. International Journal of Hypertension 2011, e281240. https://doi.org/10.4061/2011/281240

Schalkwijk, C.G., Stehouwer, C.D.A., 2005. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. Clinical Science 109, 143–159. https://doi.org/10.1042/CS20050025

Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. Current Biology 24, R453–R462. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034

Schilling, W.P., Cabello, O.A., Rajan, L., 1992. Depletion of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate-sensitive intracellular Ca2+ store in vascular endothelial cells activates the agonist-sensitive Ca2+-influx pathway. Biochemical Journal 284, 521–530.

Schilling, W.P., Elliott, S.J., 1992. Ca2+ signaling mechanisms of vascular endothelial cells and their role in oxidant-induced endothelial cell dysfunction. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 262, H1617–H1630.

Schini-Kerth, V.B., Auger, C., Étienne-Selloum, N., Chataigneau, T., 2010a. Polyphenol-Induced Endothelium-Dependent Relaxations, in: Advances in Pharmacology. Elsevier, pp. 133–175. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385061-4.00006-4

Schini-Kerth, V.B., Auger, C., Kim, J.-H., Étienne-Selloum, N., Chataigneau, T., 2010b. Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. Pflugers Arch - Eur J Physiol 459, 853–862. https://doi.org/10.1007/s00424-010-0806-4

Schmidt, T.S., Alp, N.J., 2007. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. Clinical science 113, 47–63.

Schulz, E., Gori, T., Münzel, T., 2011. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. Hypertension Research 34, 665–673. https://doi.org/10.1038/hr.2011.39

Schymanski, E.L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H.P., Hollender, J., 2014. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. ACS Publications.

Scolaro, B., Soo Jin Kim, H., de Castro, I.A., 2018. Bioactive compounds as an alternative for drug co-therapy: Overcoming challenges in cardiovascular disease prevention. Critical reviews in food science and nutrition 58, 958–971.

Seals, D.R., Jablonski, K.L., Donato, A.J., 2011. Aging and vascular endothelial function in humans. Clinical Science 120, 357–375. https://doi.org/10.1042/CS20100476

Searles, C.D., 2006. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. American Journal of Physiology-Cell Physiology 291, C803–C816.

Sehar, I., Pal, H.C., Shukla, S., Bhushan, S., Hamid, A., Gupta, B.D., Saxena, A.K., 2011. Cytotoxic evaluation and induction of mitochondria-mediated apoptosis in human leukaemia HL-60 cells by *Carissa spinarum* stem isolate: Anticancer activity of *Carissa spinarum* stem isolate. Journal of Pharmacy and Pharmacology 63, 1078–1090. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01310.x

Selye, H., Hall, C.E., Rowley, E.M., 1943. Malignant Hypertension Produced by Treatment with Desoxycorticosterone Acetate and Sodium Chloride. Can Med Assoc J 49, 88–92.

Sen, S., Chakraborty, R., 2017. Revival, modernization and integration of Indian traditional herbal medicine in clinical practice: Importance, challenges and future. Journal of Traditional and Complementary Medicine 7, 234–244. https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.05.006

Sessa, W.C., Pritchard, K., Seyedi, N., Wang, J., Hintze, T.H., 1994. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. Circulation research 74, 349–353.

Sethi, R., Gómez-Coronado, N., Walker, A.J., Robertson, O.D., Agustini, B., Berk, M., Dodd, S., 2019. Neurobiology and therapeutic potential of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors for inflammation in neuropsychiatric disorders. Frontiers in psychiatry 10, 605.

Shan, H., Guo, D., Li, X., Zhao, X., Li, W., Bai, X., 2014. From autophagy to senescence and apoptosis in Angiotensin II-treated vascular endothelial cells. APMIS 122, 985–992. https://doi.org/10.1111/apm.12242

Shilla, O., Dinssa, F.F., Omondi, E.O., Winkelmann, T., Abukutsa-Onyango, M.O., 2019. Cleome gynandra L. origin, taxonomy and morphology: A review. African Journal of Agricultural Research 14, 1568–1583.

Singh, H., Mishra, A., Mishra, A.K., 2018. The chemistry and pharmacology of Cleome genus: a review. Biomedicine & Pharmacotherapy 101, 37–48.

Singh, N., Prasad, S., Singer, D.R.J., Mac Allister, R.J., 2002. Ageing is associated with impairment of nitric oxide and prostanoid dilator pathways in the human forearm. Clinical Science 102, 595–600. https://doi.org/10.1042/cs1020595

Stanley, F.S., Milagros, J.J., Nathan, W.D., Gilbert, L.J., Pablo, L., 2001. Predominance of Isolated Systolic Hypertension Among Middle-Aged and Elderly US Hypertensives. Hypertension 37, 869–874. https://doi.org/10.1161/01.HYP.37.3.869

Stewart, M.H., Lavie, C.J., Ventura, H.O., 2019. Emerging Therapy in Hypertension. Curr Hypertens Rep 21, 23. https://doi.org/10.1007/s11906-019-0923-1

Story, A.E., 2008. Aldosterone, Hypertension, and Cardiovascular Disease. Hypertension 52, 207–208.

Struijker-Boudier, H.A.J., Rosei, A.E., Bruneval, P., Camici, P.G., Christ, F., Henrion, D., Lévy, B.I., Pries, A., Vanoverschelde, J.-L., 2007. Evaluation of the microcirculation in hypertension and cardiovascular disease. European Heart Journal 28, 2834–2840. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm448

Suematsu, M., Suzuki, H., Delano, F.A., Schmid-Schönbein, G.W., 2002. The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension: oxidative stress, leukocytes/endothelial interaction, apoptosis. Microcirculation 9, 259–276.

Suganya, N., Bhakkiyalakshmi, E., Sarada, D.V.L., Ramkumar, K.M., 2016. Reversibility of endothelial dysfunction in diabetes: role of polyphenols. British Journal of Nutrition 116, 223–246. https://doi.org/10.1017/S0007114516001884

Sun, H.-J., Hou, B., Wang, X., Zhu, X.-X., Li, K.-X., Qiu, L.-Y., 2016. Endothelial dysfunction and cardiometabolic diseases: Role of long non-coding RNAs. Life Sciences 167, 6–11. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.11.005

Sun, H.-J., Wu, Z.-Y., Nie, X.-W., Bian, J.-S., 2020. Role of Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Link Between Inflammation and Hydrogen Sulfide. Front. Pharmacol. 10. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01568

Sun, Y.-H., Zhao, J., Jin, H.-T., Cao, Y., Ming, T., Zhang, L.-L., Hu, M.-Y., Hamlati, H., Pang, S.-B., Ma, X.-P., 2013a. Vasorelaxant effects of the extracts and some flavonoids from the buds of Coreopsis tinctoria. Pharmaceutical Biology 51, 1158–1164. https://doi.org/10.3109/13880209.2013.782320

Sun, Y.-H., Zhao, J., Jin, H.-T., Cao, Y., Ming, T., Zhang, L.-L., Hu, M.-Y., Hamlati, H., Pang, S.-B., Ma, X.-P., 2013b. Vasorelaxant effects of the extracts and some flavonoids from the buds of Coreopsis tinctoria. Pharmaceutical Biology 51, 1158–1164. https://doi.org/10.3109/13880209.2013.782320

Supasyndh, O., Sun, N., Kario, K., Hafeez, K., Zhang, J., 2017. Long-term (52-week) safety and efficacy of Sacubitril/valsartan in Asian patients with hypertension. Hypertens Res 40, 472–476. https://doi.org/10.1038/hr.2016.151

Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Salvetti, A., 1998. The role of endothelium in human hypertension. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 7, 203–210.

Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Salvetti, G., Bernini, G., Magagna, A., Salvetti, A., 2001a. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. Hypertension 38, 274–279.

Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Sudano, I., Salvetti, A., 2001b. Endothelial Dysfunction in Hypertension. Journal of Cardiovascular Pharmacology 38, S11.

Taddei, S., Virdis, A., Mattei, P., Ghiadoni, L., Gennari, A., Fasolo, C.B., Sudano, I., Salvetti, A., 1995. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. Circulation 91, 1981–1987.

Takaki, A., Morikawa, K., Tsutsui, M., Murayama, Y., Tekes, E., Yamagishi, H., Ohashi, J., Yada, T., Yanagihara, N., Shimokawa, H., 2008. Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. The Journal of experimental medicine 205, 2053–2063.

Tilburt, J.C., Kaptchuk, T.J., 2008. Herbal medicine research and global health: an ethical analysis. Bulletin of the World Health Organization 86, 594–599.

Tokoudagba, J.-M., Auger, C., Bréant, L., N'Gom, S., Chabert, P., Idris-Khodja, N., Gbaguidi, F., Gbenou, J., Moudachirou, M., Lobstein, A., Schini-Kerth, V.B., 2010a. Procyanidin-rich fractions from Parkia biglobosa (Mimosaceae) leaves cause redox-sensitive endothelium-dependent relaxation involving NO and EDHF in porcine coronary artery. Journal of Ethnopharmacology 132, 246–250. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.08.031

Tokoudagba, J.-M., Auger, C., Bréant, L., N'Gom, S., Chabert, P., Idris-Khodja, N., Gbaguidi, F., Gbenou, J., Moudachirou, M., Lobstein, A., Schini-Kerth, V.B., 2010b. Procyanidin-rich fractions from Parkia biglobosa (Mimosaceae) leaves cause redox-sensitive endothelium-dependent relaxation involving NO and EDHF in porcine coronary artery. Journal of Ethnopharmacology 132, 246–250. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.08.031

Tokoudagba, J.M., Chabert, P., Auger, C., N'gom, S., Gbenou, J., Moudachirou, M., Schini-Kerth, V., Lobstein, A., 2009. Recherche de plantes à potentialités antihypertensives dans la biodiversité béninoise. Ethnopharmacologia 44, 32–49.

Tokoudagba, J.-M., Gandonou, C.D., Houngue, U., Auger, C., Schini-Kerth, V.B., 2018. World Journal of Pharmaceutical Sciences.

Tolo, F.M., Rukunga, G.M., Muli, F.W., Njagi, E.N.M., Njue, W., Kumon, K., Mungai, G.M., Muthaura, C.N., Muli, J.M., Keter, L.K., Oishi, E., Kofi-Tsekpo, M.W., 2006. Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant Carissa edulis against herpes simplex virus. Journal of Ethnopharmacology 104, 92–99. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.053

Touyz, R.M., Schiffrin, E.L., 2004. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. Histochemistry and cell biology 122, 339–352.

Touyz, R.M., Schiffrin, E.L., 2000. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Pharmacological reviews 52, 639–672.

Touyz, R.M., Tabet, F., Schiffrin, E.L., 2003. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. Clinical and experimental pharmacology & physiology 30, 860–866.

Tresserra-Rimbau, A., Rimm, E.B., Medina-Remón, A., Martínez-González, M.A., López-Sabater, M.C., Covas, M.I., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Arós, F., Fiol, M., Ros, E., Serra-Majem, L., Pintó, X., Muñoz, M.A., Gea, A., Ruiz-Gutiérrez, V., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R.M., 2014. Polyphenol intake and mortality risk: a re-analysis of the PREDIMED trial. BMC Med 12, 77. https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-77

Unger, T., Borghi, C., Fadi, C., Khan Nadia A., Poulter Neil R., Prabhakaran Dorairaj, Ramirez Agustin, Schlaich Markus, Stergiou George S., Tomaszewski Maciej, Wainford Richard D., Williams Bryan, Schutte Aletta E., 2020. 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension

Practice Guidelines. Hypertension 75, 1334–1357. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15026

Ungvari, Z., Buffenstein, R., Austad, S.N., Podlutsky, A., Kaley, G., Csiszar, A., 2008. Oxidative stress in vascular senescence: lessons from successfully aging species. Front Biosci 13, 5056–5070.

van der Loo, B., Labugger, R., Skepper, J.N., Bachschmid, M., Kilo, J., Powell, J.M., Palacios-Callender, M., Erusalimsky, J.D., Quaschning, T., Malinski, T., Gygi, D., Ullrich, V., Lüscher, T.F., 2000. Enhanced Peroxynitrite Formation Is Associated with Vascular Aging. Journal of Experimental Medicine 192, 1731–1744. https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1731

Van Vuuren, S., Holl, D., 2017. Antimicrobial natural product research: A review from a South African perspective for the years 2009–2016. Journal of Ethnopharmacology 208, 236–252.

Vane, J.R., Botting, R.M., 1995. Pharmacodynamic profile of prostacyclin. The American Journal of Cardiology 75, 3A-10A. https://doi.org/10.1016/S0002-9149(99)80377-4

Vanhoutte, P.M., Feletou, M., Taddei, S., 2005. Endothelium-dependent contractions in hypertension. British Journal of Pharmacology 144, 449–458. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706042

Vanhoutte, P.M., Tang, E.H.C., 2008. Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad! The Journal of Physiology 586, 5295–5304. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.161430

Vasan, R.S., Beiser, A., Seshadri, S., Larson, M.G., Kannel, W.B., D'Agostino, R.B., Levy, D., 2002. Residual Lifetime Risk for Developing Hypertension in Middle-aged Women and Men: The Framingham Heart Study. JAMA 287. https://doi.org/10.1001/jama.287.8.1003

Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martásek, P., 2003. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. Free radical research 37, 121–127.

Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martásek, P., Hogg, N., Masters, B.S.S., Karoui, H., Tordo, P., Pritchard, K.A., 1998. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. Proceedings of the National Academy of Sciences 95, 9220–9225.

Virdis, A., Bacca, A., Colucci, R., Duranti, E., Fornai, M., Materazzi, G., Ippolito, C., Bernardini, N., Blandizzi, C., Bernini, G., 2013. Endothelial dysfunction in small arteries of essential hypertensive patients: role of cyclooxygenase-2 in oxidative stress generation. Hypertension 62, 337–344.

Wang, H.-P., Lu, J.-F., Zhang, G.-L., Li, X.-Y., Peng, H.-Y., Lu, Y., Zhao, L., Ye, Z.-G., Bruce, I.C., Xia, Q., Qian, L.-B., 2014a. Endothelium-dependent and -independent vasorelaxant actions and mechanisms induced by total flavonoids of Elsholtzia splendens in rat aortas. Environmental Toxicology and Pharmacology 38, 453–459. https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.07.019

Wang, H.-P., Lu, J.-F., Zhang, G.-L., Li, X.-Y., Peng, H.-Y., Lu, Y., Zhao, L., Ye, Z.-G., Bruce, I.C., Xia, Q., Qian, L.-B., 2014b. Endothelium-dependent and -independent vasorelaxant actions and mechanisms induced by total flavonoids of Elsholtzia splendens in rat aortas. Environmental Toxicology and Pharmacology 38, 453–459. https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.07.019

Wang, M., Takagi, G., Asai, K., Resuello, R.G., Natividad, F.F., Vatner, D.E., Vatner, S.F., Lakatta, E.G., 2003. Aging increases aortic MMP-2 activity and angiotensin II in nonhuman primates. Hypertension 41, 1308–1316.

Wang, Y., Ames, N.P., Tun, H.M., Tosh, S.M., Jones, P.J., Khafipour, E., 2016. High Molecular Weight Barley β-Glucan Alters Gut Microbiota Toward Reduced Cardiovascular Disease Risk. Frontiers in Microbiology 7, 129. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00129

Wangteeraprasert, R., Lipipun, V., Gunaratnam, M., Neidle, S., Gibbons, S., Likhitwitayawuid, K., 2012. Bioactive Compounds from Carissa spinarum. Phytother. Res. n/a-n/a. https://doi.org/10.1002/ptr.4607

Wei, J.Y., 1992. Age and the Cardiovascular System. New England Journal of Medicine 327, 1735–1739. https://doi.org/10.1056/NEJM199212103272408

Whaley-Connell, A., McCullough, P.A., Sowers, J.R., 2011. The role of oxidative stress in the metabolic syndrome. Reviews in cardiovascular medicine 12, 21–29.

WHO, 2020. The top 10 causes of death [WWW Document]. URL https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death (accessed 1.13.21).

WHO, 2019. WHO global report on traditional and complementary medicine 2019. World Health Organization.

WHO (Ed.), 2008. Primary health care: now more than ever, The world health report. World Health Organization, Geneva.

WHO, W., 2013. A global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis.

Wicha, P., Onsa-ard, A., Chaichompoo, W., Suksamrarn, A., Tocharus, C., 2020. Vasorelaxant and Antihypertensive Effects of Neferine in Rats: An In Vitro and In Vivo Study. Planta Med 86, 496–504. https://doi.org/10.1055/a-1123-7852

Williams Stephen K., Ogedegbe Gbenga, 2012. Unraveling the Mechanism of Renin-Angiotensin-Aldosterone System Activation and Target Organ Damage in Hypertensive Blacks. Hypertension 59, 10–11. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.182790

Wong, M.S.-K., Vanhoutte, P.M., 2010. COX-mediated endothelium-dependent contractions: from the past to recent discoveries. Acta Pharmacologica Sinica 31, 1095–1102. https://doi.org/10.1038/aps.2010.127

Wong, R.S.Y., 2019. Role of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Cancer Prevention and Cancer Promotion. Advances in Pharmacological Sciences 2019, e3418975. https://doi.org/10.1155/2019/3418975

Woodman, C.R., Price, E.M., Laughlin, M.H., 2005. Shear stress induces eNOS mRNA expression and improves endothelium-dependent dilation in senescent soleus muscle feed arteries. Journal of applied physiology 98, 940–946.

Woodward, D.F., Jones, R.L., Narumiya, S., 2011. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: Classification of Prostanoid Receptors, Updating 15 Years of Progress. Pharmacol Rev 63, 471–538. https://doi.org/10.1124/pr.110.003517

Wu, J., Thabet, S.R., Kirabo, A., Trott, D.W., Saleh, M.A., Xiao, L., Madhur, M.S., Chen, W., Harrison, D.G., 2014. Inflammation and mechanical stretch promote aortic stiffening in hypertension through activation of p38 mitogen-activated protein kinase. Circulation research 114, 616–625.

Wu, T., Solberg, S.O., Yndgaard, F., Chou, Y.-Y., 2018. Morphological patterns in a world collection of Cleome gynandra. Genet Resour Crop Evol 65, 271–283. https://doi.org/10.1007/s10722-017-0529-x

Wung, B.S., Cheng, J.J., Chao, Y.J., Lin, J., Shyy, Y.-J., Wang, D.L., 1996. Cyclical strain increases monocyte chemotactic protein-1 secretion in human endothelial cells. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 270, H1462–H1468.

Yamori, Y., 1999. IMPLICATION OF HYPERTENSIVE RAT MODELS FOR PRIMORDIAL NUTRITIONAL PREVENTION OF CARDIOVASCULAR DISEASES. Clin Exp Pharmacol Physiol 26, 568–572. https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.1999.03085.x

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T., 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 332, 411–415. https://doi.org/10.1038/332411a0

Yang, A.-L., Tsai, S.-J., Jiang, M.J., Jen, C.J., Chen, H., 2002. Chronic exercise increases both inducible and endothelial nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells of rat aorta. Journal of biomedical science 9, 149–155.

Yang, T., Santisteban, M.M., Rodriguez, V., Li, E., Ahmari, N., Carvajal, J.M., Zadeh, M., Gong, M., Qi, Y., Zubcevic, J., Sahay, B., Pepine, C.J., Raizada, M.K., Mohamadzadeh, M., 2015. Gut Dysbiosis Is Linked to Hypertension. Hypertension 65, 1331–1340. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315

Yang, Y.-M., Huang, A., Kaley, G., Sun, D., 2009. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 297, H1829–H1836.

Yau, J., 2007. Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences 6, 7.

Ya'u, J., Abdullahi, S.M., Magaji, M.G., Yaro, A.H., Anuka, J.A., Hussaini, I.M., 2010. Behavioral studies on the ethanol root bark extract of Carissa edulis. Jopatrot 1, 31–34.

Ya'u, J., Chindo, B.A., Yaro, A.H., Okhale, S.E., Anuka, J.A., Hussaini, I.M., 2013. Safety assessment of the standardized extract of Carissa edulis root bark in rats. Journal of Ethnopharmacology 147, 653–661. https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.064

Ya'u, J., Yaro, A.H., Abubakar, M.S., Anuka, J.A., Hussaini, I.M., 2008. Anticonvulsant activity of Carissa edulis (Vahl) (Apocynaceae) root bark extract. Journal of Ethnopharmacology 120, 255–258. https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.029

Yeager, M.E., Belchenko, D.D., Nguyen, C.M., Colvin, K.L., Ivy, D.D., Stenmark, K.R., 2012. Endothelin-1, the Unfolded Protein Response, and Persistent Inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol 46, 14–22. https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0506OC

Yoon, H.E., Kim, E.N., Kim, M.Y., Lim, J.H., Jang, I., Ban, T.H., Shin, S.J., Park, C.W., Chang, Y.S., Choi, B.S., 2016. Age-associated changes in the vascular renin-angiotensin system in mice. Oxidative medicine and cellular longevity 2016.

Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., Piao, G., 2016. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. Molecules 21, 559. https://doi.org/10.3390/molecules21050559

Yusuf, S., Joseph, P., Rangarajan, S., Islam, S., Mente, A., Hystad, P., Brauer, M., Kutty, V.R., Gupta, R., Wielgosz, A., AlHabib, K.F., Dans, A., Lopez-Jaramillo, P., Avezum, A., Lanas, F., Oguz, A., Kruger, I.M., Diaz, R., Yusoff, K., Mony, P., Chifamba, J., Yeates, K., Kelishadi, R., Yusufali, A., Khatib, R., Rahman, O., Zatonska, K., Iqbal, R., Wei, L., Bo, H., Rosengren, A., Kaur, M., Mohan, V., Lear, S.A., Teo, K.K., Leong, D., O'Donnell, M., McKee, M., Dagenais, G., 2020. Modifiable risk factors, cardiovascular disease, and mortality in 155 722 individuals from 21 high-income, middle-income, and low-income countries (PURE): a prospective cohort study. The Lancet 395, 795–808. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32008-2

Zgheel, F., Perrier, S., Remila, L., Houngue, U., Mazzucotelli, J.-P., Morel, O., Auger, C., Schini-Kerth, V.B., 2019. EPA:DHA 6:1 is a superior omega-3 PUFAs formulation attenuating platelets-induced contractile responses in porcine coronary and human internal mammary artery by targeting

the serotonin pathway via an increased endothelial formation of nitric oxide. European Journal of Pharmacology 853, 41–48. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.03.022

Zhang, H., Tsao, R., 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. Current Opinion in Food Science, Food microbiology • Functional foods and nutrition 8, 33–42. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002

Zhang, M., Li, G., Huang, W., Bi, T., Chen, G., Tang, Z., Su, W., Sun, W., 2010. Proteomic study of *Carissa spinarum* in response to combined heat and drought stress. Proteomics 10, 3117–3129. https://doi.org/10.1002/pmic.200900637

Zhao, Y., Vanhoutte, P.M., Leung, S.W.S., 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. Journal of Pharmacological Sciences 129, 83–94. https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002

Zhongjie, S., 2015. Aging, Arterial Stiffness, and Hypertension. Hypertension 65, 252–256. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03617

Zielonka, J., Kalyanaraman, B., 2010. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth. Free Radical Biology and Medicine 48, 983–1001. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.028

Zinkevich, N.S., Gutterman, D.D., 2011. ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signaling. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 301, H647–H653. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01271.2010

Zorde, M., Byrnes, D.R., Dinssa, F.F., Weller, S., Simon, J.E., 2020. Selection for delayed flowering time in response to long photoperiod to increase vegetative growth and multiple harvests in spider plant (Cleome gynandra). Journal of Medicinally Active Plants 9, 60–70.

Productions scientifiques

Publications

Ursula M. Hounguè, Jean-Marie Tokoudagba, Fernand A.Gbaguidi and Valérie B. Schini-Kerth. ***Carissa edulis*** **phytochemical and pharmacological studies: A Review Article (2022)** International Journal of Science Academic Research 3(4): 3701-3706**. (IF 2022: 4,791)**

Ursula Hounguè, Claire Villette, Jean-Marie Tokoudagba, Ahmed B. Chaker, Lamia Remila, Cyril Auger, Dimitri Heintz, Fernand Gbaguidi, Valérie B. Schini-Kerth. **Endothelium-dependent vasorelaxant effect of a polyphenol-rich extract of Carissa edulis leaves: Role of nitric oxide** (En cours de révision dans Journal of Phytomedecine)

Ursula Hounguè, Lamia Remila, Ahmed B. Chaker, Jean-Marie Tokoudagba, Cyril. Auger, Fernand Gbaguidi, Valérie Schini-Kerth. **Intake of *Carissa edulis* improves an established age-related endothelial dysfunction by restoring the eNOS/NO-ROS balance and by reducing the pro-oxidant local angiotensin system: Role of endothelial SGLT1 and 2** (En préparation)

Jean-Marie Tokoudagba, Clément Gandonou, **Ursula Hounguè**, Cyril Auger, Valérie B. Schini-Kerth**. Phytochemistry and Vasorelaxant activity of some plants used traditionnaly against high blood pressure in Benin (2018) World Journal of Pharmaceutical Sciences 6(10): 40-48**

Lamia Remila, Nazende Guenday-Tuereli, **Ursula Hounguè**, Eugenia Belcastro, Christophe Bruckert, Thierry Vandamme, Emre Tuereli, Paul Kerth, Cyril Auger, Valérie Schini-Kerth. **Short-term intake of coated EPA:DHA 6:1 nanoparticles improves age-related endothelial dysfunction by enhancing endothelium-dependent relaxations and ameliorating oxidative stress: role of nitric oxide (2022) Journal of Functional Foods**

Ursula Mawulé HOUNGUE

Caractérisation de nouvelles molécules vasorelaxantes : étude chimico-pharmacologique de *Carissa edulis*, une espèce médicinale de la pharmacopée béninoise

Résumé

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde et leur incidence est associée à plusieurs facteurs de risque majeurs dont l'hypertension (HTA). Au Bénin, plusieurs plantes sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter l'HTA. Trois d'entre elles ont été sélectionnées pour notre étude *: Carissa edulis, Diodia scandens* et *Cleome gynandra*. Ainsi, l'objectif principal de cette thèse est d'étudier le potentiel des extraits de ces plantes à moduler le tonus vasculaire et de déterminer les mécanismes sous-jacents. Pour cela, nous avons procédé ex vivo et in vivo à des tests de réactivité vasculaire, d'absorption des polyphénols et d'immunofluorescence de protéines cibles. Les résultats ont montré que l'extrait de *Carissa edulis* a été le plus actif des trois plantes. Il possède une importante activité vasorelaxante strictement dépendante de l'endothélium et médiée par le monoxyde d'azote (NO) et sa fraction butanolique (CEBF) a une activité encore plus prononcée. Le traitement de rats d'âge moyen avec l'extrait total de *Carissa edulis* pendant deux semaines a significativement amélioré la fonction endothéliale et restauré la relaxation médiée par le NO dans l'artère mésentérique principale et l'aorte thoracique. Il a aussi fortement réduit au niveau vasculaire le niveau d'expression d'ACE et AT1R impliqués dans la dysfonction endothéliale associée au vieillissement et à l'hypertension artérielle, et le stress oxydant. Une identification putative par métabolomique non ciblée des molécules de CEBF a révélé la présence des polyphénols, terpènes et alcaloïdes.

Mots clés : Maladies cardiovasculaires, hypertension artérielle, endothélium.

Résumé en anglais

Cardiovascular diseases represent the first cause of mortality in the world and their incidence is associated with several major risk factors including hypertension. In Benin, several plants are used in traditional medicine to treat hypertension. Three of them were selected for our study: *Carissa edulis, Diodia scandens* and *Cleome gynandra*. The objective of the thesis was to study the potential of these plant extracts to modulate vascular tone and to determine the underlying mechanisms. For this purpose, we did ex vivo and in vivo studies to study vascular reactivity, polyphenol uptake and immunofluorescence tests of target proteins. The results showed that *Carissa edulis* extract was the most active of the three plants. It induced pronounced and strictly endothelium-dependent vasorelaxant mediated by nitric oxide (NO), and its butanolic fraction (CEBF) was more active. Treatment of middle-aged rats with the total extract of *Carissa edulis* for two weeks significantly improved the endothelial function as indicated by restored NO-mediated relaxations in the main mesenteric artery and thoracic aorta. It also strongly reduced the vascular expression level of ACE and AT1R involved in endothelial dysfunction associated with aging and hypertension and reduced the level of oxidative stress. Putative identification by nontargeted metabolomics of CEBF molecules revealed the presence of polyphenols, terpenes, and alkaloids.

Keywords: Cardiovascular diseases, hypertension, endothelium