



**HAL**  
open science

**Effet d'un traitement périnatal avec un  
hypocholestérolémiant (cholestyramine) et/ou un  
antioxydant (vitamine E) sur le développement de  
l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris  
déficientes en apolipoprotéine E**

Marina Habib

► **To cite this version:**

Marina Habib. Effet d'un traitement périnatal avec un hypocholestérolémiant (cholestyramine) et/ou un antioxydant (vitamine E) sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris déficientes en apolipoprotéine E. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU1029 . tel-03938032

**HAL Id: tel-03938032**

**<https://theses.hal.science/tel-03938032>**

Submitted on 13 Jan 2023

**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.

# THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : « Nutrition et Pathologies Métaboliques »

Par

« **Marina Habib** »

**Effet d'un traitement périnatal avec un hypocholestérolémiant (cholestyramine) et/ou un antioxydant (vitamine E) sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris déficientes en apolipoprotéine E.**

Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le « 14 novembre 2022 »

Unité de recherche : UMR 1280 Physiopathologie des Adaptations Nutritionnelles

## Rapporteurs avant soutenance :

Anne Tailleux Professeure, Université de Lille, Lille

Anatol Kontush Directeur de recherche, Sorbonne Université, Paris

## Composition du Jury :

Président : Dominique DARMAUN, Professeur, Nantes Université, Nantes

Examineurs : Anne Tailleux, Professeure, Université de Lille, Lille

Anatol Kontush, Directeur de recherche, Sorbonne Université, Paris

Virginie Mimouni, Maître de conférences, Le Mans Université

Directrice de thèse : Khadija Ouguerram,

Professeure, Université de Nantes

Co-encadrant de la thèse : El-Hassane Nazih,

Professeur, Université de Nantes



*« Ne dites pas : J'ai trouvé la vérité, mais plutôt : J'ai trouvé une vérité »*

Gibran Khalil Gibran



## REMERCIEMENTS

Je tiens par les quelques lignes qui suivent à exprimer toutes ma reconnaissance et mes sincères remerciements à celles et ceux qui m'ont accompagné pendant les quatre dernières années et qui ont permis la réalisation de ce travail. Même une pandémie mondiale n'a pas pu nous empêcher.

En premier lieu, je souhaiterais remercier ma directrice de thèse, Mme Khadija Ouguerram. Merci d'avoir cru en moi pour mener ce projet de recherche. Même si parfois je me compliquais la vie en cherchant le perfectionnisme, chacun de vos conseils a été précieux. J'espère que vous garderiez que de bons souvenirs de mon encadrement et en espérant que nos articles soient acceptés pour publication prochainement. Je vous remercie pour votre gentillesse, votre soutien et votre persévérance, et pour tout le temps que vous aviez consacré à mon projet pendant les weekends, les jours fériés et les vacances à plusieurs reprises.

Mr. Hassan Nazih, mon co-encadrant de thèse, merci pour tous vos conseils précieux. C'est à travers vous que j'ai pris connaissance de cette offre de thèse. Merci de m'avoir fait confiance, avec Mme Ouguerram pour mener ce travail. Vous m'avez poussée à me battre et persévérer face aux difficultés. Vous étiez toujours présent pour répondre à mes questions et pour m'aider.

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité INRAE 1280 « *Physiologie des Adaptations Nutritionnelles* ». Je tiens à remercier Mr Dominique Darmaun, Mme Patricia Parnet et Mr Hervé Blottière qui m'ont accueilli et encouragé à plusieurs reprises.

Je remercie l'ensemble des membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail. Mme Anne Tailleux et Mr Anatol Kontush, qui ont accepté de lire et d'évaluer ce manuscrit de thèse ainsi que Mr Dominique Darmaun, Mme Virginie Mimouni, Mme Khadija Ouguerram et Mr. Hassan Nazih. Je vous exprime ma très sincère reconnaissance. Merci au Pr. Dominique Darmaun pour avoir présidé mon jury de thèse. Votre parcours m'aurait impressionné tout au long de ces années.

Merci à Mme Anne Gabory et Mr Vincent Rioux d'avoir constitué mon comité de thèse. Votre bienveillance et vos remarques constructives ont participé au bon déroulement de cette thèse.

Merci à tous les membres de l'unité PhAN qui m'ont accueillie parmi eux et qui sont devenus ma famille en France, et qui sans eux, ce travail n'aurait pu pas aboutir. J'ai eu de la chance de connaître chacun d'entre vous.

Je remercie Geneviève, Agnès, Isabelle et Blandine qui étaient toujours présentes pour répondre à tout type de questions (secrétariat, administration française, mode et beauté...). Je vous remercie avant tout pour le soutien moral que m'aviez accordé durant ces années. Geneviève et Agnès, vous étiez toujours présentes très tôt le matin pour m'écouter en train de me plaindre. Agnès je te remercie pour proposer l'idée de m'offrir le sac Hermès pour ma soutenance de thèse, je le garderai précieusement. Aussi merci pour toujours me donner ton

avis précieux sur les échantillons de parfum que j'amenais de Sephora, je pense que je porterai la Twilly pour un moment.

Isabelle et Blandine, merci de toujours m'accueillir dans votre bureau (toutes les 5 minutes) et de répondre infiniment à mes questions. Je serai toujours reconnaissante de l'aide que vous m'aviez apporté dans la réalisation de ce projet. Bien que la quantité de travail fût grande, ça ne nous a pas empêché de nous amuser en le faisant. Je garderai de très bons souvenirs du travail avec vous.

Amandine, Alexis et Sandrine, je vous remercie pour avoir rendu la partie « expé animale » plus sympa pour moi. Les souris ApoE -/- et moi, ce n'était pas une vraie histoire d'amour...mais je raconterai toujours l'histoire des abattages réalisés en mars 2020, en plein confinement, et pandémie mondiale ! Vous m'aviez appris et aidé à m'organiser, voire à préparer les étiquettes de tubes. On a partagé les plus fous moments ensemble ! J'apprécierai pour toujours l'accueil et le soutien que vous m'aviez accordé.

Merci à l'ensemble des chercheurs : Véronique, Catherine, Valérie, Gwenola, Bertrand, Clair-Yves, Jean-Pierre, Pierre, Vincent et Francisco pour vos conseils pendant ces trois ans et pour les beaux moments partagés au sein de l'unité ou lors de nos séminaires à l'extérieur. Merci pour tous vos conseils scientifiques mais pas que ! Les échanges dans la salle de pause m'ont permis de mieux connaître la culture française.

Je tiens à remercier Marie-Cécile qui était fortement engagée à répondre à mes questions (très tôt le matin) et m'encourager à tenir jusqu'au bout durant les dernières semaines ! Préparation de ma soutenance, retour de mon article au journal et correction de ma thèse, le stress était évidemment énorme, mais tes mots étaient encourageants.

Merci à Mikael, Mathilde et Stéphanie pour votre aide technique à la plateforme. J'ai eu le plaisir de vous connaître et travailler avec vous. Mikael, je te remercie également pour tes réponses à mes questions innombrables lors de la préparation des articles.

Durant ces années, j'ai eu l'occasion de connaître d'autres doctorants : Morgane, Thomas, Anne-lise, Julie, Amran, Carla, Chloé, Juan et Paul. Chacun d'entre vous m'avait marqué par son caractère spécial. J'ai eu la chance de vous observer et d'apprendre de vous le chemin à suivre vers la réussite de la thèse. On est tous passé par le même chemin, chacun à sa façon. Je garderai des souvenirs de nos beaux moments à PhAN mais aussi de nos soirées et nos sorties.

Chloé, merci de m'avoir aidé à ranger mes 500 tubes après la manip de sécrétion hépatique de triglycérides à 19h du soir, je ne voyais pas ça venir en faisant les collectes de plasma ! je te souhaite une bonne continuation ! Profite bien de ton post-doc à Cambridge.

Juan, merci beaucoup de t'assurer que je mangeais ces dernières semaines ! et de toujours proposer ton aide bien que tu sois toi-même en surcharge de travail. Tu es d'une extrême gentillesse.

Paul, je te remercie pour être présent tout au long de cette dernière année ! Tu étais là quand je n'arrivais plus à numéroter les pages d'un fichier word mais pas que.. Merci pour les beaux moments passés à Nantes et d'avoir enrichi mon lexique de langue française. Tu as assisté (*involontaire*) aux ambiances tragiques et dramatiques que je créais sans que tu te plains.

Merci à toi et ton CHAT Ivoire pour m'avoir accueilli chez vous dans des périodes difficiles. J'espère pouvoir être là pour toi également si tu auras besoin.

Marine, bien qu'on se soit croisée pour une courte période, j'ai tellement profité de tes connaissances et de ton cahier de labo ! Ainsi que celui de Charlotte, qui n'hésitait pas à répondre à mes longs mails, point par point.

Valentine, cette expérience n'aurait pas été pareil sans tes conseils de post-doctorante. Je suis heureuse de t'avoir connue. Merci pour m'avoir poussé au fur et à mesure à appuyer le bouton « envoyer » après avoir vérifié le même document 1000 fois. Si jamais vous changez d'avis, je serais ravie de t'accueillir avec ton adorable famille au Liban pour que vous dégustiez de vrais plats libanais !

Je vous souhaite tous plein de succès dans vos vies professionnelles et personnelles.

Je remercie tous les membres de ma famille qui étaient là pour moi durant mes longues années d'études. Particulièrement, mes parents, Antoine et Diana, et mes sœurs, Janette et Jessica, merci d'avoir cru en moi et m'encouragé à aller plus loin dans mon parcours. Maman, tu es une vraie princesse. Sans vous, je n'aurais pas été là où je suis aujourd'hui. Merci pour avoir vécu tous les moments de stress, de pleures, de nuits blanches...Je vous aime tant. Les années à l'étranger sont sans doute dures pour nous tous.

A mes grands-parents et à mon Jeddo Melhem (qui a quitté ce monde), je vous aime éternellement.

A mes cousines et cousins, vous étiez également toujours à côté de moi. Je suis heureuse que vous soyez fiers de moi. Christa, mon chouchou, ça me manque de te voir grandir.

A ma meilleure amie Noura, je ne trouverai jamais assez de mots pour te remercier d'être présente pour moi 24/7 pendant les 11 dernières années, pendant les bons et les moins bons moments. Je suis tellement heureuse de t'avoir reconnue à la faculté des sciences. J'espère que les années à venir te cacheront que du bonheur.

A mes copines de fac qui sont devenues des sœurs, Lana, Aya, Zaynab, Batoul, Maha et Mona, votre soutien permanent a sans doute contribué à ma réussite. Trop hâte de vous revoir au Liban prochainement.



# TABLES DES MATIERES

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS .....</b>	<b>3</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>9</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>10</b>
<b>I. Chapitre 1 : Qu'est-ce que l'athérosclérose ?.....</b>	<b>11</b>
1) Définition et épidémiologie .....	11
2) Histologie de la paroi artérielle et zones de prédilection de l'athérosclérose. ....	12
3) Physiopathologie de l'athérosclérose .....	15
i. L'initiation et la progression des plaques d'athérosclérose : rôle de l'inflammation et des lipoprotéines dans la formation de cellules spumeuses. ....	15
ii. L'évolution de l'athérosclérose : la formation des plaques fibreuses et matures et le risque de rupture.....	17
4) Classification des plaques d'athérosclérose .....	18
<b>II. Chapitre 2 : Les facteurs de risque et les marqueurs de l'athérosclérose .....</b>	<b>20</b>
1) Estimation du risque .....	20
2) Facteurs de risque.....	20
i. Dyslipidémies .....	21
a) Présentation des lipoprotéines : transporteurs plasmatiques du cholestérol et des triglycérides. ..	21
b) Rôle des dyslipidémies dans l'athérosclérose : .....	25
3) Biomarqueurs : .....	30
i. Les microARN : .....	30
<b>III. Chapitre 3 : Traitement et prévention de l'athérosclérose. ....</b>	<b>38</b>
1) Traitement et prévention de l'athérosclérose .....	38
I. Le traitement par un séquestrant des acides biliaires : la cholestyramine. ....	38
a) Synthèse et cycle entéro-hépatique des acides biliaires. ....	39
b) La cholestyramine. ....	41
c) Les voies de signalisation médiée par les acides biliaires : rôle dans le métabolisme des lipides et l'athérosclérose. ....	43
2) Le stress oxydant et l'athérosclérose. ....	45
i. Les sources du stress oxydant.....	45
ii. Les défenses antioxydantes : .....	46
<b>IV. Chapitre 4 : Période périnatale et risque cardiovasculaire. ....</b>	<b>52</b>
1) Hypercholestérolémie maternelle et risque cardiovasculaire :.....	53
2) Le stress oxydant maternel et risque cardiovasculaire.....	56
3) L'épigénétique et l'athérosclérose.....	56
4) Modèles animaux pour l'étude de l'athérosclérose.....	57
i. Les modèles de souris : .....	57
<b>V. Chapitre 5 : Traitements hypolipémiants et antioxydants de l'hypercholestérolémie maternelle.....</b>	<b>60</b>

1) Traitements hypocholestérolémiants et grossesse .....	60
2) Traitements antioxydants et grossesse .....	60
<b>HYPOTHESES, OBJECTIFS ET STRATEGIES .....</b>	<b>63</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>67</b>
1. Effet d'un traitement périnatal en un hypocholestérolémiant sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris apoE <sup>-/-</sup> .....	68
i. Principaux résultats :.....	120
ii. Discussion et conclusion .....	120
2. Effet d'un traitement périnatal avec un antioxydant sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris apoE <sup>-/-</sup> .....	123
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>156</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>162</b>

## RÉSUMÉ

L'objectif de mon projet de thèse était d'élucider les mécanismes potentiels par lesquels l'hypercholestérolémie maternelle pendant la période périnatale programme le développement de l'athérosclérose chez la progéniture adulte de souris ApoE<sup>-/-</sup> génétiquement prédisposée.

Nous avons montré qu'un traitement hypolipémiant maternel prévient le développement de l'athérosclérose chez la progéniture adulte. La cholestyramine, un agent hypocholestérolémiant dont l'utilisation est autorisée pendant la grossesse chez la femme, a été administrée aux femelles ApoE<sup>-/-</sup> pendant la gestation ou la gestation et la lactation.

La réduction des plaques d'athérome chez la progéniture des mères traitées s'est accompagnée d'une perturbation du métabolisme des acides biliaires. Chez les mâles, une diminution de la concentration des acides biliaires dans la bile a été observée. En revanche, une augmentation des acides biliaires tauro-conjugués dans le plasma a été mesurée chez les femelles. Les femelles semblaient être protégées par la réduction des niveaux de triméthylamine-N-oxyde (TMAO). En outre, une expression hépatique différentielle des miR-122, miR-223, miR-30c et miR-27 a été mesurée parmi les différents groupes de descendants. L'hypercholestérolémie s'accompagne d'un stress oxydatif important. Pour distinguer l'effet de l'hypercholestérolémie maternelle en soi de celui du stress oxydatif qui s'ensuit, des souris ApoE<sup>-/-</sup> ont été traitées avec un antioxydant, la vitamine E, pendant la gestation ou la gestation et la lactation. Les descendants des mères traitées développaient significativement moins de plaques d'athérome à 25 semaines d'âge. Un traitement périnatal combiné de ces deux traitements permet une réduction plus importante des plaques d'athérome chez la descendance mâle.

Les résultats obtenus sont encourageants et montrent qu'une modulation de l'environnement périnatal pro-athérogène pourrait être une stratégie de prévention précoce de l'athérosclérose. Cependant, les analyses en cours permettront d'élucider les mécanismes impliqués dans cet effet protecteur.

**Mots clés : Athérosclérose, DOHad, cholestyramine, vitamine E, hypercholestérolémie maternelle, acides biliaires, microARNs.**

## ABSTRACT

The aim of my PhD project was to elucidate the potential mechanisms by which maternal hypercholesterolemia during the perinatal period programs the development of atherosclerosis in the adult offspring of genetically predisposed ApoE<sup>-/-</sup> mice.

First, we showed that maternal lipid-lowering treatment prevents the development of atherosclerosis in adult offspring. Cholestyramine is a cholesterol-lowering agent, approved for use during pregnancy in women, was given to female ApoE<sup>-/-</sup> during gestation or gestation and lactation. The reduction of atherosclerotic plaques in the offspring of treated mothers was accompanied by a disturbance in bile acid metabolism. In males, a decrease in the concentration of bile acids in the bile was observed. In contrast, an increase in plasma tauro-conjugated bile acids was measured in females. Females appeared to be protected by the reduced trimethylamine N oxide levels. In addition, hepatic expression of miR-122, miR-223, miR-30c, and miR-27 were modulated in different offspring groups.

Hypercholesterolemia is accompanied by significant oxidative stress. To distinguish the effect of maternal hypercholesterolemia *per se* from that of ensuing oxidative stress, ApoE<sup>-/-</sup> mice were treated with an antioxidant, vitamin E, during gestation or gestation and lactation. The offspring of treated dams developed significantly less atherosclerotic plaques at 25 weeks old. A perinatal combined treatment using both molecules allows greater reduction of atherosclerotic plaques in male offspring.

The results obtained are encouraging and show that a modulation of the pro-atherogenic perinatal environment could be a strategy for early prevention of atherosclerosis. However, ongoing analyses will allow us to elucidate the mechanisms involved in this protective effect.

**Keywords:** atherosclerosis, DOHad, cholestyramine, vitamin E, maternal hypercholesterolemia, bile acids, microRNAs.

## LISTE DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS

Les travaux réalisés au cours de ma thèse donnent lieu aux publications et communications suivantes :

### Publications dans des revues internationales à comité de lecture

#### Article 1 :

**Marina Habib**, Mikael Croyal, Bertrand Kaeffer, Isabelle Grit, Blandine Castellano, Mathilde Gourdel, Hassan Nazih, Khadija Ouguerram (2022)

**Perinatal cholestyramine treatment reduces atherosclerosis development in adult offspring of ApoE deficient mice through sex-dependent mechanisms.** En révision dans *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.

#### Article 2:

**Marina Habib**, Mikael Croyal, Bertrand Kaeffer, Isabelle Grit, Blandine Castellano, Mathilde Gourdel, Hassan Nazih, Khadija Ouguerram (2022)

**Perinatal vitamin E treatment reduces atherosclerosis development in adult offspring of ApoE deficient mice.** En préparation

#### Article 3 :

**Marina Habib**, Mikael Croyal, Isabelle Grit, Blandine Castellano, Mathilde Gourdel, Hassan Nazih, Khadija Ouguerram (2022-2023)

**Effect of cholestyramine and/or vitamin E treatments during gestation on placental histology and function in ApoE deficient mice.** En préparation

#### Article 4 :

Marine Coué, Mikael Croyal, **Marina Habib**, Blandine Castellano, Audrey Aguesse, Isabelle Grit, Mathilde Gourdel, Hélène Billard, Olivier Lépine, Catherine Michel, Khadija Ouguerram (publié, octobre 2021)

**Perinatal Administration of C-Phycocyanin Protects Against Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice by Modulating Cholesterol and Trimethylamine-N-Oxide Metabolisms.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.

## Communications scientifiques

### Communications orales :

#### i. Congrès international:

- 90th European atherosclerosis society (EAS), Milan, Italy. (2022)

Une présentation orale « Late Breaker Session » et un poster commenté « science at a glance »

**Marina Habib**, Chloé Chaine, Mikaël Croyal, Bertrand Kaeffer, Isabelle Grit, Hassane Nazih, Khadija Ouguerram.

**Cholestyramine perinatal treatment of ApoE deficient mice reduces atherosclerotic plaques development in adult offspring.**

#### ii. Congrès National :

- Congrès annuel de l'Institut des maladies de l'appareil digestif (IMAD), Nantes, France. (2021)

**Modulation périnatale de la cholestérolémie et développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de la souris ApoE KO**

Chloé Chaine\*, **Marina Habib**, Mikaël Croyal, Bertrand Kaeffer, Isabelle Grit, Hassane Nazih, Khadija Ouguerram.

(\*Étudiante en stage de master 2 encadrée par Pr. Khadija Ouguerram et Marina Habib)

### Communications affichées et e-posters dans des congrès nationaux :

#### Posters affichés :

- 17ème congrès de la Nouvelle Société Francophone d'athérosclérose (NSFA), Biarritz, France. (2022)

**Effet d'un traitement avec un hypocholestérolémiant pendant la période périnatale sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris hypercholestérolémiques ApoE-/-.**

#### E-posters :

- « Journées de l'école Doctorale Biologie – Santé », Brest, France (2021)

**Effect of cholestyramine administration to hypercholesterolemic ApoE deficient mice during gestation on the development of atherosclerosis in adult offspring.**

- Congrès annuel de la Société Française de l'origine développementale de la santé (SF-DOHaD), Paris, France. (2021)

**Effet d'un traitement avec un hypocholestérolémiant pendant la période périnatale sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris hypercholestérolémiques ApoE<sup>-/-</sup>.**

- 16ème congrès de la Nouvelle Société Francophone d'athérosclérose (NSFA), Biarritz, France. (2021)

**Effet d'une modulation périnatale de la cholestérolémie sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris hypercholestérolémiques ApoE<sup>-/-</sup>.**

- Journées Francophones de Nutrition (JFN), Lille, France. (2021)

**Effet d'un traitement avec un hypocholestérolémiant pendant la période périnatale sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris hypercholestérolémiques ApoE<sup>-/-</sup>.**

- Journées Francophones de Nutrition (JFN). (2021)

**Effet d'une modulation périnatale de la cholestérolémie sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris hypercholestérolémiques ApoE<sup>-/-</sup>.**

**Vulgarisation scientifique :**

- **Ma thèse en 180 secondes (MT180) (Finale nantaise, mars 2022)**

Prévention des maladies cardiovasculaires : agir dès la vie intra-utérine.



## **ABREVIATIONS**

### **A**

$\alpha$ -T : alpha-tochopérol  
 $\alpha$ -TTP : alpha-tochopérol transfer protein  
ABCA1 : ATP-binding cassette 1  
Apo : apolipoprotéine

### **C**

CE : cellule endothéliale  
CETP : protéine de transfert des esters de cholestérol « cholesteryl ester transfer protein »  
CL : cholestérol non estérifié ou cholestérol libre  
CM : chylomicron  
CML : cellule musculaire lisse  
CT : cholestérol total

### **D**

DOHaD : origine développementale de la santé et des maladies

### **F**

FXR : récepteur Farnesoid X  
FXRE : élément de réponse au FXR

### **H**

HDL : lipoprotéine de haute densité  
HDLc : HDL cholestérol  
HF : hypercholestérolémie familiale  
HMGCoA : hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA

### **I**

ICAM-1 : molécule d'adhésion intercellulaire 1  
IDL : lipoprotéine de densité intermédiaire

### **L**

LCAT : lécithine cholestérol acyl transférase  
LDL : lipoprotéine de basse densité  
LDLc : LDL cholestérol  
LDLR : LDL récepteur  
LPL : lipoprotéine lipase  
Lp-PLA2 : lipoprotéine phospholipase A2  
LRP : récepteur de la famille des récepteurs au LDL « LDL receptor-related protein »

### **M**

MCP-1 : protéine chimio attractive de monocytes 1  
MCV : maladie cardiovasculaire  
MMP : métalloprotéinase  
MiR : microARN, micro Acide Ribonucléique  
MTTP : protéine de transfert de triglycérides microsomale « Microsomal triglyceride transfer

protein »

## **N**

NO<sub>2</sub> : dioxyde d'azote

## **O**

O<sub>2</sub><sup>°-</sup> : anion superoxyde

OH<sup>°</sup> : radical hydroxyle

OMS : organisation mondiale de la santé

Ox-LDL : LDL oxydé

## **P**

PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes

PL : phospholipide

PROCAM : étude prospective cardiovasculaire de Munster

## **R**

RCT : transport reverse du cholestérol ou voie retour du cholestérol

## **S**

SAH : S-adenosylhomocysteine

SAM : S-adenosylhomocysteine

SR-B1 : gène codant pour le membre 1 de la classe B du récepteur scavenger

SOD : superoxyde dismutase

SRA : récepteur scavenger A

SR-B1 : membre 1 de la classe B du récepteur scavenger

## **T**

TG : triglycéride

TGF : facteur de croissance transformant

TMA : triméthylamine

TMAO : triméthylamine oxydée

## **V**

VCAM-1 : protéine d'adhésion cellulaire vasculaire 1

VLDL : lipoprotéines de très basse densité

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. L'histoire naturelle de l'athérosclérose.(Strong et al., 1992).....	13
Figure 2. La structure de la paroi endothéliale. ....	14
Figure 3. Les sites de prédiction de l'athérosclérose au niveau de l'aorte entière de la souris. (Nakashima et al., 1994).....	15
Figure 4. La pathogenèse de l'athérosclérose.(Steinl & Kaufmann, 2015) .....	17
Figure 5.Facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. (Alves-Silva et al., 2021).....	21
Figure 6. Structure d'une lipoprotéine .....	22
Figure 7. Métabolisme des lipoprotéines.(Sanllorente et al., 2021) .....	25
Figure 8. L'orchestration par les miR de l'homéostasie du cholestérol et de l'activation des macrophages dans l'athérosclérose. (Feinberg & Moore, 2016).....	33
Figure 9. Les miR peuvent moduler de manière positive ou négative plusieurs processus impliqués dans l'athérogenèse.(Aranda et al., 2013) .....	36
Figure 10. Les Voies de synthèse des acides biliaires. (Chiang & Ferrell, 2020) .....	41
Figure 11. Le cycle entero-hépatique des acides biliaires.(Vourakis et al., 2021) .....	42
Figure 12. La défense antioxydante enzymatique. (Sharifi-Rad et al., 2020) .....	47
Figure 13. Les huit formes de vitamine E (Hunter & Cahoon, 2007) .....	48
Figure 14.Programmation développementale des maladies cardiovasculaires. (Palinski, 2014) .....	53
Figure 15. Transfert placentaire du cholestérol. (modifiée de (Palinski, 2009a).....	55
Figure 16. Effet d'un traitement périnatal avec la cholestyramine. ....	160
Figure 17. Effet d'une supplémentation périnatal avec la vitamine E.....	161

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des plaques selon l'AHA. (Virmani et al., 2000) .....	19
Tableau 2. Caractéristiques des lipoprotéines plasmatiques humaines. (Feingold, 2021) .....	22
Tableau 3. Les apports nutritionnels recommandés de vitamine E.....	49

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

# I. Chapitre 1 : Qu'est-ce que l'athérosclérose ?

## 1) Définition et épidémiologie

Le mot « athérosclérose » provient de l'association de deux termes grecs : « athera » qui signifie la bouillie et « sklêros » pour dur et désigne une pathologie correspondant à des dépôts de lipides ou « athérome » entourés d'une chape fibreuse ou « sclérose » au niveau de l'intima des artères (J.-J. Li & Fang, 2004). Auparavant, l'athérosclérose était considérée comme le résultat d'une accumulation passive de lipides dans la paroi vasculaire. Puis, avec la progression des techniques histologiques et moléculaires, il s'est avéré que cette maladie, complexe, résulte de l'interaction entre, au moins, les cellules endothéliales et musculaires lisses du vaisseau sanguin, les lipoprotéines plasmatiques et les cellules sanguines inflammatoires (Hennig, 1988; Schaftenaar et al., 2016). En 1999, Russell Ross définit l'athérosclérose comme maladie inflammatoire (Ross, 1999).

L'athérosclérose est une pathologie progressive, qui commence dès le stade fœtal (Napoli et al., 1997) et se développe durant l'adolescence (Stary, 1989; Strong, 1999). Dénommée « tueur silencieux », elle est souvent détectée à l'âge adulte à des stades avancés suite à des manifestations cliniques graves, comme l'ischémie cardiaque, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), et l'infarctus du myocarde, rendant ainsi les interventions préventives particulièrement compliquées (**Figure 1**).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent la cause majeure de mortalité dans le monde. Entre les années 1930 et 1965, les Etats-Unis ont connu un pic des mortalités dues aux MCV, qualifiées comme « épidémie du vingtième siècle » (Dalen et al., 2014). En 2019, les MCV sont responsables d'environ un tiers de tous les décès (32%), soit 17,9 millions de personnes, majoritairement suite aux cardiopathies ischémiques et aux AVC (16% et 11% respectivement) (<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>).

En Europe, 47% des mortalités chez les femmes sont dues aux MCV et 39% chez les hommes. Finalement, les MCV chargent les ressources sanitaires mondiales de sommes considérablement élevées, estimées à 210 millions d'euros pour l'Union Européenne en 2015, et 15.1 millions d'euros en France (Timmis et al., 2020). D'ici 2025, l'OMS vise à réduire de 25 % (par rapport à 2010) la prévalence de l'hypertension artérielle, un facteur de risque important de l'athérosclérose et des MCV.

Historiquement, la paléopathologie a mis en évidence la présence de calcifications athéromateuses dans des momies préservées au cours des anciennes civilisations de l'Égypte, du Pérou, dans le sud-ouest américain et les îles Aléoutiennes (Thompson et al., 2013), démontrant que l'athérosclérose est une pathologie universelle indépendante des races, des ethnies et des cultures. La momie naturellement préservée d'Ötzi, l'Homme des glaces (Murphy et al., 2003), ainsi que les momies de Lady Teye (Allam et al., 2011) et du Pharaon Menephtah d'Égypte (Shattock, 1909) sont parmi les plus fameuses momies décrites à la fin du dix-neuvième siècle et au début du vingtième siècle et qui présentaient des plaques d'athérosclérose.

## 2) Histologie de la paroi artérielle et zones de prédilection de l'athérosclérose.

L'athérogenèse peut être définie par « les modifications précoces de la paroi artérielle qui sont associés à l'athérosclérose », qui touchent les vaisseaux de moyen et grand calibre (Badimon & Llorente-Cortés, 2004). Il est donc nécessaire de comprendre l'organisation et le fonctionnement de la paroi artérielle.

Une paroi régulière des vaisseaux sanguins se compose de trois couches (ou tuniques, tunica) concentriques, anatomiquement et fonctionnellement différentes : l'intima, la media et l'adventice (**Figure 2**).

- **L'intima** : est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) qui couvre le côté luminaire de la totalité du système vasculaire. Elle se repose sur des éléments de la matrice extracellulaire, essentiellement des protéoglycanes et du collagène, qui forment une membrane interne élastique. L'endothélium forme une barrière physique entre le sang et les tissus sous-jacents. En outre, cet emplacement stratégique lui permet de percevoir et transmettre toute modification mécanique ou chimique du sang vers les couches sous-jacentes de la paroi artérielle, comme dans le cas de perturbations du flux sanguin ou de la biodisponibilité de métabolites. Une importance majeure de l'endothélium réside derrière sa capacité à sécréter des facteurs vasodilatateurs, vasoconstricteurs et anti-coagulants.

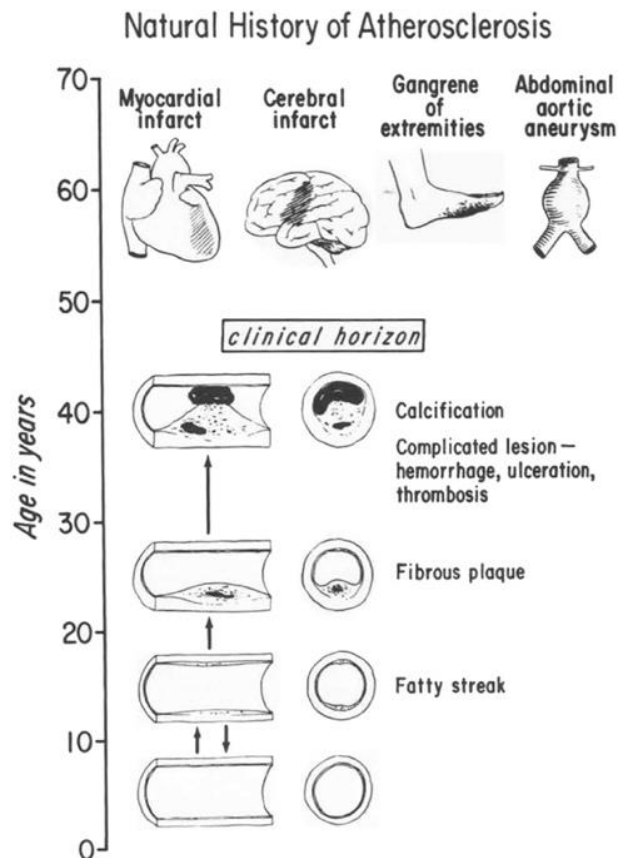
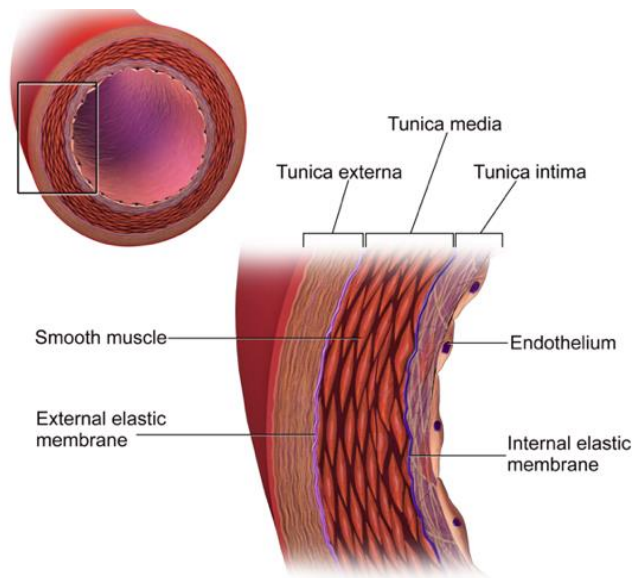


Figure 1. L'histoire naturelle de l'athérosclérose.(Strong et al., 1992)

- **La media** : est la couche médiane formée par la superposition de plusieurs couches spiralées de cellules musculaires lisses (CML), avec un réseau de collagène et d'élastine. Elle est impliquée dans la vasomotricité ainsi que le tonus musculaire.
- **L'adventice** : est la couche la plus externe, constituée d'une grande variété de composants tels que les fibroblastes, les cellules inflammatoires, les cellules souches / progénitrices et le vasa vasorum. C'est un tissu connectif qui peut agir comme une unité de traitement centrale biologique dans la fonction de la paroi vasculaire. Elle est le site de terminaisons nerveuses, et assure la continuité avec les organes sous-jacents via le tissu adipeux périvasculaire.

Dans les vaisseaux de grands calibres comme les artères, ces deux dernières couches sont bien prononcées alors qu'elles sont plus fines dans les artérioles et les veinules (Rhodin, 1968).



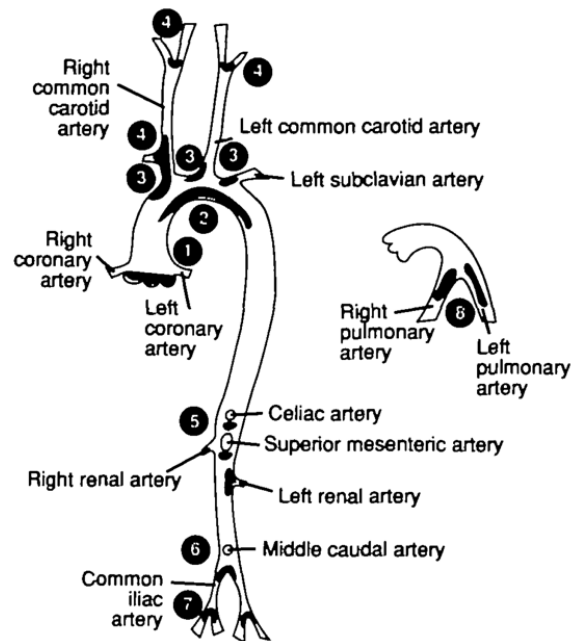


**Figure 2. La structure de la paroi endothéliale.**

La distribution des plaques d'athérosclérose tout au long du système vasculaire est irrégulière. Leur localisation dépend de la dynamique du flux sanguin (pression, forces de cisaillement, turbulences, stagnation) définissant des « zones de prédilection d'athérosclérose ». Ainsi, les plaques sont essentiellement retrouvées dans les sites de séparation de l'écoulement sanguin et les zones où la contrainte de cisaillement est oscillante, comme dans la courbe interne des artères coronaires, plus près des branches latérales, dans l'arc aortique et dans le bulbe des carotides (Chatzizisis et al., 2007; Wentzel et al., 2005) **(Figure 3)**.

En effet, dans les zones où le flux sanguin est laminaire, les jonctions entre les CE sont serrées et la forme de l'endothélium est régulière. La perturbation du flux sanguin, dans les régions de transitions vasculaires comme les bifurcations, résulte en une forme polygonale et une orientation irrégulière des CE, rendant l'endothélium perméable aux macromolécules comme les lipoprotéines de faibles densités (LDL).

Une désorganisation de la paroi artérielle ainsi que sa fragilisation suite à une infection d'origine virale (le cytomégalovirus) ou bactérienne (*Chlamydomphila pneumoniae*, le candidat le plus prometteur et le plus étudié) et à une réaction immunologique favorisent aussi l'accumulation des plaques d'athérome (Libby et al., 1997).



**Figure 3. Les sites de prédiction de l'athérosclérose au niveau de l'aorte entière de la souris.**  
(Nakashima et al., 1994)

### 3) Physiopathologie de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie progressive dont le développement s'étend sur plusieurs décennies au cours de la vie de l'Homme en trois étapes majeures : l'initiation, la progression et l'évolution (**Figure 4**). Trois types de lésions sont ainsi distingués : les stries graisseuses, les lésions fibreuses et les lésions avancées après la calcification et l'ulcération à la surface luminale.

- i. L'initiation et la progression des plaques d'athérosclérose : rôle de l'inflammation et des lipoprotéines dans la formation de cellules spumeuses.

Les études chez l'Homme ainsi que chez les modèles animaux d'athérosclérose ont montré que l'infiltration et la rétention des lipoprotéines, transporteurs plasmatiques du cholestérol, en sous-endothélial, est le facteur majeur responsable du déclenchement de l'athérogenèse. Un déséquilibre entre le flux d'entrée et de sortie de cholestérol au niveau de l'intima est responsable de son accumulation (Proctor & L. Mamo, 1998). Dans le cas d'hypercholestérolémie, l'augmentation de concentrations des lipoprotéines plasmatiques augmentent leurs flux d'entrée. De même, un flux sanguin turbulent, comme dans les zones des prédispositions d'athérosclérose, contribue à leur rétention dans l'intima. Il est maintenant démontré que les lipoprotéines athérogènes sont celles contenant l'apolipoprotéines B

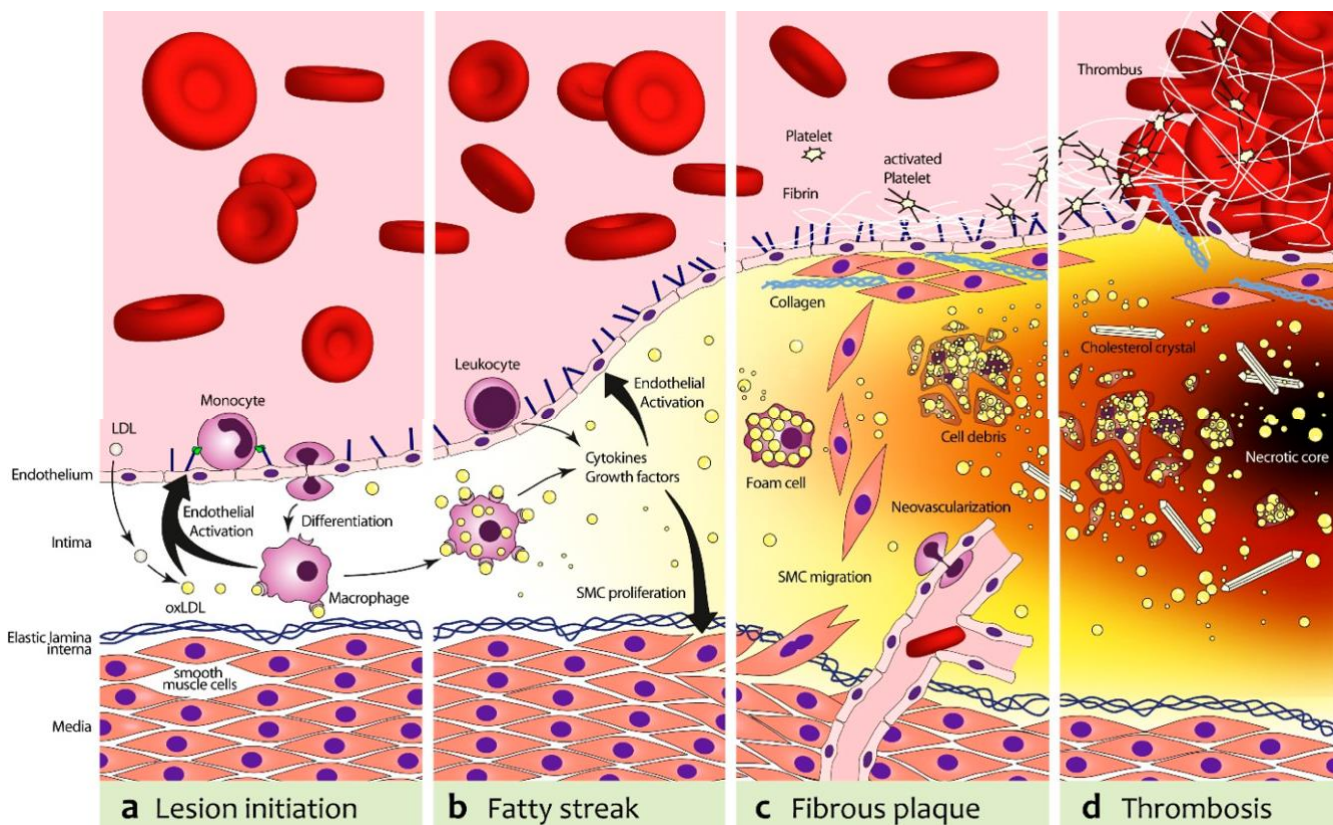
(ApoB), particulièrement celles de faible densité (LDL), qui sert de ligand pour le récepteur aux LDL. La lipoprotéine (a) (Lp(a)) est une LDL avec un polypeptide supplémentaire « apolipoprotéine a » lié, par des ponts disulfures, à l'ApoB. A leur tour, les protéoglycanes et le collagène de la matrice extracellulaire interagissent avec l'apoB des LDL, et favorisent leur fixation en sous-endothélial, diminuant ainsi leur flux de sortie (Tabas et al., 2007). Piégées dans l'espace sous endothélial, les LDL sont sujettes à plusieurs types de modifications et qui peuvent toucher différents constituants, parmi lesquelles : l'oxydation la plus étudiée dans l'initiation de l'athérogenèse, la glycosylation qui est plus importante chez les personnes diabétiques et corrèle avec le taux de glucose, et la carbamylation fréquente chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique et les gros fumeurs (Alique et al., 2015).

Les propriétés athérogènes des LDL sont acquises suite à leur oxydation par les radicaux libres générés dans les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses. La peroxydation est une réaction progressive initiée suite à un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-oxydants en faveur des pro-oxydants. En effet, la richesse des LDL en acides gras polyinsaturés (AGPI) les rend très vulnérables à l'oxydation par les radicaux libres tels que le radical hydroxyle ( $\text{OH}^*$ ) ou le radical peroxyde ( $\text{RO}_2^*$ ) par perte d'un atome d'hydrogène d'un groupement méthylène en double liaison, ou par les lipoxygénases (12/15 lipoxygénase). Les LDL oxydées (ox-LDL) générées à ce stade sont pro-inflammatoires mais minimalement oxydées donc pas reconnues par les macrophages. Cette peroxydation peut se propager vers d'autres chaînes d'acides gras et entraîner la formation d'hydroperoxydes lipidiques (Yin et al., 2011). De plus, la fragmentation des acides gras polyinsaturés par peroxydation génère des aldéhydes et des cétones souvent toxiques. Notamment, les aldéhydes se lient aux résidus lysine de l'ApoB des LDL et augmentent sa charge négative. Cette réaction aboutit à la formation des ox-LDL, qui perdent leur affinité aux LDL-récepteurs (LDLR) suite à la modification de l'ApoB, et qui seront internalisés par les macrophages et les CML exprimant les récepteurs éboueurs (scavenger receptors, SR) de classe A à leurs surfaces (SRA) (de Winther & Hofker, 2000). Les LDL minimalement oxydées induisent l'expression des molécules d'adhésion des leucocytes (E et P-sélectines, la molécule d'adhésion intercellulaire 1 ou ICAM-1 et la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1 ou VCAM-1) par les cellules endothéliales (Z. M. Dong et al., 1998; Nakashima et al., 1998). Ils ont également une capacité chimio-attractante pour les monocytes (comme la protéine chimio-attractante monocyttaire 1 ou MCP-1). Les monocytes ainsi recrutés transmigrent et se prolifèrent dans le compartiment

sous-endothélial où elles sont piégées. Contrairement aux LDL, les SR ne sont pas sous le contrôle négatif du contenu intracellulaire en cholestérol. Ces monocytes internalisent alors les ox-LDL de manière non-contrôlée, se transforment en macrophages sous l'action du facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF) et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF). La formation des cellules spumeuses, macrophages gorgés de lipides caractéristiques des stries graisseuses de l'athérosclérose, est entraînée par des LDL fortement oxydées par les espèces réactives à l'oxygène mais aussi d'autres enzymes comme la myéloperoxydase et la sphingomyélinase.

- ii. L'évolution de l'athérosclérose : la formation des plaques fibreuses et matures et le risque de rupture.

La mort programmée des cellules spumeuses par apoptose libère leur contenu en lipides et lipoprotéines oxydées. En parallèle, les macrophages infiltrés secrètent des facteurs de croissance et des cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale (TNF)- $\alpha$ , l'interleukine (IL)-1 $\beta$  ou IL-6, ainsi que le ligand CD40 et le ligand (CD154) et les collagénases interstitielles (métalloprotéinase matricielle : MMP-1, MMP-8, MMP-13), perpétuant l'inflammation locale et contribuant à la rupture de la plaque.



**Figure 4.** La pathogenèse de l'athérosclérose. (Steinl & Kaufmann, 2015)

Les cellules infiltrées libèrent également des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance transformant (TGF) induisant la migration et la prolifération des CML de la media vers l'intima et le rétrécissement progressif de la lumière du vaisseau. Les CML de la media ont une capacité de prolifération importante. Les lymphocytes B et T rejoignent les macrophages dans l'intima pendant l'évolution de la plaque. Les plaques fibreuses ainsi formées sont caractérisées par un cœur nécrotique riche en lipides extracellulaires libres et des esters de cholestérol, entouré par une matrice de cellules musculaires lisses. Le développement de la plaque d'athérome se fait en direction excentrique sans altérer le calibre vasculaire suite à l'adaptation des vaisseaux sanguins par l'élargissement compensateur ou « le remodelage vasculaire ». Ce remodelage n'est valable que pour une réduction de la lumière artérielle inférieure à 40%. Dépassant cette limite, le remodelage excentrique n'est plus efficace et une obstruction progressive de la lumière artérielle se manifeste (Glagov et al., 1987). Il semble que la composition de la plaque ainsi que sa vulnérabilité déterminent le risque des manifestations cliniques sévères induites par la thrombose. Les thrombus sont initiés par l'érosion du tissu endothélial (ulcération de la plaque, 40% des cas) ou suite à la rupture des plaques (60% des cas). La thrombogénicité du cœur de la lésion dépendrait de la présence du facteur tissulaire, produit par les CE et les macrophages et jouant un rôle clé dans l'initiation de la coagulation. Les lésions athérosclérotiques peuvent également être influencées par la calcification et la néovascularisation, caractéristiques communes des lésions avancées.

#### 4) Classification des plaques d'athérosclérose

L'Association Américaine du Cœur (AHA, American Heart Association) a recommandé une classification en chiffres romains des lésions athérosclérotiques en se basant sur la nature de leurs composants et leurs structures (**Table 1**). Cette classification a été ultérieurement simplifiée en utilisant une description morphologique des plaques, dépendant essentiellement de l'état de la chape fibreuse.

Terms for Atherosclerotic Lesions in Histological Classification		Other Terms for the Same Lesions Often Based on Appearance to the Unaided Eye	
Type I lesion	Initial lesion	} Fatty dot or streak	} Early lesion
Type II lesion			
IIa	Progression-prone type II lesion		
IIb	Progression-resistant type II lesion		
Type III lesion	Intermediate lesion (preatheroma)		
Type IV lesion	Atheroma	} Atheromatous plaque, fibrolipid plaque, fibrousplaque, plaque	} Advanced lesions, raised lesions
Va	Fibroatheroma (type V lesion)		
Vb	Calcific lesion (type VII lesion)		
Vc	Fibrotic lesion (type VIII)		
Type VI lesion	Lesion with surface defect and/or hematoma/hemorrhage and/or thrombotic deposit	Complicated lesion, complicated plaque	

**Tableau 1. Classification des plaques selon l'AHA. (Virmani et al., 2000)**

## II. Chapitre 2 : Les facteurs de risque et les marqueurs de l'athérosclérose

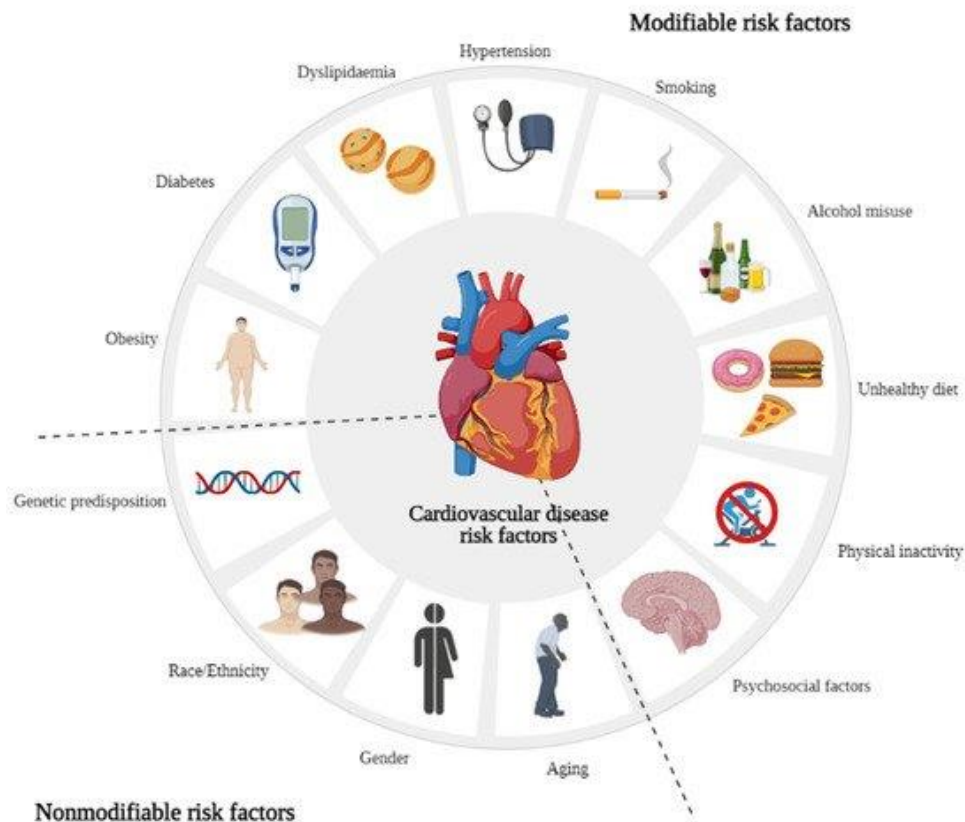
### 1) Estimation du risque

Le risque cardiovasculaire total est défini comme la probabilité d'événements cardiovasculaires pendant une période donnée. Une estimation efficace du risque cardiovasculaire est cruciale pour la prévention primaire des MCV chez les personnes asymptomatiques, et prend en compte les facteurs de risque traditionnels et émergents.

Cette estimation se base sur le nombre de facteurs de risque présents chez un individu simultanément, et est réalisée à l'aide de modélisations statistiques ou « scores d'estimation du risque » développées pour cet objectif comme le score de Framingham (FRS) (le plus utilisé) (D'Agostino et al., 2008), le score de risque de Framingham modifié (MFRS), le score Prospective Cardiovascular Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) et le Systematic Coronary Risk Evaluation (SCORE) (Yalcin et al., 2012). Les systèmes de score sont évalués régulièrement afin de prédire au mieux le risque de MCV (Brown & Bittner, 2008). Généralement, les chercheurs ajustent les scores selon les populations cibles et leurs différentes régions géographiques, ou développent leur propre outil d'évaluation (P. W. F. Wilson et al., 1998).

### 2) Facteurs de risque

Les études dans de larges cohortes, comme « Framingham Heart Study » et « Seven countries Study », ont permis d'identifier les facteurs de risque majeurs de l'athérosclérose. Ces derniers peuvent être de nature non-modifiable, notamment l'hérédité, l'âge et le sexe. Les taux d'incidence de premiers événements cliniques liés aux MCV parviennent avec un écart de 7 à 10 ans plus tardivement chez les femmes que chez les hommes. De plus, les femmes après la ménopause présentent un risque accru l'athérosclérose lié à la réduction de la production d'œstrogènes (Witteman et al., 1989). D'autres facteurs de risque sont modifiables et sont ainsi la cible des interventions thérapeutiques visant à réduire le risque des MCV comme : les dyslipidémies, l'hypertension artérielle, le syndrome métabolique, un mode de vie sédentaire et le tabagisme (**Figure 5**). Depuis plusieurs années, les chercheurs se sont également intéressés à la qualité de vie pendant la période périnatale et la programmation de l'athérosclérose à l'âge adulte. Ce facteur de risque périnatal sera détaillé dans le chapitre 4.



**Figure 5. Facteurs de risque des maladies cardiovasculaires.** (Alves-Silva et al., 2021)

Nous nous focaliserons en particulier sur les dyslipidémies relatives aux taux de cholestérol plasmatique, le facteur de risque majeur de l'athérosclérose.

### i. Dyslipidémies

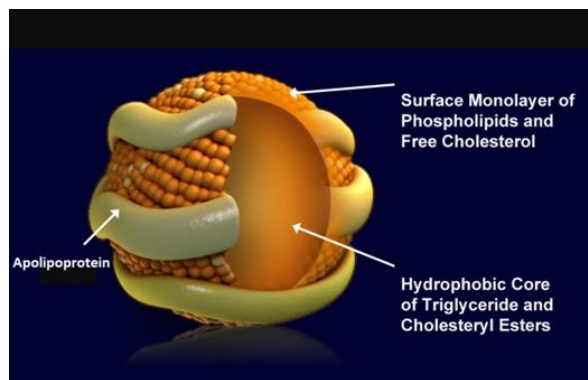
Les dyslipidémies constituent les principaux facteurs de risque de l'athérosclérose. La famille des lipides est très hétérogène et regroupe des molécules structurellement et fonctionnellement diversifiées. Le cholestérol et les triglycérides sont les lipides les plus abondants dans le plasma et proviennent de deux sources principales : l'absorption intestinale des lipides d'origines alimentaires et la biosynthèse surtout au niveau hépatique. L'hypercholestérolémie ainsi que l'hypertriglycéridémie sont couramment associées aux maladies coronaires.

- a) Présentation des lipoprotéines : transporteurs plasmatiques du cholestérol et des triglycérides.

La propriété hydrophobe du cholestérol et des triglycérides implique leur association avec des protéines afin d'assurer leur transport dans le plasma. Les lipoprotéines sont des particules



complexes avec un noyau central hydrophobe contenant des esters de cholestérol et des triglycérides et une structure périphérique hydrophile composée de phospholipides, du cholestérol libre et d'apolipoprotéines (**Figure 6**), qui ont pour rôle d'assurer ce transport. Les apolipoprotéines jouent un rôle structural important dans les lipoprotéines et guident leur formation. De plus, elles agissent comme ligands des récepteurs ou co-facteurs d'enzymes déterminant ainsi le métabolisme des lipoprotéines (Feingold, 2021). En fonction de leurs densités hydratées dans le sang, leurs tailles, leur composition lipidique et des apolipoprotéines associées, les lipoprotéines plasmatiques peuvent être divisées en sept classes : chylomicrons, chylomicrons résiduelles, VLDL, IDL, LDL, HDL (pré-bêta HDL, HDL<sub>3</sub> et HDL<sub>2</sub>) et Lp (a). (**Tableau 2**). Seules les HDL présentent des propriétés antiathérogènes, alors que les restes de chylomicrons, les VLDL, les IDL, les LDL et les Lp(a) sont pro-athérogènes.



**Figure 6. Structure d'une lipoprotéine**

Lipoprotein	Density (g/ml)	Size (nm)	Major Lipids	Major Apoproteins
Chylomicrons	<0.930	75-1200	Triglycerides	Apo B-48, Apo C, Apo E, Apo A-I, A-II, A-IV
Chylomicron Remnants	0.930- 1.006	30-80	Triglycerides Cholesterol	Apo B-48, Apo E
VLDL	0.930- 1.006	30-80	Triglycerides	Apo B-100, Apo E, Apo C
IDL	1.006- 1.019	25-35	Triglycerides Cholesterol	Apo B-100, Apo E, Apo C
LDL	1.019- 1.063	18- 25	Cholesterol	Apo B-100
HDL	1.063- 1.210	5- 12	Cholesterol Phospholipids	Apo A-I, Apo A-II, Apo C, Apo E
Lp (a)	1.055- 1.085	~30	Cholesterol	Apo B-100, Apo (a)

**Tableau 2. Caractéristiques des lipoprotéines plasmatiques humaines.** (Feingold, 2021)

Le foie est l'organe central qui orchestre le métabolisme des lipides. Le métabolisme des lipoprotéines se divise ainsi en trois parties : la voie exogène (de l'intestin vers le foie), la voie endogène (du foie vers les autres tissus) et le transport inverse du cholestérol (des tissus vers le foie). (Kwan et al., 2007) (**Figure 7**).

#### La voie exogène : métabolisme des chylomicrons.

Cette voie commence dans l'intestin et permet le transfert des lipides alimentaires, via les chylomicrons, vers l'organisme. Les lipases intestinales hydrolysent les TG en acides gras libres et monoacylglycérol, qui grâce à la bile, seront émulsifiés avec des acides biliaires, du cholestérol, des stérols végétaux et des vitamines liposolubles pour former des micelles permettant leur absorption intestinale. L'absorption du cholestérol et des stérols végétaux de la lumière intestinale vers les cellules intestinales est facilitée par un transporteur de stérols, la protéine Niemann-Pick C1- like 1 (NPC1L1). Dans les entérocytes, le cholestérol est estérifié par l'acyl-CoA cholestérol acyl transférase 2 (ACAT-2). Sous l'action de la monoacylglycérol acyltransférase (MGAT) et la diacylglycérol transférase (DGAT), les acides gras libres et les monoacylglycérols absorbés forment les triglycérides, qui avec les esters de cholestérol sont conditionnés en chylomicrons dans le réticulum endoplasmique. L'ApoB-48 synthétisée par les entérocytes est associée aux chylomicrons sécrétés dans la lymphe ensuite dans la circulation systémique. L'hydrolyse intravasculaire des TG des chylomicrons par la lipoprotéine lipase (LPL) permet la distribution des acides gras vers différents organes exprimant la LPL et conduit à la formation d'un « reste de chylomicrons ou remnant chylomicrons ». Il s'agit de lipoprotéines enrichies en esters de cholestérol qui expriment l'ApoE permettant leur élimination par le foie. De même, le transfert de l'ApoC-II des chylomicrons vers les HDL diminue la capacité de la LPL à poursuivre la dégradation des triglycérides. (Dash et al., 2015)

#### La voie endogène : métabolisme des LDL et VLDL

Le processus de synthèse du cholestérol comprend une série d'étapes enzymatiques à partir d'un précurseur principal qui est l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA). Une fois l'hydroxyl-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) est généré à partir de l'acétoacetyl-coA, sa réduction en mévalonate par l'HMG-CoA réductase serait l'étape limitante dans la voie de synthèse. Après sa synthèse, le cholestérol est estérifié par l'action de l'ACAT-2 et est incorporé dans les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) contenant l'apolipoprotéine B (ApoB-100), par l'action de la protéine de transfert « microsomal triglyceride transfer protein » (MTTP). Les

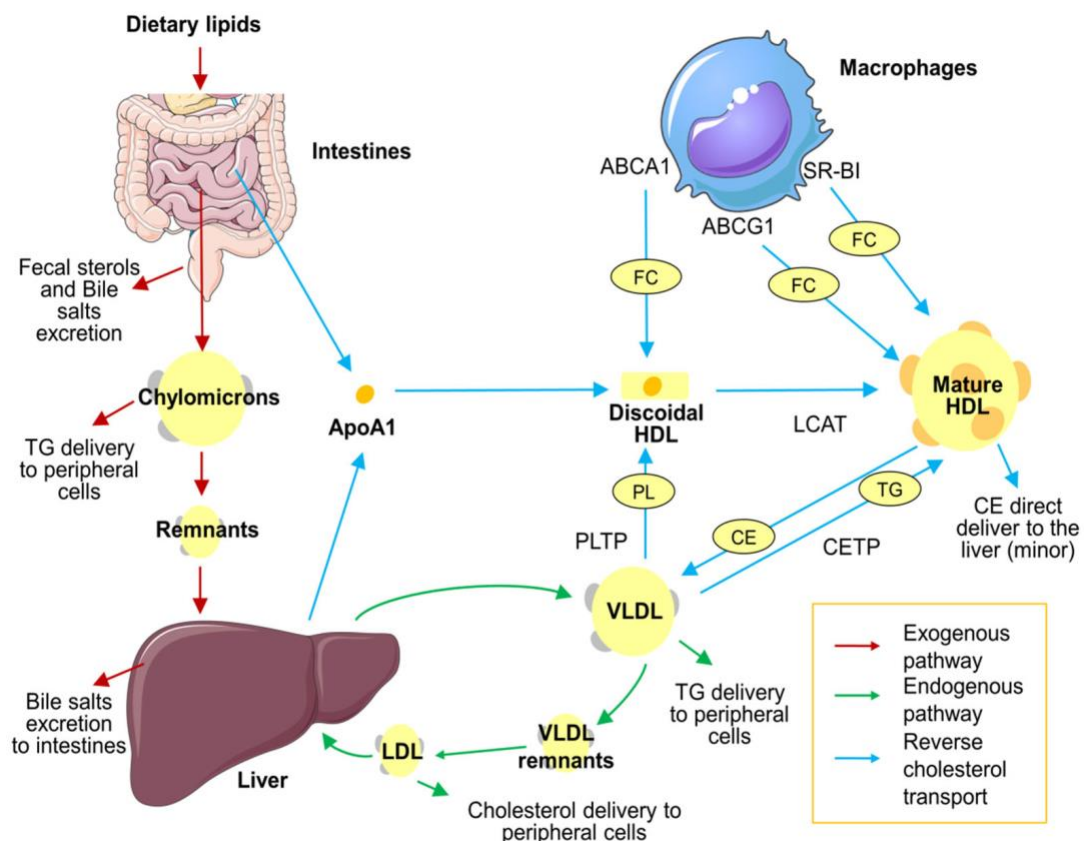
VLDL transportent les triglycérides vers les tissus périphériques où ces derniers sont hydrolysés par la LPL libérant ainsi les acides gras, et les restes de VLDL (lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL). Ces particules IDL sont relativement enrichies en esters de cholestérol et acquièrent l'ApoE des particules HDL qui leur permettent, en partie, de se lier aux récepteurs LDL et LRP (LDL receptor-related protein). Les triglycérides restants dans les particules IDL sont hydrolysés par la lipase hépatique, et les apolipoprotéines échangeables sont transférées des particules IDL à d'autres lipoprotéines, ce qui conduit à la formation de LDL. Ces particules LDL contiennent principalement des esters de cholestérol et de l'Apo B-100. Ainsi, les LDL sont un produit du métabolisme des VLDL. Les récepteurs aux LDL assurent l'élimination des LDL de la circulation. Les récepteurs aux LDL hépatiques sont responsables de la clairance d'environ 70 % par endocytose, le reste étant absorbé par les tissus extra-hépatiques. Leur expression est régulée par le contenu hépatique du cholestérol, l'activité de la PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) et l'IDOL (Inducible Degradator of the LDL receptor) (Afonso et al., 2018).

#### Le transport inverse de cholestérol : métabolisme des HDL

Le transport inverse du cholestérol est un mécanisme par lequel l'organisme élimine l'excès de cholestérol des tissus périphériques vers le foie, où il sera éliminé dans la bile. Les principales lipoprotéines impliquées sont les HDL.

L'ApoA-I est l'apolipoprotéine principale des HDL, majoritairement synthétisée par le foie et l'intestin. Les HDL naissantes discoïdales (pré-bêta HDL) acquièrent du cholestérol et des phospholipides éliminés par l'ABCA1 (ATP-Binding Cassette Transporter A1) exprimé dans des cellules comme les hépatocytes, les entérocytes et les macrophages, et forment ainsi les HDL matures (HDL<sub>3</sub>). ABCG1 (ATP-Binding Cassette Transporter G1) et SR-B1 (Scavenger Receptor B1) permettent aussi l'efflux du cholestérol des cellules vers les particules HDL matures, ainsi qu'une diffusion passive. Dans le plasma, la lécithine-cholestérol acétyltransférase (LCAT), qui se trouve à la surface des HDL, estérifie le cholestérol libre. Dans le foie, SR-B1 permet l'absorption sélective du cholestérol des HDL par la liaison de l'ApoA-I. Le cholestérol estérifié des HDL peut également être transféré aux VLDL en échange des TG ou aux LDL en échange des esters du cholestérol par la CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) (Bruce et al., 1998; Marques et al., 2018). Les HDL proviennent également des éléments de surface libérés lors de l'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons et VLDL. Cette voie de synthèse contribue majoritairement aux taux de HDL-cholestérol chez l'Homme (Nikkilä et al., 1987) et leur

confère un rôle athéro-protecteur en assurant l'élimination du cholestérol de la circulation et réduisant ainsi son accumulation dans la paroi artérielle. En effet, le cholestérol dérivant de la lipolyse est également estérifié sous l'action de la LCAT, ce qui permet son élimination au niveau du foie via le récepteur SR-BI. Cette voie est dénommée « le transport inverse du cholestérol résiduel » (Kontush, 2020).



**Figure 7. Métabolisme des lipoprotéines.**(Sanllorente et al., 2021)

b) Rôle des dyslipidémies dans l'athérosclérose :

Le rôle causal du cholestérol dans la pathogenèse de l'athérosclérose a été mis en évidence depuis plus d'un siècle, quand Anitschkow a détecté la formation des plaques d'athérome chez les lapins nourris d'un régime enrichi en cholestérol (Finking & Hanke, 1997). Chez l'Homme, les études épidémiologiques ont également permis de prouver la présence d'un lien entre le cholestérol et l'athérosclérose (Kannel, 1961; Stamler et al., 1986). L'étude de Framingham a constaté une association entre le taux de cholestérol et des décès par MCV. Par tranche de 10 mg/dL de cholestérol, le taux de décès augmente de 9 % chez les personnes de moins de 50

ans (Kannel, 1961). Plus tard, le rôle pro-athérogène du LDL-cholestérol (Castelli et al., 1986) a été distingué du rôle antiathérogène du HDL-cholestérol (Gordon et al., 1986). La classification des taux de cholestérol ainsi que celui associé aux lipoprotéines et les triglycérides plasmatiques, d'après l'Adult Treatment Panel III (ATP III), est la suivante :

- Taux de triglycérides à jeun :

Normal : moins de 150 mg/dL

Hypertriglycéridémie légère : 150 à 499 mg/dL

Hypertriglycéridémie modérée : 500 à 886 mg/dL

Hypertriglycéridémie très élevée ou sévère : supérieure à 886 mg/dL

- Taux de LDL-C :

Optimal : moins de 100 mg/ dL

Presque optimal/supérieur à l'optimal : 100 à 129 mg/dL

À la limite de l'optimal : 130 à 159 mg/dL

Élevé : 160 à 189 mg/dL

Très élevé : supérieur à 190 mg/dL

- Taux de HDL :

Faible : inférieur à 40 mg/dL chez l'homme et inférieur à 50 mg/dL chez la femme

Élevé : supérieur ou égal à 60.

*(Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001)*

Tout dérèglement des taux optimaux des lipoprotéines comme une augmentation des taux des LDL-c ainsi que la diminution du HDL-c, prédispose la personne aux MCV. Les taux de LDL-cholestérol optimaux sont conseillés relativement à la présence d'autres facteurs de risque des MCV. Notamment, il est conseillé de maintenir la cholestérolémie inférieure à 160 mg/dL avec un facteur de risque important, ou inférieure à 130 mg/dL avec deux facteurs de risque cardiovasculaire.

Une classification internationale des dyslipidémies a été établie selon le phénotype « Classification de Fredrickson » en fonction de la lipoprotéine en question (Fredrickson, 1971). Les trois formes les plus courantes étant :

- 1) Les hypercholestérolémies familiales de type II A : Il s'agit d'une hypercholestérolémie pure liée à un défaut des LDL récepteurs hépatiques.
- 2) L'hyperlipidémie familiale combinée de type II B correspond à une augmentation à la fois des triglycérides et du cholestérol.

3) L'hypertriglycéridémie familiale de type IV suite à une surproduction des triglycérides par le foie et/ou un déficit du catabolisme des VLDL.

La dyslipidémie secondaire peut résulter du diabète sucré, de l'hypothyroïdie, de maladies obstructives du foie, de l'insuffisance rénale chronique, de médicaments qui augmentent le LDL-C, notamment les rétinoïdes, la cyclosporine A et les phénothiazines, et de médicaments qui diminuent le HDL-C, notamment les progestatifs, les androgènes, les bêta-bloquants et les stéroïdes anabolisants.

### **L'hypercholestérolémie familiale type II A :**

L'hypercholestérolémie familiale classique (HF) est une maladie génétique autosomale dominante qui touche l'activité des récepteurs aux LDL, ce qui entraîne l'accumulation des LDL-C dans le sang et augmente le risque des MCV (Goldberg et al., 2011).

Trois mutations de gènes sont aujourd'hui identifiées responsables de l'hypercholestérolémie familiale. La mutation du gène codant pour le récepteur aux LDL (LDLR), celle du gène codant pour l'apolipoprotéine B servant comme ligand aux LDLR, et celle du gène codant la « proprotéine convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) », protéine empêchant le recyclage du LDLR suite à dégradation intracellulaire (Ibrahim et al., 2022).

Les personnes présentant deux allèles mutés du récepteur des LDL (HF homozygote) ont des taux de LDL-C beaucoup plus élevés que celles présentant un seul allèle muté (HF hétérozygote). Celui-ci est supérieur à 450 mg/dl chez les homozygotes et supérieur à 190 mg/dl chez les hétérozygotes. L'HF hétérozygote touche une personne sur 500, ce qui fait de cette maladie héréditaire, la déficience monogénique dont la prévalence est la plus élevée au monde (Goldberg et al., 2011).

### **La pathogénicité des LDL : rôle de leur oxydation.**

Chez l'Homme, le cholestérol est majoritairement transporté dans la circulation par les LDL. L'hypothèse de « la réponse à la rétention » dans l'athérogenèse postule que l'événement initiateur critique est la rétention des lipoprotéines athérogènes dans la paroi artérielle, ce qui déclenche une réponse inflammatoire et induit le développement de l'athérosclérose. Notamment, les lipoprotéines contenant de l'ApoB sont retenues par une liaison ionique entre les acides aminés chargés positivement de l'ApoB avec les protéoglycanes chargés négativement de la paroi artérielle (Camejo et al., 1980; Iverius, 1972). Les deux isoformes de l'ApoB, l'ApoB-100 et l'ApoB-48, présentent des sites de liaison aux protéoglycanes. Un site

particulier qui existe sur l'ApoB100 n'est exposé que lorsque le LDL est modifié par la phospholipase A2 sécrétée (sPLA2), formant une petite particule LDL dense (Flood et al., 2004). Cependant, il a été observé que les LDL dans leur état intact, non modifiées, sont incapables d'induire la formation des cellules macrophagiques spumeuses. Steinberg et al. soutiennent l'hypothèse que l'oxydation des LDL est un stade précoce de l'athérosclérose et que les LDL oxydés (ox-LDL) participent à l'athérogenèse (Steinberg, 2009). Des études menées *in vitro* ont permis de démontrer l'implication des LDL dans plusieurs aspects de l'athérosclérose suite à leur modification par oxydation comme la formation de cellules spumeuses (O. Apostolov et al., 2013; Park, 2014) et leur accumulation dans les lésions artérielles humaines (Barbieri et al., 2004). En effet, la liaison des LDL aux protéoglycanes les rend plus sensibles à l'oxydation et à l'agrégation, ce qui favorise la formation de cellules spumeuses et déclenche une réponse pro-inflammatoire qui s'auto-entretient (détaillé dans le chapitre 1) (Levitan et al., 2010). Il est également important de noter que les LDL constituent une famille hétérogène en termes de la taille et de la teneur en cholestérol des particules. Les LDL les plus athérogènes sont celles de petite taille et de densité élevée. En effet, leur affinité réduite pour le récepteur LDL prolonge leur temps de rétention dans la circulation. En plus, leur capacité de pénétrer plus facilement dans la paroi artérielle, de se lier aux protéoglycanes dans la paroi artérielle ainsi que leur sensibilité accrue à l'oxydation peuvent expliquer leur implication dans l'initiation de l'athérosclérose (Berneis & Krauss, 2002).

### **Le rôle anti-athérogène des HDL :**

Comme décrit dans le paragraphe précédent, les HDL, sont les acteurs principaux dans le transport inverse du cholestérol (RCT), permettant le retour du cholestérol des organes périphériques vers le foie. Ce RCT concerne également le transport du cholestérol des cellules spumeuses vers le foie, donc les HDL assure l'efflux du cholestérol des macrophages, atténuant son accumulation au niveau des lésions. Au niveau du foie, les HDL interagissent avec SR-B1 pour permettant ainsi la livraison du cholestérol, étape finale du RCT. A part leur rôle dans le transport du cholestérol, les HDL présentent une large gamme de bio-activités contribuant à leur caractère antiathérogène, parmi lesquelles l'activité anti-oxydante et anti-inflammatoire (Kontush, 2014). Les HDL contrôlent également l'expression des gènes par le transfert de microARNs. (Partie détaillée plus loin).

Bien que les études observationnelles ont permis d'établir une relation inverse entre le taux de HDL-cholestérol et le risque cardiovasculaire (P. W. Wilson et al., 1988; « Major Lipids,

Apolipoproteins, and Risk of Vascular Disease », 2009), il est important de noter que cette relation n'est pas toujours linéaire. Par exemple, les essais cliniques randomisés visant à augmenter pharmacologiquement les taux de HDL-C ne montrent pas toujours d'effets bénéfiques (Keene et al., 2014). En outre, les résultats d'une étude montrent paradoxalement une augmentation du risque de mortalité (Barter et al., 2007). De même, des concentrations élevées de HDL-cholestérol suite à certaines variantes génétiques comme le polymorphisme du *CETP* entraînant une réduction de son activité (Agerholm-Larsen et al., 2000) et la perte de fonction du *Scarb1* (SR-B1) (Zanoni et al., 2016) sont associées avec un risque élevé de maladies cardiovasculaires. Les études épidémiologiques prospectives dans de larges cohortes (>50 000 hommes et femmes participants) (Madsen et al., 2017) signalent une relation en U dans les deux sexes où les concentrations extrêmes les plus élevées comme les plus faibles étant associées à un risque élevé de mortalité toutes causes confondues. Cette relation en U peut être expliquée par une réduction du transfert du cholestérol libéré au cours de la lipolyse des lipoprotéines riches en TG dans les deux cas extrêmes (Kontush, 2020).

#### Rôle de l'apolipoprotéine E dans l'athérogenèse :

Le foie est le site essentiel de synthèse de l'ApoE, mais les macrophages contribuent à 5-10 % de la production (Linton et al., 1998). L'ApoE présente des propriétés antiathérogènes. Au niveau foie, l'ApoE sert de ligand pour les LDLR, ainsi qu'aux récepteurs LRP1 (LDL receptor related protein 1), les récepteurs aux VLDL, et les récepteurs ApoE2 (LPR8), médiant l'élimination des VLDL et des restes de chylomicrons de la circulation (Getz & Reardon, 2009). Au niveau des macrophages, l'ApoE participe au RCT et stimule l'efflux de phospholipides et de cholestérol via ABCA1 au niveau de la plaque d'athérome (Langer et al., 2000; Yancey et al., 2007). De même, l'ApoE des macrophages présente une activité antiinflammatoire (Ali et al., 2005; K. Li et al., 2015) et antioxydante (Miyata & Smith, 1996; Rosenblat et al., 2002). Chez l'Homme, trois isoformes de l'ApoE sont exprimés : l'ApoE2, l'ApoE3 et l'ApoE4, et 6 génotypes. L'isoforme dépend des acides aminés de la chaîne polypeptidique en position 112 et 158 de la séquence protéique, attribuant aux isoformes différentes fonctions. L'ApoE3 est l'isoforme la plus courante chez l'Homme et est fonctionnellement similaire à l'ApoE de la souris. Comparativement à l'ApoE3 et à l'ApoE2, l'ApoE4 est incapable de stimuler l'efflux de cholestérol et de prévenir l'inflammation et l'oxydation. L'ApoE3 et l'ApoE4 s'associent préférentiellement aux HDL alors que l'ApoE2 se lie aux VLDL (L. M. Dong et al., 1994). Les



porteurs humains de l'ApoE4 présentent un risque accru de maladie coronarienne par rapport à ceux exprimant l'ApoE3 ou l'ApoE2 (Bennet et al., 2007).

### 3) Biomarqueurs :

L'athérosclérose est une maladie multifactorielle qui reste cliniquement silencieuse pendant plusieurs années. Les modèles actuels de prédiction du risque cardiovasculaire intègrent les facteurs de risque traditionnels pour estimer le risque cardiovasculaire à 10 ans. En plus des biomarqueurs classiques (LDL, HDL, Lp(a)), de nouveaux marqueurs de risque émergent. Ces marqueurs sont associés à leur mécanisme présumé dans la pathogénèse de l'athérosclérose. La protéine C réactive ultrasensible (hsCRP) et la phospholipase A2 associée aux lipoprotéines (Lp-PLA2) sont les deux marqueurs de l'inflammation les plus étudiés et représentent des facteurs de risque indépendants (Virani et al., 2008).

Un nouveau marqueur des MCV, au stade de recherche fondamentale, est la triméthylamine oxydée (TMAO). La TMAO est un métabolite du microbiote (Wang et al., 2011), corrélé de manière positive à la progression de l'athérosclérose et à ses complications chez l'Homme (Tang & Hazen, 2014) et l'animal (Koeth et al., 2013). Dans l'athérosclérose, il a été montré que la TMAO augmente l'absorption du cholestérol dans les macrophages, inhibe la synthèse des acides biliaires (Koeth et al., 2013; Wang et al., 2011), et contribue de façon directe à l'hyperactivité plaquettaire en favorisant la libération du calcium intracellulaire ce qui augmente le risque de thrombose (Zhu et al., 2016).

#### i. Les microARN :

L'implication des microARN dans la régulation de l'athérosclérose a permis de les exploiter en tant que nouveaux biomarqueurs de diagnostics des MCV (Churov et al., 2019).

#### a) Présentation.

Initialement identifiés chez le nématode *Caenorhabditis elegans* en tant que régulateurs de développement, les microARN (micro- Acide Ribonucléique, miR) sont présents dans le génome d'une variété d'organismes, allant des virus à l'Homme, et sont hautement conservés au cours de l'évolution. Les miR sont de courtes séquences (18-24 nucléotides environ), simple-brin et non-codantes d'ARN, qui régulent négativement l'expression d'une vaste variété de gènes. Agissant en post-transcriptionnel, les miR se lient de manière spécifique à la

région 3'-non traduite (3'-untranslated region, 3'-UTR) de leur ARN messagers (ARNm) cibles, ce qui entraîne l'inhibition de la traduction et/ou la dégradation de l'ARNm (Bartel, 2004).

Le réseau de régulation de l'expression des gènes par les miR est complexe. Un miR donné est capable de se lier à plusieurs cibles, dans la même ou dans plusieurs voies de signalisation. Inversement, un ARNm donné peut présenter plusieurs sites distincts de liaison aux miR dans sa région 3'-UTR (Ambros, 2004; Guo et al., 2010). Jusqu'à présent, plus de 1 500 miR ont été annotés dans le génome humain, et les études de bio-informatiques estiment que plus de 60 % des gènes codant des protéines sont directement régulés par les miR (Friedman et al., 2009).

Les miR situés entre les régions codantes des gènes du génome (intergéniques) sont transcrits par leurs propres promoteurs. En revanche, les miR se trouvent dans les séquences introniques des gènes (introniques) partagent souvent les mêmes promoteurs en amont et la même régulation transcriptionnelle avec leurs gènes hôtes (Ambros, 2004; Bartel, 2004).

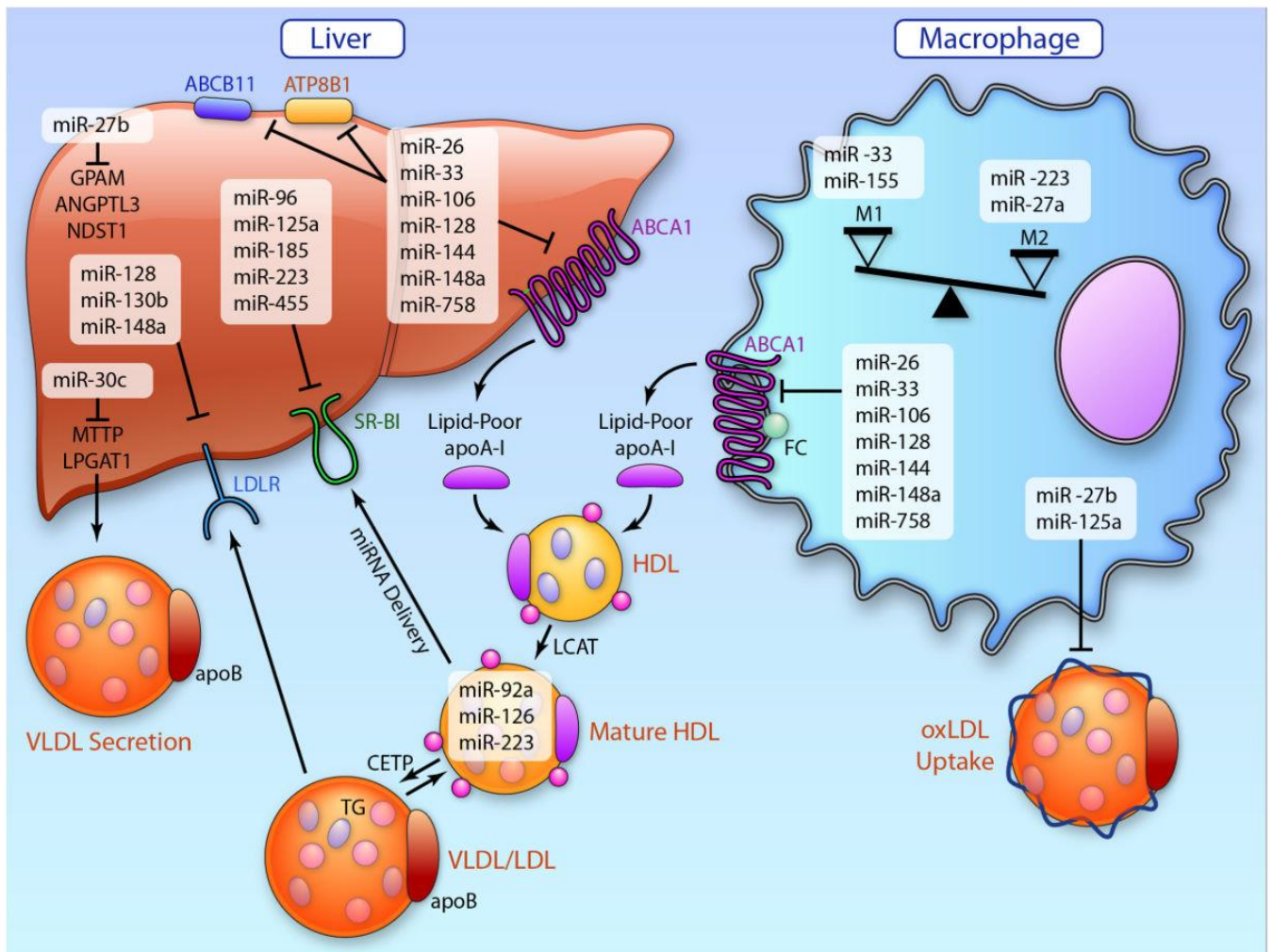
Dans le noyau, les polymérases de type II (et plus rarement de type III) se chargent de la transcription des gènes des microARN. Dans une première étape, les miR primaires (pri-miR) obtenus sont des transcrits d'ARN de plusieurs centaines de paires de bases ayant une coiffe en 5' et une queue poly-A en 3', et codent les séquences d'une multitude de miR. Les pri-miR sont clivés par le complexe Drosha/DGCR8 (Di George Syndrome Critical Region Gene 8) et forment des structures en forme d'épingle à cheveux, à tige et à boucle (hairpin-shaped stem-loop structure) de 60 à 70 nucléotides environ, les miR précurseurs (pré-miR). Acheminés vers le cytoplasme par l'exportine 5, un duplex de pré-miR mature est formé à partir des pré-miR par l'action d'un complexe enzymatique ribonuclease III Dicer/TRBP (TAR RNA-binding protein). L'un des brins du duplex, qui sert de brin « guide » ou le miR-5p, est incorporé dans un complexe « RISC » (RNA-induced silencing complex), qui contient l'Argonaute2 (Ago2) facilitant sa liaison à l'ARNm cible (Landthaler et al., 2004; Okamura et al., 2004). L'autre brin du duplex, le brin « passager » ou le miR-3 est exclu et dégradé. Les miR matures peuvent être libérés de la cellule et empaquetés dans une série de microvésicules (exosomes, corps apoptotiques, microparticules) qui sont détectables dans la circulation périphérique (parfois en association avec des protéines liant l'ARN comme Ago2) et peuvent également être absorbés dans les tissus par la communication intercellulaire (Esau et al., 2006).

## b) Rôle des miR dans la régulation de l'athérosclérose

Les miR « silencieux endogènes » sont des régulateurs critiques de divers processus biologiques. Dans la pathologie de l'athérosclérose, les miR sont alors impliqués dans la régulation de divers aspects de la pathologie de l'athérosclérose : l'homéostasie lipidique, la régulation de la fonction des cellules endothéliales, musculaires lisses et des monocytes, la réaction inflammatoire ainsi que le stress oxydant.

### Rôle des miR dans le métabolisme des lipides :

Comme illustré dans la **Figure 8**, les miR sont impliqués dans la régulation de l'ensemble des étapes de l'homéostasie du cholestérol décrites au début du chapitre. Le miR-27b et le miR-30c participent à la formation et la sécrétion des lipoprotéines. Concernant les récepteurs membranaires, l'expression du récepteur aux LDL est modulée par les miR-128, miR-130b et le miR-148a, régulant ainsi le taux plasmatique de LDL-C. De même, miR-223 et miR-455 sont parmi les miR régulant l'expression du SR-BI et par la suite du taux de clairance hépatique du cholestérol des HDL. L'ABCA1, responsable de l'efflux du cholestérol vers les HDL, est contrôlé par au moins le miR-33, miR-758 et le miR-26. Un autre miR clé du métabolisme lipidique, est le miR-33, découvert dans les gènes SREBP-1 et SREBP-2 (miR-33 a et miR-33b), qui cible ABCA1 (Gerin et al., 2010) et NPC1 (Goedeke et al., 2013), et est également impliqué dans le métabolisme des acides gras (Rayner et al., 2011) et celui du glucose (Goedeke et al., 2013).



**Figure 8. L'orchestration par les miR de l'homéostasie du cholestérol et de l'activation des macrophages dans l'athérosclérose.** (Feinberg & Moore, 2016)

Nous détaillerons ci-dessous les miR étudiés dans le cadre de mon projet de thèse.

◇ MiR-122

Le miR-122 est le miR le plus abondant dans le foie (Esau et al., 2006; Jopling, 2012). Les études examinant les rôles de miR-122 se servent d'oligonucléotides antisens (ASO) soit des approches de knockout (KO) de gènes pour identifier les gènes cibles. Les modèles KO du miR-122 montrent une réduction de 30 % du cholestérol total, du LDL, du HDL et des TG plasmatiques (Wen & Friedman, 2012). Cependant, la délétion du miR-122 conduit à l'accumulation de lipides dans le foie et rend le foie plus sensible au développement de la stéatose, la cirrhose et l'hépatocarcinome (Hsu et al., 2012). L'administration de l'ASO permet une réduction du cholestérol plasmatique (Esau et al., 2006; Krützfeldt et al., 2005). Les cibles indirectes suggérées du miR-122 sont SREBP-1c et SREBP-2, ce qui en réduisant leur

expression réduit alors l'expression de leurs gènes cibles comme la HMGCoA réductase (Cheung et al., 2008).

◇ MiR-223

Le miR-223 est le second plus abondant miR dans le foie (M.-W. Zhang et al., 2021), mais également retrouvés dans les HDL (Wagner et al., 2013) et dans les macrophages (Ismail et al., 2013). Le miR-223 des HDL peut être transféré aux cellules endothéliales où il inhibe l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 (Tabet et al., 2014). Le miR-223 coopérant avec le miR-122 et le miR-33a/b pour la régulation de l'homéostasie du cholestérol. En présence d'un taux élevé de cholestérol intracellulaire, le miR-223 (a) inhibe la captation cellulaire des HDL en ciblant du SR-BI, (b) inhibe la synthèse du cholestérol en ciblant HMGCoA réductase et la méthylstérol monooxygénase 1 (MSMO1), et (c) augmente l'efflux de cholestérol par l'augmentation de l'expression ABCA1, empêchant ainsi l'accumulation du cholestérol (Vickers et al., 2014). Les souris déficientes au miR-223 ont des taux élevés de HDL-C, ainsi que du cholestérol total hépatique et plasmatique (Vickers et al., 2014).

◇ Mir-27

Zhang et ses collègues ont démontré le rôle du miR-27 dans une régulation séquentielle du métabolisme lipidique en diminuant l'expression de: 1) ABCA1 ainsi que l'efflux du cholestérol vers l'ApoA1, 2) la lipoprotéine lipase (LPL) donc la diminution de l'absorption des lipides, et de 3) l'ACAT1, par la suite la diminution de l'estérification du cholestérol (M. Zhang et al., 2014), tous ces mécanismes contribuant à la progression de l'athérosclérose. L'expression du miR-27 est également sensible au taux hépatique du cholestérol et il cible d'autres gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et le remodelage des lipoprotéines (Vickers et al., 2013).

◇ Mir-30c

Le miR-30c est un régulateur de la production de lipoprotéines contenant l'ApoB comme les VLDL et les LDL, en ciblant la MTTP, responsable de la lipidation des ApoB. Ainsi, la surexpression du miR-30c chez la souris réduit l'assemblage et la sécrétion des ApoB-lipoprotéines, ce qui entraîne une diminution des taux de cholestérol total et de LDL dans le plasma. Une autre cible du miR-30c est la LPGAT1 (lyso-phosphatidyl-glycérol acyl-transférase 1) impliquée dans la lipogenèse *de novo*. Chez la souris ApoE<sup>-/-</sup>, la surexpression du miR-30c atténue l'hyperlipidémie et l'athérosclérose sans induire de stéatose (Soh et al., 2013).

### **Rôle des miR dans le développement local de la plaque.**

La **figure 9** schématise l'implication des miR dans les processus biologiques ayant lieu au niveau de la plaque d'athérome. Ceux-ci comprennent l'inflammation accentuée par les oxLDL, le recrutement et l'infiltration des monocytes ou le stress oxydatif. Ces mêmes miR ainsi que d'autres modulent également d'autres aspects de l'athérogenèse comme l'apoptose des cellules spumeuses et l'angiogenèse. En plus de leur rôle physiologique endogène en tant que régulateurs de l'expression génique, les miR sécrétés par les cellules, passivement et/ou activement, peuvent jouer un rôle paracrine et réguler l'expression des gènes dans d'autres cellules (Hulsmans et al., 2011).

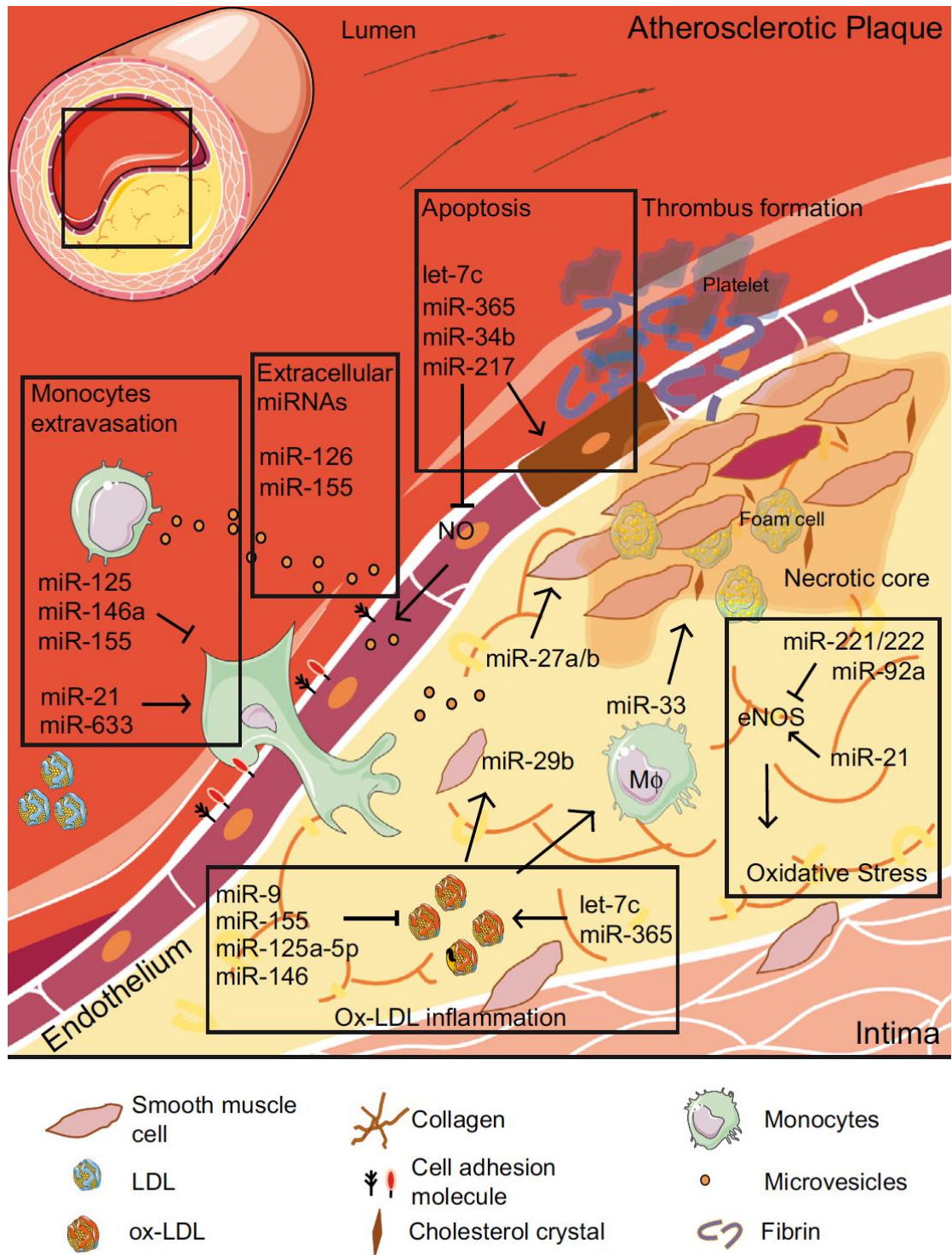


Figure 9. Les miR peuvent moduler de manière positive ou négative plusieurs processus impliqués dans l'athérogenèse. (Aranda et al., 2013)

(↑\_indique l'activation, T\_indique l'inhibition)

### c) **Biomarqueurs de l'athérosclérose**

Des miR « circulants » ont été détectés dans le sang périphérique, la salive et l'urine, ce qui fait d'eux des « biomarqueurs idéaux » pour l'athérosclérose, vu l'impossibilité d'avoir des biopsies chez l'Homme. De plus, ils sont assez spécifiques des tissus et restent stables dans le sang. Leur expression peut être un signe de divers stades de l'athérosclérose, dès le stade subclinique aux syndromes coronariens aigus. Récemment, le miR-122 et le miR-223 ont émergé comme marqueurs de la stabilité de la plaque (Singh et al., 2020). Un autre miR qui pourrait aider au risque du développement de la plaque dans l'artère carotide, est le miR-210 qui a été détecté à des niveaux plus faibles dans le plasma, au niveau du site de sténose de l'artère carotide. La diminution de son expression, et donc l'augmentation de l'activité de son gène cible, entraîne une réduction substantielle de la stabilité de la chape fibreuse recouvrant une plaque d'athérome (Eken et al., 2017).

Finalement, les miR font aussi partie de machinerie de régulation épigénétique, dont l'expression reflète une « mémoire cellulaire » de l'environnement. Cet aspect des miR sera détaillé dans le chapitre 4.



### III. Chapitre 3 : Traitement et prévention de l'athérosclérose.

#### 1) Traitement et prévention de l'athérosclérose

Comme abordé dans le chapitre 2, le taux élevé de cholestérol plasmatique est un facteur de risque majeur des MCV (Kannel, 1961). Les interventions pharmacologiques visant à réduire le taux de cholestérol, présentent des pistes prometteuses dans la prévention des MCV.

Parmi les médicaments démontrant une efficacité clinique dans la réduction du taux de cholestérol, nous citons :

- les statines, inhibiteurs de la HMG-CoA, enzyme limitante dans la synthèse du cholestérol (Stancu & Sima, 2001),
- l'ézetimibe, inhibiteur de la protéine de transfert de cholestérol NPC1L1 réduisant ainsi l'absorption intestinale du cholestérol (Bays et al., 2008),
- les séquestrants d'acides biliaires, en se liant aux acides biliaires dans l'intestin, empêchent leur réabsorption et augmentent la conversion du cholestérol hépatique en acides biliaires (Ast & Frishman, 1990) ,
- les inhibiteurs de la PCSK9, en désactivant la protéine PCSK9, augmentent l'expression des récepteurs aux LDL au niveau hépatique (Handelsman & Lepor, 2018).

Un mode de vie « sain » avec une alimentation équilibrée, la pratique de l'activité physique et l'arrêt du tabagisme, permet la réduction jusqu'à 50% du risque des MCV, même chez les personnes présentant un risque génétique (Khera et al., 2016).

Des interventions chirurgicales peuvent être nécessaires dans des stades avancés de la pathologie comme l'angioplastie par ballonnet est le pontage coronarien (Rob, 1960).

Dans les cas d'hypercholestérolémie familiale où les deux allèles du récepteur LDL sont non fonctionnels, ces traitements ont très peu ou pas d'effet. Ces patients ont recours à des techniques comme la plasmaphérèse ou à la transplantation hépatique pour réduire la concentration du cholestérol et donc des LDL.

#### I. Le traitement par un séquestrant des acides biliaires : la cholestyramine.

La conversion du cholestérol en acides biliaires ainsi que sa sécrétion dans la bile sont les voies majeures de son élimination par l'organisme (Chiang & Vlahcevic, 1996).

L'objectif de notre étude étant de tester l'effet d'un traitement hypocholestérolémiant durant la gestation ou la lactation de la souris ApoE<sup>-/-</sup>, nous avons choisi d'utiliser la

cholestyramine, dont l'utilisation chez la femme durant la grossesse est autorisée (Goldberg et al., 2011).

a) Synthèse et cycle entéro-hépatique des acides biliaires.

Les acides biliaires (AB) sont exclusivement synthétisés dans le foie à partir d'un précurseur unique qui est le cholestérol. Ils sont ensuite stockés dans la vésicule biliaire avant d'être sécrétés dans le tractus gastro-intestinal en post-prandial où ils aident dans la digestion et l'absorption des molécules liposolubles. La structure chimique des acides biliaires leur donne un caractère amphipatique avec d'importantes propriétés détergentes. Enfin, ils sont réabsorbés (à 95 %) au niveau de l'iléon et recyclés vers le foie par la veine porte. C'est le « cycle entero-hépatique des acides biliaires » (CEH). A noter qu'une petite quantité peut glisser dans la circulation systématique et sera réabsorbée dans les tubules rénaux, puis acheminée vers le foie. Une fraction de 5 % qui échappe à la réabsorption iléale est éliminée dans la matière fécale. Pour maintenir le pool d'acides biliaires constant, cette perte, qui paraît minimale, est compensée par une synthèse de novo des acides biliaires dans le foie à partir du cholestérol. Chez l'Homme, cette synthèse quotidienne représente 50% du turnover du cholestérol total (Chiang & Vlahcevic, 1996).

La synthèse des acides biliaires peut s'effectuer selon deux voies : la voie classique neutre et majoritaire, et la voie acide (**Figure 10**). La voie neutre est dépendante de l'enzyme limitante, la cholestérol-7 alpha-hydroxylase, CYP7A1 rétro-contrôlée négativement par les acides biliaires. La CYP7A1 convertit le cholestérol en 7 $\alpha$ -hydroxycholestérol, qui est ensuite converti en 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) par une hydroxystéroïde déshydrogénase. En présence de la CYP8B1, le C4 est converti en acide cholique (cholic acid CA). Alors qu'en son absence, c'est l'acide chenodeoxycholique ou CDCA qui est synthétisé. Le CA et le CDCA sont les acides biliaires primaires chez l'Homme. La voie alternative acide contribue à 9% de la synthèse des acides biliaires dans les tissus extra-hépatiques et est essentiellement assurée par la CYP27A1. Une enzyme spécifique aux rongeurs est la CYP2C70 qui convertit le CDCA en acide  $\alpha$ -muricholique (MCA) et  $\beta$ -MCA, qui en plus du CA et CDCA, constituent les acides biliaires primaires de la souris (Honda et al., 2020).

Les acides biliaires sont conjugués à la taurine ou à la glycine, par des actions séquentielles des enzymes de la « bile acid coenzyme A (CoA) synthetase (BACS) » et la « bile acid-CoA amino acid N-acetyltransferase (BAT) » (**Figure 10**). La conjugaison des acides biliaires

augmente leur ionisation et leur solubilité dans un pH physiologique, empêche leur absorption passive et les protège contre le clivage par les carbopeptidases pancréatiques.

Ensuite, les acides biliaires sont sécrétés par les hépatocytes dans les canalicules biliaires par la pompe d'exportation des sels biliaires (BSEP ou ABCB11), par l'hétérodimère ABCG5/8 (ATP-binding cassette subfamily G member 5 and member 8) qui sert également à l'excrétion de la forme libre du cholestérol. Les acides biliaires sont déversés dans l'iléon, et sont pris en charge activement, au niveau des entérocytes, par le transporteur d'acides biliaires sodium-dépendant apical iléal (ASBT, également appelé transporteur d'acides biliaires intestinal [IBAT] ou SLC10A2). Du côté basolatéral, les acides biliaires sont sécrétés dans la veine porte essentiellement par les transporteurs Osta $\alpha$ / $\beta$  (organic solute transporters alpha and beta). Le microbiote intestinal a la capacité d'enlever la conjugaison taurine ou glycine par les bactéries BSH (bile salt hydrolase). Ensuite, la 7 $\alpha$ -déhydroxylase bactérienne élimine un groupe 7 $\alpha$ -hydroxyle du CA et du CDCA pour former les acides biliaires secondaires, l'acide désoxycholique (DCA) et l'acide lithocholique (LCA), respectivement. Cette fraction d'AB n'est pas absorbée mais éliminée par la matière fécale. L'absorption des sels biliaires qui retournent au foie, après l'absorption intestinale, est principalement médiée par le Na<sup>+</sup> taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP ou SLC10A1) (Trauner & Boyer, 2003). Ce transport d'acides biliaires est négativement régulé par le récepteur nucléaire FXR (détaillé plus loin dans le manuscrit). **(Figure 11).**

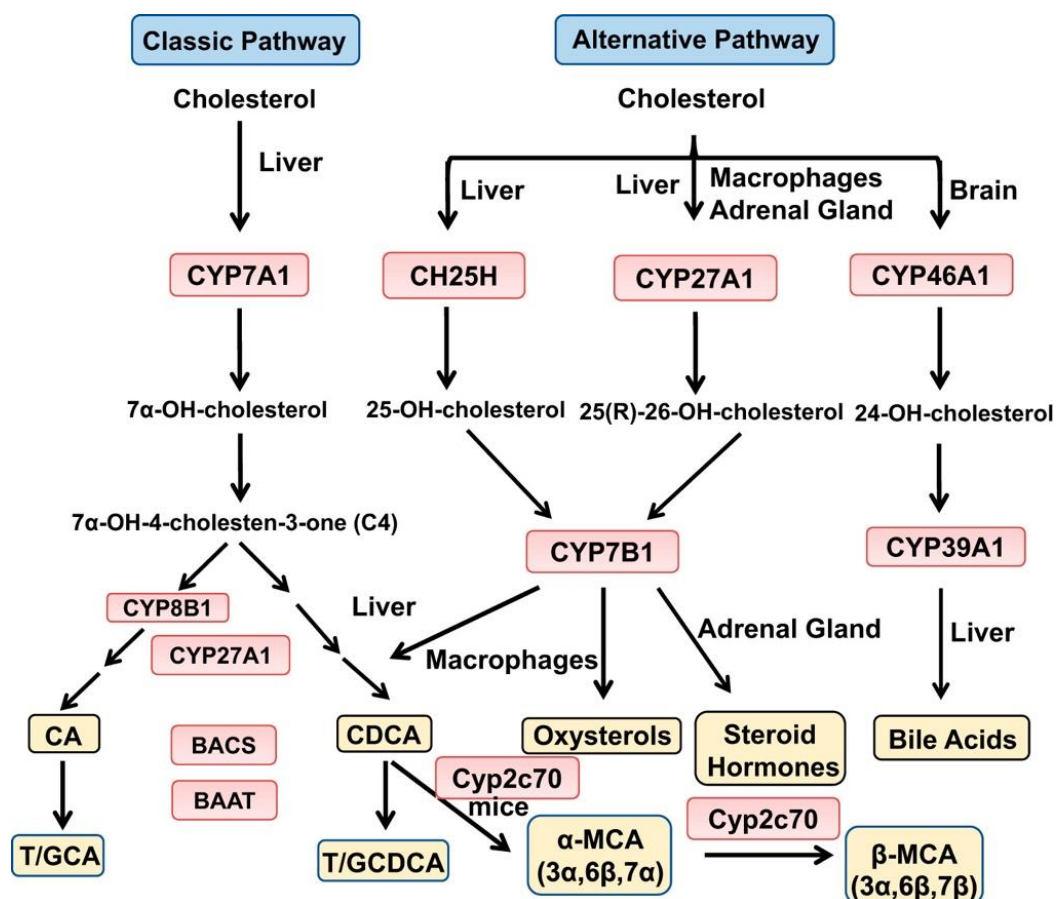


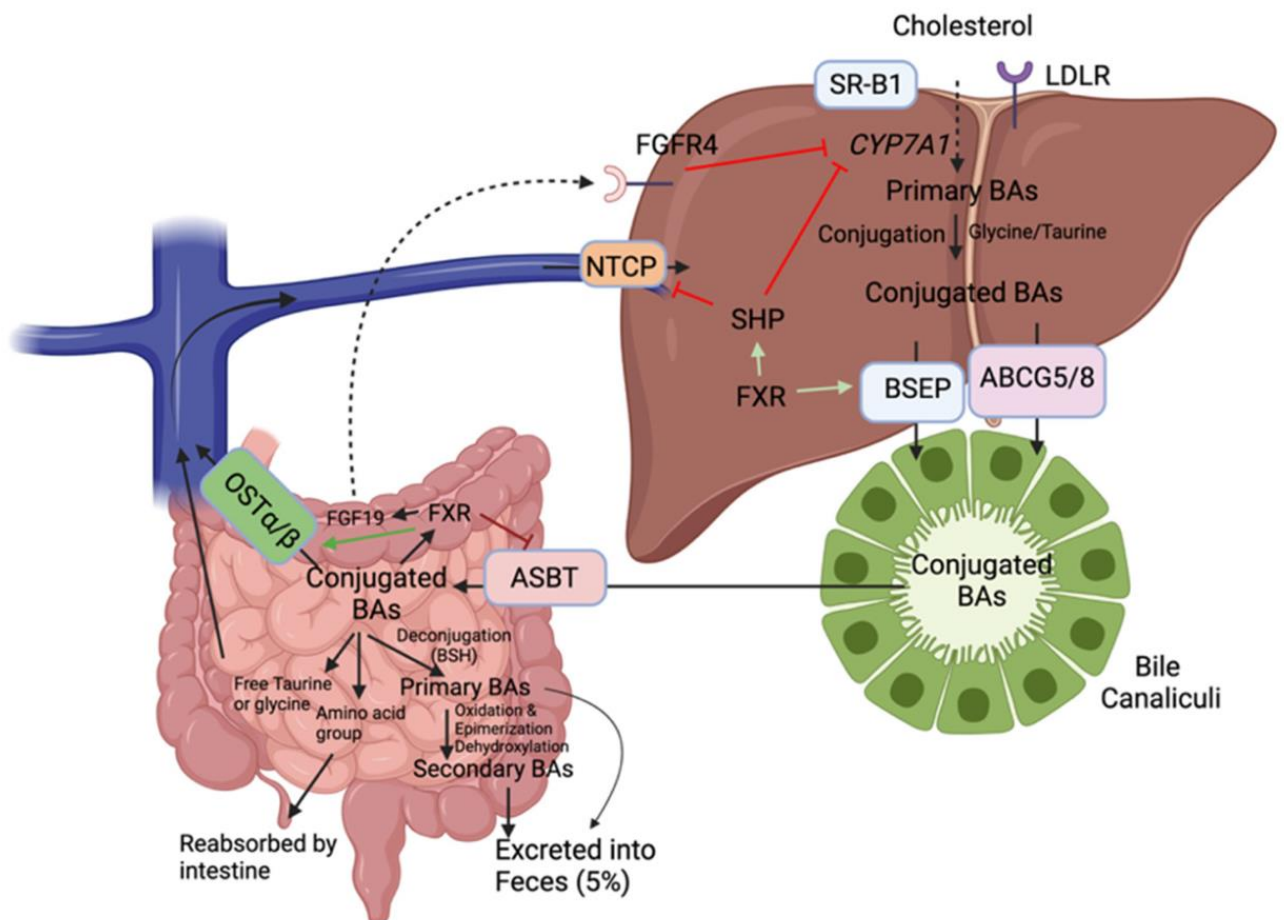
Figure 10. Les Voies de synthèse des acides biliaires. (Chiang & Ferrell, 2020)

b) La cholestyramine.

Les polymères liants les acides biliaires ou « les séquestrants d'acides biliaires », tels que la cholestyramine, le colestipol et le colesevelam, sont les médicaments de premier choix pour les patients hypercholestérolémiques sans hypertriglycéridémie concomitante, et ne répondant pas au traitement diététique. En plus, cette classe est la seule classe à être considérée pour le traitement des enfants (Glueck, 1986) et des femmes enceintes (Goldberg et al., 2011). La cholestyramine est une résine positivement chargée qui se lie aux acides biliaires négativement chargés au niveau de la lumière intestinale. Le complexe non-absorbable ainsi formé est éliminé dans les fèces, limitant leurs effets secondaires. Cependant des effets indésirables sont provoqués au niveau du tractus gastrointestinal comme des ballonnements.

Les études cliniques ont montré l'efficacité de la cholestyramine à diminuer les taux de cholestérol total, du LDL-cholestérol ainsi que l'incidence des maladies coronariennes (« The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results », 1984). Chez les adultes, une dose journalière de 4 à 8 grammes est prescrite pour le traitement de l'hypercholestérolémie.

Cette dose est augmentée de 8-16 grammes pour le maintien, et ne doit pas dépasser les 24 grammes/jour (Scaldeferri et al., 2013). Une réduction de 12 à 18 % du LDL-cholestérol est observée avec une dose journalière de 8 à 12 grammes de cholestyramine.



**Figure 11. Le cycle entero-hépatique des acides biliaires.**(Vourakis et al., 2021)

En éliminant une fraction importante des acides biliaires du cycle entero-hépatique par la cholestyramine, l'action inhibitrice des AB sur la CYP7A1 est levée. Ainsi, la conversion de cholestérol en AB est active et accompagnée par la régulation positive de l'expression des récepteurs LDL dans le foie (Shepherd et al., 1980). Par conséquent, la cholestyramine n'est pas prescrite chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale homozygote, qui n'ont pas de récepteurs fonctionnels. Le traitement avec la cholestyramine était associé avec une augmentation des HDL et de l'Apo-AI, apolipoprotéine majeure des HDL (Shepherd et al., 1979).

- c) Les voies de signalisation médiée par les acides biliaires : rôle dans le métabolisme des lipides et l'athérosclérose.

Les interactions au sein de l'axe foie-intestin-cœur permettent de réguler le métabolisme des lipides, l'inflammation et la pathogenèse des maladies métaboliques telles que l'athérosclérose, la stéatose hépatique non alcoolique, le diabète et l'obésité. Pour mettre l'accent sur le rôle du foie particulièrement dans l'homéostasie des lipides et la prévention des MCV, il a été suggéré que "l'athérosclérose est une maladie hépatique du cœur" (Davis & Hui, 2001).

En plus de leur rôle dans la digestion, les acides biliaires sont des ligands endogènes à certains facteurs de transcription comme les récepteurs nucléaires (FXR, PXR et VDR), leur permettant de réguler l'expression de gènes cibles et orchestrer un certain nombre de voies métaboliques importantes, comme le transport des lipoprotéines plasmatiques (VLDL, LDL et HDL), la synthèse, la conjugaison et le transport des acides biliaires. Le récepteur nucléaire FXR (Farnesoid X-activated Receptor, récepteur X activé par les farnésoides), exprimé de façon abondante au niveau du foie (Forman et al., 1995), joue un rôle central dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose (Trauner et al., 2010). Au niveau du foie, l'activation de FXR par les AB stimule l'expression de petit hétérodimère du récepteur nucléaire ShP (Small heterodimer Partner), qui à son tour, bloque la synthèse des acides biliaires en inhibant la transcription du *CYP7A1* (Goodwin et al., 2000). De plus, cette activation de FXR hépatique, induit l'expression de BSEP stimulant l'efflux des AB vers la bile, tout en empêchant l'absorption des acides biliaires par les hépatocytes par l'inhibition de la NTCP (Ananthanarayanan et al., 2001). FXR est également exprimé au niveau de l'iléon, où il induit la sécrétion du facteur de croissance des fibroblastes 19 (FGF19). Ce dernier inhibe la transcription du *CYP7A1* et *CYP8B1* hépatiques en activant le complexe FGF receptor 4/ $\beta$ -Klotho (FGF4) sur la membrane des hépatocytes (Chiang & Ferrell, 2020; Inagaki et al., 2005). A part son rôle dans la régulation de la synthèse des AB, FXR est impliqué dans la régulation d'autres facteurs de risque de l'athérosclérose comme le dysfonctionnement endothélial, la tension artérielle et l'inflammation suite à son expression au niveau des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire. FXR induit une vasodilatation dans les cellules endothéliales d'une part par la régulation négative de l'endothéline-1 et en modulant l'expression du récepteur de l'angiotensine II, connues pour leur effet vasoconstricteur. D'autre part, FXR stimule la

synthase de l'oxyde nitrique (Nitric oxide, NO) endothéliale (eNOS) qui maintient l'homéostasie vasculaire (Q. Zhang et al., 2008). FXR inhibe également l'inflammation, la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Bishop-Bailey et al., 2004). Les études dans des modèles animaux permettent d'étudier des stratégies thérapeutiques de l'athérosclérose en utilisant des dérivés synthétiques des acides biliaires. Chez la souris ApoE déficiente, l'administration orale de dérivés de CDCA réduit la formation de la plaque aortique de 95 % et l'expression des facteurs inflammatoires dont IL-6, IL-1 (Hanniman et al., 2005).

## 2) Le stress oxydant et l'athérosclérose.

Le rôle du stress oxydant en particulier via les particules LDL oxydés dans la pathologie de l'athérosclérose (Stocker & Keane, 2004) étant décrits précédemment dans le manuscrit, nous aborderons brièvement les sources des molécules pro-oxydantes, les défenses antioxydantes présentes dans la cellule et l'effet de l'administration de la vitamine E pour ses effets antioxydants dans l'athérosclérose.

### i. Les sources du stress oxydant

Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre la production et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules et les tissus et la capacité d'un système biologique à détoxifier ces produits réactifs (Stocker & Keane, 2004).

Les ROS proviennent de sources intracellulaires comme dans quelques réactions enzymatiques nécessitant l'oxygène, ou de sources non-enzymatiques extracellulaires par exemple quand les cellules sont exposées à des radiations ionisantes. Ils sont sous forme de radicaux contenant un ou plusieurs électrons non appariés, comme le radical anionique superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , ou non-radicaux comme le peroxyde d'oxygène  $H_2O_2$  (R. Li et al., 2016).

Parmi les sources endogènes de ROS impliquées dans l'athérosclérose au niveau du système vasculaire nous citons :

- 1) NAD(P)H oxydase : au niveau de cellules musculaires lisses, produit le  $H_2O_2$  ainsi que  $O_2^{\bullet-}$ , et est activée par des stimuli tels que l'angiotensine II (Pagano et al., 1995; Rajagopalan et al., 1996). Au niveau des cellules endothéliales, elle peut être activée par les contraintes de cisaillement,
- 2) La xanthine oxydase : oxyde la xanthine ou l'hypoxanthine en acide urique, en libérant  $O_2^{\bullet-}$ . Son activité est également induite par les contraintes de cisaillement dans les zones prônes à l'athérosclérose (McNally et al., 2003),
- 3) La famille NOS (Nitric Oxide Synthase) : catalyse l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline et en -NO, un puissant vasodilatateur. Dans le contexte du système vasculaire et de l'athérosclérose, la eNOS (NOS endothéliale) et la iNOS (NOS inducible) sont les plus pertinentes (Alderton et al., 2001),
- 4) Les myéloperoxydases : La MPO est une enzyme humaine, et la seule connue pour générer l'acide hypochloreux (HOCl). Elle se localise avec les macrophages dans la



paroi artérielle et ses produits d'oxydation sont alors détectés dans les lésions d'athérosclérose (Malle et al., 2000) ,

- 5) Les lipoxigénases : les isoformes 12 et 15 de la lipoxigénase (12/15 LOX) sont capables d'oxyder les LDL et les HDL les rendant ainsi athérogènes (Kühn et al., 2005),
- 6) La respiration mitochondriale/la phosphorylation oxydative : réaction par laquelle la mitochondrie fournit de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) par transfert d'électrons du NADH ou du FADH<sub>2</sub> vers l'oxygène, via une chaîne de transporteurs d'électrons. Dans des conditions pathophysiologiques, cette chaîne peut se désaccoupler, ce qui entraîne une production accrue de O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> (Boveris et al., 1976). De plus, les ROS générés peuvent endommager l'ADN mitochondrial, phénomène qui montre une corrélation avec le développement de l'athérosclérose (Ballinger et al., 2002).

Les oxydants non-radicaux comme l'hypochlorite et le peroxyde d'azote jouent un rôle dans le processus de l'athérogenèse. L'hypochlorite (HOCl) est produit à partir du peroxyde d'oxygène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et du chlorite sous l'action de la myéloperoxydase. Il cible l'apolipoprotéine-B des LDL, qui devient agrégée et réticulée, entraînant une forte captation des LDL par les macrophages sans peroxydation lipidique significative (Hazell et al., 1996).

#### Les sources exogènes ou environnementales de ROS :

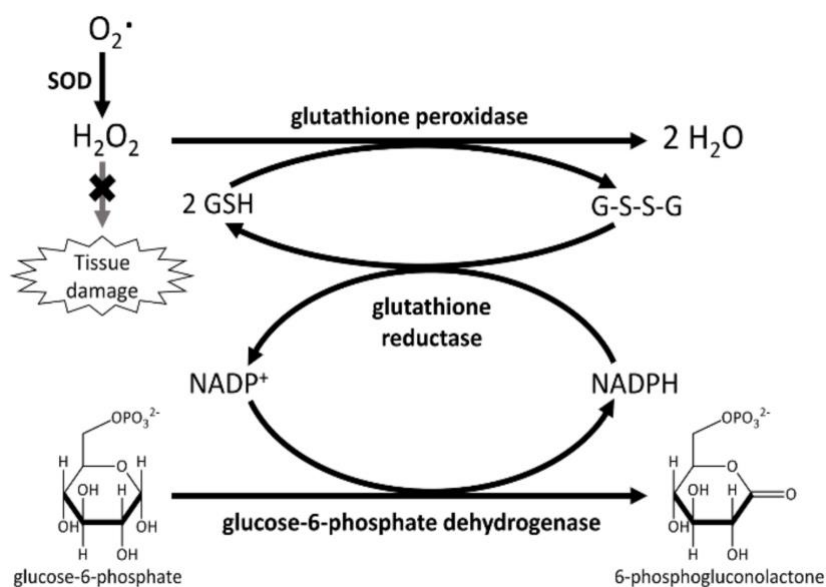
Les polluants atmosphériques, la fumée de tabac, les radiations ionisantes et non ionisantes, les aliments et les médicaments, ainsi que les xénobiotiques peuvent tous contribuer au stress oxydatif. Les agents chimiques comme les quinones, les métaux lourds comme le plomb, l'arsenic, le mercure, le chrome et le cadmium, les solvants organiques et les pesticides sont des sources exogènes courantes de ROS (Aseervatham et al., 2013; Sharifi-Rad et al., 2020).

#### ii. Les défenses antioxydantes :

##### Les défenses antioxydantes enzymatiques :

Les cellules sont équipées de plusieurs enzymes antioxydantes qui soit :

- 1) Agissent directement en piégeant les ROS (enzymes primaires), comme la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx)
- 2) ou indirectement en aidant à assurer le rôle des autres enzymes antioxydantes, comme la glucose-6-phosphate déshydrogénase qui régénère le NADPH, essentiel à l'action de l'enzyme primaire (**Figure 12**).



**Figure 12. La défense antioxydante enzymatique.** (Sharifi-Rad et al., 2020)

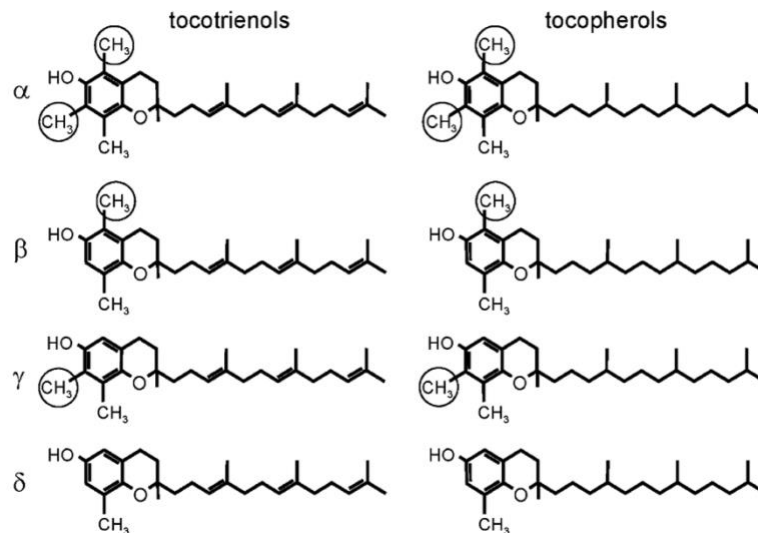
### Les défenses antioxydantes non-enzymatiques : La vitamine E

Quelques exemples d'antioxydants non-enzymatiques sont la vitamine C, la vitamine E, les polyphénols végétaux, les caroténoïdes et le glutathion (Moussa et al., 2020).

La vitamine E ou « tocophérol » est une vitamine liposoluble caractérisée par son pouvoir antioxydant important. La source de vitamine E chez l'Homme est exclusivement alimentaire. Seules les plantes et quelques cyanobactéries sont capables de synthétiser la vitamine E (Munné-Bosch & Alegre, 2002). Huit formes de vitamine E existent : 4 tocotriénols à chaîne latérale saturée et 4 tocophérols à chaîne latérale insaturée avec 3 liaisons *trans*. Les formes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  correspondent à la présence de 3, 2 ou 1 groupe(s) méthyle ou de son absence, respectivement (**Figure 13**). Les différentes formes ne présentent pas alors le même niveau d'activité biologique. La forme « alpha-tocophérol » ( $\alpha$ -T) est la plus abondante et la plus active dans les tissus humains (Galli et al., 2017). Les produits végétaux riches en vitamine E sont : les graines, les huiles végétales, les noix, les fruits et les légumes.

Étant donné sa nature hydrophobe, la vitamine E est absorbée au niveau de l'intestin associée aux chylomicrons. Au niveau du foie, la vitamine E est dissociée des chylomicrons résiduelles avant d'être excrétée dans la bile, les fèces et l'urine. Elle peut également intégrer les VLDL pour être sécrétée dans la circulation sanguine. Ce transfert de la vitamine E dans les VLDL est assuré par une protéine hépatique qui est l'« alpha-tocophérol transfert protéine » ( $\alpha$ -TTP),

et permet de maintenir les concentrations plasmatiques d'alpha-tocophérol (Lim & Traber, 2007). Les tissus adipeux sont capables de stocker la vitamine E (Galli et al., 2017).



**Figure 13. Les huit formes de vitamine E** (Hunter & Cahoon, 2007)

Chez les adultes, les apports nutritionnels recommandés (ANR), dose suffisante pour répondre aux besoins en nutriments de la quasi-totalité des individus en bonne santé, sont représentés dans le **Tableau 3**. Une dose journalière de 15 mg ou 22,4 unités internationales (UI) est recommandée chez les adultes. L'apport maximal tolérable (AMT), apport maximal quotidien peu susceptible de provoquer des effets néfastes sur la santé est de 1500-2200 UI chez l'adulte. Finalement, la supplémentation de routine en vitamine E n'est pas recommandée pour les enfants ou les adultes non carencés (Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, 2000).

Une particule de LDL contient en moyenne 5 à 9 molécules d'alpha-tocophérol, ce qui en fait l'antioxydant le plus abondant de ces lipoprotéines (Meydani, 2001). Une supplémentation alimentaire en vitamine E augmente fortement sa concentration endogène dans les LDL et diminue leur susceptibilité à l'oxydation (Reaven et al., 1993).

Age	RDA in mg (IU)	
	Males	Females
0–6 months*	4 (6)	4 (6)
7–12 months*	5 (7.5)	5 (7.5)
1–3 years	6 (9)	6 (9)
4–8 years	7 (10.4)	7 (10.4)
9–13 years	11 (16.4)	11 (16.4)
>14 years	15 (22.4)	15 (22.4)
In pregnancy		15 (22.4)
If lactating		19 (28.4)

**Tableau 3. Les apports nutritionnels recommandés de vitamine E.**

En effet, la vitamine E agit comme première ligne de défense contre la peroxydation des lipides, protégeant les membranes cellulaires de l'attaque des radicaux libres. La vitamine E est un antioxydant « briseur de chaîne » comme elle arrête la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique (Buettner, 1993). Le groupe hydroxyle de la vitamine E réagit avec le radical peroxyde pour former l'hydroperoxyde lipidique et le chromanoxyle correspondant. La vitamine C réagit ensuite avec le chromanoxyle de la vitamine E et permet sa régénération (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). Il faut noter que la vitamine E n'intercepte pas les radicaux libres responsables de l'initiation de la peroxydation lipidique (Liebler et al., 1986).

#### Traitement avec la vitamine E et maladies cardiovasculaires :

Les études menées chez l'Homme ainsi que chez les animaux ont permis de mettre en évidence la contribution de la vitamine E à la prévention ou au retardement des maladies coronariennes. Des études *in vitro* ont montré que la vitamine E inhibe l'oxydation du cholestérol des LDL, étape cruciale dans le déclenchement de l'athérosclérose. La vitamine E pourrait également contribuer à prévenir la formation de caillots sanguins susceptibles de provoquer une crise cardiaque ou une thromboembolie veineuse (Glynn et al., 2007).

Plusieurs études d'observation ont associé des taux plus faibles de maladies cardiaques à des apports plus élevés en vitamine E. Une étude portant sur environ 90 000 infirmières a révélé que l'incidence des maladies cardiaques était de 30 à 40 % inférieure chez les personnes ayant les apports les plus élevés en vitamine E, principalement sous forme de compléments alimentaires (Stampfer, 1993). Dans une étude dans la population hollandaise, des apports

plus élevés en vitamine E provenant de l'alimentation ont été associés à une diminution de la mortalité due aux maladies coronariennes (Knekt et al., 1994).

Cependant, d'autres essais cliniques ne montrent pas des résultats similaires. Les patients inclus dans l'étude HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation), recevant 400 UI/jour vitamine E naturelle n'ont pas connu moins d'événements cardiovasculaires ou d'hospitalisations pour insuffisance cardiaque ou douleurs thoraciques que les participants prenant un placebo (« Vitamin E Supplementation and Cardiovascular Events in High-Risk Patients », 2000). Dans l'étude de suivi HOPE-TOO, durant laquelle des participants de l'étude initiale ont continué à prendre de la vitamine E ou un placebo pendant 2,5 années supplémentaires, a révélé que la vitamine E n'offrait aucune protection significative contre les crises cardiaques, les accidents vasculaires cérébraux, les angines instables ou les décès dus à des maladies cardiovasculaires ou à d'autres causes après 7 ans de traitement (« Effects of Long-Term Vitamin E Supplementation on Cardiovascular Events and Cancer », 2005).

La « Physicians' Health Study II » menée en 2008 auprès d'hommes d'âge moyen et plus âgés, n'a trouvé aucune corrélation entre la prise de suppléments de vitamine E et la réduction du risque d'infarctus du myocarde non fatal, d'angine de poitrine ou d'insuffisance cardiaque (Sesso, 2008). Plusieurs revues reportent les résultats des différentes études cliniques se focalisant sur l'effet d'une supplémentation en vitamine E dans la prévention des maladies cardiovasculaires (Garg & Lee, 2022; Vardi et al., 2013).

#### **Hypothèse de l'effet pro-oxydant de l' $\alpha$ -tocophérol :**

Pour expliquer le manque de bénéfice du tocophérol observé dans certaines de ces études, l'hypothèse de "tocopherol-mediated peroxidation" propose un rôle initiateur de l'alpha-tocophérol dans la peroxydation des LDL. Afin de déterminer la susceptibilité des LDL à l'oxydation, une mesure du temps s'écoulant entre l'incubation dans un système oxydant et la formation des premiers produits d'oxydation lipidique est mesurée, et est définie par la phase de latence. Il a été démontré que les LDL enrichies en  $\alpha$ -T présentent une phase de latence plus courte que les LDL natives et sont donc plus susceptibles à l'oxydation dans des conditions de stress oxydatif important comme l'exposition aux ions cuivre (Thomas & Stocker, 2000). L'effet pro-oxydant de la vitamine E pourrait être alors expliqué par la formation du radical alpha-tocophéroxyde ( $\alpha$ -T $^{\bullet}$ ) suite à la captation du premier radical peroxy  $RO_2^{\bullet}$  par l' $\alpha$ -T au lieu des lipides de surface, bien que ces derniers soient plus abondants. Dans des conditions d'un flux radicalaire très faible, l'étape de terminaison de la peroxydation est

moins fréquente. L' $\alpha$ -T $\cdot$  sera responsable du transfert de la chaîne radicalaire de la couche de phospholipides en surface vers le noyau de la lipoprotéine, et en l'absence d'autres radicaux, déclencher la formation des radicaux peroxydes. L' $\alpha$ -T neutralise les radicaux peroxydes en hydroperoxydes et en régénérant l' $\alpha$ -T $\cdot$ , ainsi le cycle se poursuit. Si l' $\alpha$ -T $\cdot$  n'est pas éliminé, une grande partie des lipides de LDL peut s'oxyder (Upston et al., 1999). Cependant, l' $\alpha$ -T $\cdot$  peut être éliminé efficacement de la particule LDL par d'autres antioxydants tels que l'ascorbate ou la bilirubine, capables de le recycler en  $\alpha$ -tocophérol.

Une deuxième hypothèse attribuant un effet pro-oxydant à l' $\alpha$ -T est basée sur son implication dans la réduction des ions métalliques tels que Fe<sup>3+</sup> et Cu<sup>2+</sup>. Une réduction accrue du Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>+</sup> par les lipoprotéines enrichies en  $\alpha$ -T en a été mise en évidence, suggérant un rôle de l' $\alpha$ -T dans l'initiation de l'oxydation des LDL (Kontush et al., 1996).

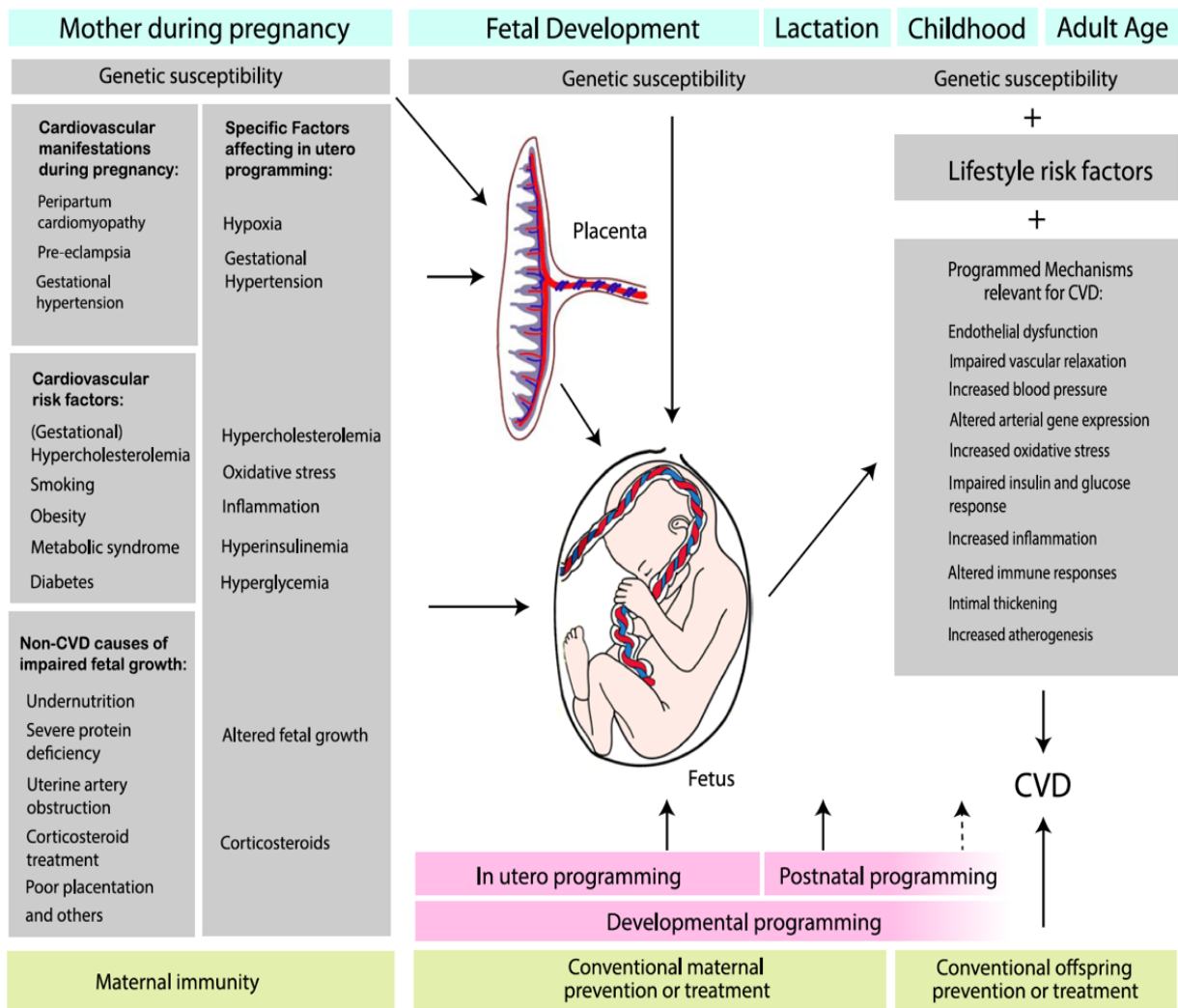
L'implication très probable de l' $\alpha$ -tocophérol en tant que pro-oxydant *in vivo* (Upston et al., 1999) continue à être étudiée.

#### IV. Chapitre 4 : Période périnatale et risque cardiovasculaire.

Fin des années 1980, l'épidémiologiste anglais David Barker, décrit une association entre un faible poids à la naissance et l'incidence accrue de mortalité par ischémie cardiaque (Barker, 1997). Ce concept connu plus tard par « l'Hypothèse de Barker » postulait que les perturbations vécues pendant la vie utérine, comme la malnutrition, induisent des adaptations chez les fœtus, qui peuvent s'avérer permanentes, et seront à l'origine de pathologies durant la vie adulte. Cette hypothèse fut depuis le centre de plusieurs études épidémiologiques chez l'Homme ainsi que les études dans les modèles animaux qui ont permis d'établir une relation causale, et le concept fut ainsi connu comme « l'Origine Développementale de la santé et des maladies » (de l'anglais : Developmental Origins of Health and Disease ou DOHAD). A part la restriction calorique, d'autres conditions défavorables pendant la vie intra-utérine comme l'exposition aux polluants, à l'alcool ou à la nicotine augmentent le risque de MCV à l'âge adulte (Aiken & Ozanne, 2013). L'hypoxie gestationnelle chez les rattes prédisposent les descendants à l'athérogenèse (Wang et al., 2009). A noter que les perturbations à différents stages de la grossesse sont aptes d'affecter le développement fœtal, même avant l'implantation (Watkins & Fleming, 2009).

De plus, un même évènement maternel peut moduler simultanément plusieurs voies de programmation. Les effets de la programmation *in utero* peuvent être toutefois latents et ne se manifestent qu'après une exposition à un autre facteur de risque plus tard dans la vie, un effet synergique entre le facteur génétique et environnemental provoquera la manifestation de la pathologie (Decano et al., 2009; Palinski, 2009b).

Finalement, les mécanismes de programmation fœtale de pathologies sont multiples et résultent d'un effet direct sur le fœtus ou indirect, par exemple suite à la perturbation des fonctions placentaires, ce qui fait obstacle dans la recherche des mécanismes. **(Figure 14).**



**Figure 14. Programmation développementale des maladies cardiovasculaires.** (Palinski, 2014)

### 1) Hypercholestérolémie maternelle et risque cardiovasculaire :

Bien que les manifestations cliniques de l'athérosclérose se produisent à l'âge adulte, les stries graisseuses et l'épaississement de l'intima sont retrouvés dès le stade fœtal, et de façon plus abondante chez les fœtus de mères hypercholestérolémiques (Napoli et al., 1997; Ikari et al., 1999). Le taux de cholestérol plasmatique maternel est positivement corrélé avec celui du fœtus mais seulement pendant les deux premiers trimestres de grossesse, suggérant que la programmation de l'athérosclérose s'effectue durant cette période (Napoli et al., 1997).

Plusieurs études épidémiologiques ont montré une forte association entre la dyslipidémie maternelle et le risque accru des maladies cardiovasculaires chez la progéniture adulte (Mendelson et al., 2016; van der Graaf et al., 2010; Versmissen et al., 2011). L'étude FELIC a montré que les fœtus nés de mères hypercholestérolémiques développent plus de stries



graisseuses dans l'aorte fœtale. Ces stries progressent de façon accélérée durant l'enfance (Napoli, Glass, et al., 1999).

L'hypercholestérolémie maternelle augmente le développement de l'athérosclérose fœtale (Napoli et al., 1997; Napoli, Glass, et al., 1999), entraîne des modifications permanentes dans l'expression de gènes au niveau de l'intima (Napoli et al., 2002), augmente les concentrations plasmatiques de produits finaux peroxydés (Liguori et al., 2007) et altère le métabolisme du triméthylamine-N-oxide (Trenteseaux et al., 2017). Il a été aussi démontré que l'hypercholestérolémie maternelle altère le métabolisme lipidique hépatique des descendants (Dumolt, Browne, et al., 2019; Dumolt, Ma, et al., 2019a). Au niveau placentaire, l'hypercholestérolémie maternelle aboutit à un dysfonctionnement endothélial de la veine ombilicale (Leiva et al., 2013, 2015) et à des modifications de l'expression des récepteurs des lipoprotéines et des transporteurs de cholestérol au niveau du placenta (Ethier-Chiasson et al., 2007; R. Zhang et al., 2017).

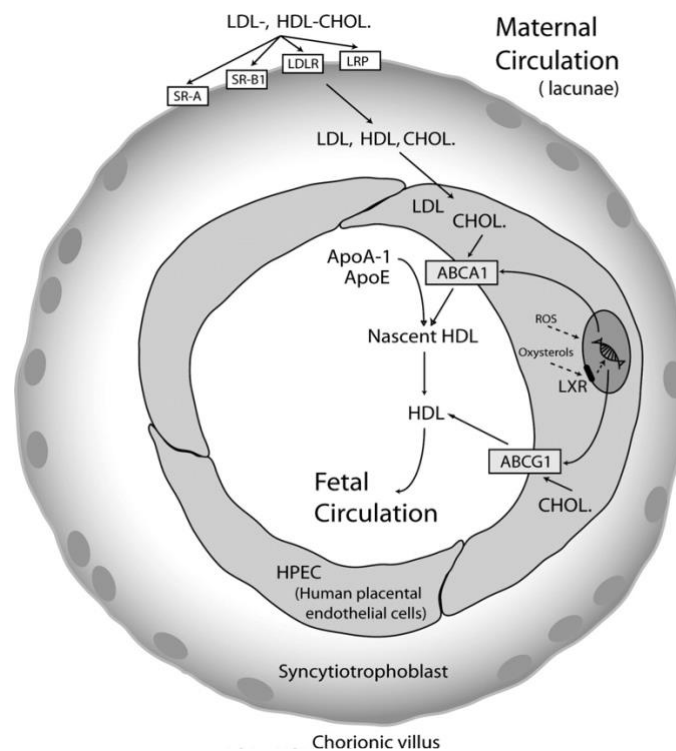
#### Cholestérol, grossesse et transfert placentaire :

Le cholestérol est un métabolite indispensable au bon développement de l'embryon ainsi qu'à celui du système nerveux fœtal (Baardman et al., 2013; Cortes, 2014; Roberg-Larsen et al., 2014). La synthèse endogène ainsi que le transport des lipoprotéines maternelles à travers le placenta assurent la quantité de cholestérol requis vers les lipoprotéines fœtales (Wild et al., 2015). Durant la grossesse, les taux de cholestérol total et de triglycérides de la mère augmentent progressivement (Basaran, 2009), pour satisfaire aux besoins du fœtus en cours de développement. Cependant, des concentrations supérieures à 280 mg/dL induisent des perturbations dans le système vasculaire du fœtus ainsi que dans le placenta.

En 1935, Boyd et Wilson proposent que l'augmentation des lipides dans la circulation maternelle résulte en leur transport accru à travers le placenta vers le fœtus. Ils mettent en évidence qu'à la naissance, la veine ombilicale, assurant le transport du sang du placenta vers le fœtus, contenait quatorze pour cent plus de cholestérol que l'artère ombilicale (assurant le retour du sang du fœtus vers le placenta (Boyd & Wilson, 1935). Les études utilisant le cholestérol marqué avec un isotope radioactif montrent une variabilité dépendante des espèces en terme du transfert du cholestérol maternel vers le fœtus à terme (Chevallier, 1964; Connor & Lin, 1967; Pitkin et al., 1972).

Pour atteindre la circulation fœtale, le cholestérol maternel doit traverser deux couches de cellules : les syncytiotrophoblastes (côté maternel) et les cellules endothéliales (CE) (côté

foetal). Le transfert du cholestérol à travers le placenta nécessiterait alors deux étapes : sa prise en charge des lipoprotéines maternels par les récepteurs LDLR, LRP, SR-A et SR-B à la surface des trophoblastes et ensuite sa sécrétion vers la circulation foétale via ABCA1 et l'ABCG1 du côté basal des trophoblastes (Stefulj et al., 2009; Woollett, 2011) (**Figure 15**). À ce jour, les mécanismes de transfert du cholestérol à travers les cellules endothéliales des vaisseaux foetaux sont peu compris.



**Figure 15. Transfert placentaire du cholestérol.** (modifiée de (Palinski, 2009a))

L'expression du récepteur aux LDL dans le placenta humain est plus abondante durant le premier semestre de la grossesse, probablement pour assurer le flux du cholestérol nécessaire à la croissance du placenta (Furuhashi et al., 1989). De plus, il semble être localisé dans la membrane apicale des trophoblastes ainsi que les cellules endothéliales (Kamper et al., 2017). La double localisation du SR-BI du côté apical et basal du syncytiotrophoblaste et des cellules endothéliales suggèrent un double rôle de ce récepteur dans l'absorption et l'efflux du cholestérol (Wadsack et al., 2003).

## 2) Le stress oxydant maternel et risque cardiovasculaire

Une hypercholestérolémie gestationnelle aboutit à une peroxydation lipidique accrue chez la mère (Witztum & Steinberg, 1991). Étant donné que les lipides oxydés sont acheminés vers le fœtus via le placenta, le stress oxydant dérivant de l'hypercholestérolémie peut être également responsable de son effet athérogène (Liguori et al., 2007). En effet, plusieurs types d'acides gras oxydés et de produits de peroxydation lipidique ont été détectés dans la circulation fœtale ainsi qu'au niveau des lésions aortiques (Napoli, Witztum, et al., 1999; Napoli, 2001). Un traitement antioxydant durant la gestation a permis une réduction du développement de l'athérosclérose chez les descendants de lapines traitées (Napoli et al., 2000). L'hypercholestérolémie gestationnelle, qu'elle soit génétique ou induite par un régime gras est capable d'induire un dysfonctionnement endothélial et l'hypertension (Khan et al., 2004; Leiva et al., 2013) ainsi qu'une déficience de la relaxation vasculaire (Taylor et al., 2004). Le stress oxydant ayant lieu dans le placenta lui-même (Poranena et al., 1996), un autre effet de l'hypercholestérolémie gestationnelle décrit chez l'Homme est le dysfonctionnement endothélial de la veine ombilicale par l'altération de la voie de signalisation de l'arginase et de la eNOS (Leiva et al., 2013). Enfin, le stress oxydant peut compromettre l'intégrité de l'ARN, de l'ADN et des protéines mais aussi entraîner une modification de la méthylation de l'ADN (Marnett et al., 2003).

## 3) L'épigénétique et l'athérosclérose.

Le terme « épigénétique » désigne des changements héréditaires et temporaires dans l'expression des gènes et leur fonction et qui ne sont pas dus à des altérations de la séquence d'ADN elle-même mais plutôt à des processus tels que la méthylation de l'ADN et les modifications des histones. L'expression des gènes peut être également régulée par des ARN non codants, tels que les microARNs (miR), qui influencent l'expression des gènes de manière post-transcriptionnelle (Moutinho & Esteller, 2017). Dans l'athérosclérose, les miR participent à la régulation de plusieurs facteurs de risque comme l'homéostasie du cholestérol et l'inflammation (Feinberg & Moore, 2016). De plus, il a été montré que l'exposition *in utero* à des conditions physiologiques comme l'hypercholestérolémie maternelle implique des changements précoces dans l'expression des miR, qui peuvent être liés à la programmation

du risque de maladie plus tard dans la vie (de Paula Simino et al., 2017; Dumolt, Ma, et al., 2019b).

#### 4) Modèles animaux pour l'étude de l'athérosclérose.

La variabilité génétique et environnementale chez l'Homme, ainsi que la complexité de mettre en place des interventions durant la grossesse et du suivi clinique chez les nouveau-nés et les enfants sont parmi les facteurs limitant à l'étude des différents aspects de l'athérosclérose ainsi que sa programmation fœtale. Par contre les modèles animaux permettent de surmonter ces problématiques. Ils permettent également d'obtenir des échantillons à différents stades du développement. Ils existent de nombreux modèles animaux permettant l'étude de l'athérosclérose comme le singe, le lapin, le hamster et le rat (Getz & Reardon, 2012). Dans certains modèles la modification génétique n'est pas suffisante pour développer tous les stades de la pathogenèse de l'athérosclérose, d'où l'intérêt d'une intervention nutritionnelle par un régime athérogène (Getz & Reardon, 2006). Nous décrivons par la suite que deux modèles murins génétiquement modifiés.

##### i. Les modèles de souris :

Un des avantages d'utilisation des modèles murins dans la recherche est la caractérisation génétique bien définie de la souris « *mus musculus* », ce qui ouvre la possibilité de les transformer en animaux transgéniques ou en animaux knock-out (Badimon et al., 2013).

Les souris de type sauvage ne développent pas l'athérosclérose de manière spontanée pour plusieurs raisons, et contrairement à l'Homme :

- 1) elles ont des niveaux élevés de lipoprotéines de haute densité (HDL) antiathérogènes et de faibles niveaux de LDL et de lipoprotéines de très basse densité (VLDL) pro-athérogènes,
- 2) elles n'expriment pas la CETP, protéine de transfert des esters de cholestérol des particules HDL vers les lipoprotéines pro-athérogènes contenant de l'ApoB : LDL, VLDL et ILDL.
- 3) la composition du pool d'acides biliaires chez la souris le rend plus hydrophile, notamment la synthèse des acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -muri-choliques, réduisant l'absorption du cholestérol (Takahashi et al., 2016).

D'où la nécessité d'interventions alimentaires ou génétiques (Zadelaar et al., 2007).

Le régime « Paigen », un régime ordinaire enrichi à 1,25% de cholestérol, 0,5% d'acide cholique et 15% de graisses, est le plus utilisé (Paigen et al., 1985).

Les modèles génétiques d'athérosclérose les plus utilisés se basent sur l'altération des gènes codant le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLr) et l'apolipoprotéine E (ApoE), deux éléments clés du métabolisme du cholestérol.

A noter qu'un inconvénient du modèle murin est l'absence de rupture spontanée de plaques athérosclérotiques et de thrombose, stades finaux de la pathologie chez l'Homme (Schwartz et al., 2007). Cependant, l'occurrence de ces événements a été mise en évidence même avec des prévalences inférieures à celles observées chez des individus à risque (Calara et al., 2001). Dans le cadre de notre étude, l'objectif était d'étudier la taille des plaques au niveau des valves aortiques ainsi que l'aorte entière sans prendre en compte la possibilité de rupture de la plaque.

#### La souris ApoE déficiente (ApoE -/-)

L'ApoE, est une glycoprotéine présente dans presque toutes les lipoprotéines, servant de ligand pour les récepteurs qui éliminent les restes de VLDL et de chylomicrons. L'ApoE est également susceptible de participer aux processus inflammatoires et dans l'homéostasie du cholestérol (Curtiss & Boisvert, 2000). En outre, il a été montré que l'ApoE peut jouer un rôle dans l'excrétion biliaire et l'absorption alimentaire du cholestérol (Sehayek et al., 2000).

Plump *et al.* (Plump et al., 1992) ont produit en 1992 les premiers modèles de souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>) par une recombinaison homologue des gènes des cellules souches embryonnaires désactivant le gène *ApoE*. Dans la même année, une autre équipe a généré des souris chimériques par injection de blastocystes avec les lignées ciblées (Piedrahita et al., 1992).

La souris ApoE<sup>-/-</sup> développe tous les stades de l'athérosclérose de façon similaire à celle chez l'Homme et sous un régime alimentaire normal de type « chow » (Jawień et al., 2004). Un régime alimentaire occidental peut être utilisé pour accélérer le processus de formation des plaques (Reddick et al., 1994). Un inconvénient majeur de l'absence totale de l'ApoE est que la majorité du cholestérol plasmatique est confiné aux VLDL et non aux particules LDL comme chez l'Homme.

#### La souris déficiente aux LDL récepteurs (LDLr -/-)

Chez l'Homme, les mutations du gène LDLr provoquent une hypercholestérolémie familiale. Sous régime standard, la cholestérolémie de la souris LDLr<sup>-/-</sup> (d'environ 250 mg/dL) reste relativement inférieure que celle de la souris ApoE<sup>-/-</sup> (Ishibashi et al., 1994) ce qui fait d'elle un modèle d'athérosclérose modérée.

En 1993, des souris LDLr<sup>-/-</sup> ont été créées par ciblage génétique de cellules souches embryonnaires (Ishibashi et al., 1993). Ce modèle est très réactif au régime alimentaire. Lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en graisses et en cholestérol, les souris LDLr<sup>-/-</sup> présentent une augmentation rapide de la cholestérolémie et du développement de lésions athérosclérotiques dans les artères coronaires, la racine aortique et l'aorte (Badimon et al., 2013; Knowles & Maeda, 2000). Un autre avantage de ce modèle, est son profil des lipoprotéines plasmatiques qui ressemble à celui des humains, le cholestérol étant principalement porté par la fraction LDL.

D'autres modèles de souris génétiquement modifiées d'athérosclérose, moins fréquemment utilisées, existent comme la souris *Apobec1*<sup>-/-</sup> déficientes dans l'activité d'édition de l'ARNm de l'Apo B 100, ainsi que les souris transgéniques pour le gène de l'isoforme E2 de l'ApoE et les ApoE3-Leiden (Emini Veseli et al., 2017).

#### Modèles animaux de programmation fœtale de l'athérosclérose :

Le lapin est le premier modèle animal utilisé par l'équipe de Napoli et Palinski (Napoli et al., 1997) dans une étude au cours de laquelle ils ont mis en évidence simultanément l'effet de l'hypercholestérolémie nutritionnelle maternelle sur le développement de l'athérosclérose, ainsi que l'effet antiathérogène d'un traitement hypolipémiant et/ou antioxydant. Plusieurs études dans les modèles murins LDLr<sup>-/-</sup> (Napoli et al., 2002) et ApoE déficientes (Goharkhay et al., 2007; Trenteseaux et al., 2017) ont bien souligné l'effet de l'hypercholestérolémie maternelle dans le développement de l'athérosclérose chez la descendance.

## V. Chapitre 5 : Traitements hypolipémiants et antioxydants de l'hypercholestérolémie maternelle.

Comme déjà abordé, l'hypercholestérolémie maternelle durant la gestation expose le fœtus à un taux élevé de cholestérol accompagné d'un stress oxydant important (Liguori et al., 2007). Ces deux facteurs, ensemble ou séparément, prédisposent le fœtus au développement de l'athérosclérose plus tard dans la vie. Ainsi, les traitements visant à réduire la cholestérolémie et/ou le stress oxydant durant la grossesse, permettront de ralentir la progression de l'athérosclérose chez la descendance.

### 1) Traitements hypocholestérolémiants et grossesse

Les choix en termes de médicaments autorisés durant la grossesse restent restreints, et les données très limitées.

Les statines, famille d'hypolipémiants la plus utilisée, étaient longtemps contre-indiquées pendant la gestation en raison de leur possible risque tératogène (Edison & Muenke, 2005; Karalis et al., 2016), malgré qu'elles montrent des avantages dans la prévention de la prééclampsie (Gajzlerska-Majewska et al., 2018) et la réduction de l'athérosclérose dans la descendance (Elahi et al., 2008). Une étude plus récente suggère l'absence d'association entre l'utilisation des statines et les anomalies congénitales, cependant il existe un risque accru au faible poids à la naissance et un accouchement prématuré (Chang et al., 2021).

Dans le cadre des études chez l'animal, ni les fibrates, ni l'ézétimibe, ni les séquestrants d'acides biliaires n'induisent des effets tératogènes.

Dans un modèle d'hypercholestérolémie gestationnelle nutritionnelle chez la lapine, un traitement avec la cholestyramine pendant la gestation diminue la cholestérolémie maternelle ainsi que la taille des lésions athéromateuses chez la descendance (Napoli et al., 2000).

Chez les patientes ayant une hypercholestérolémie familiale homozygote, la LDL aphaérèse est conseillée. Elle permet de contrôler la cholestérolémie de la mère pendant la gestation et pourrait prévenir l'apparition de complications sévères (Ogura et al., 2016). Cette technique est onéreuse et actuellement réservée aux patients à risque élevée.

### 2) Traitements antioxydants et grossesse

Le stress oxydant joue un rôle central dans la physiopathologie d'un grand nombre de troubles différents, y compris les complications de la grossesse comme la prééclampsie (Rumbold et

al., 2008) ainsi qu'un retard de croissance intra-utérin (Fall et al., 2003) et une augmentation des plaques d'athérome chez la descendance (Busso et al., 2014; Napoli et al., 2000).

En parallèle, une supplémentation périnatale avec un antioxydant comme la vitamine E chez la lapine gestante, rendue hypercholestérolémique avec un régime hyper-énergétique, diminue la taille des plaques athérosclérotiques chez la descendance (Napoli et al., 2000).

Chez la ratte hypercholestérolémique gestante, une administration périnatale de différentes molécules ayant des propriétés antioxydantes montrent des effets de programmation métaboliques sur la progéniture, dont certains liés à une protection du système cardiovasculaire (Dolinoy et al., 2006; Mukai et al., 2013; Resende et al., 2013). Nous avons démontré dans le modèle de souris ApoE<sup>-/-</sup>, qu'une supplémentation périnatale avec un extrait riche en phycocyanine réduit le développement de l'athérosclérose chez la descendance en modulant le métabolisme du cholestérol (Coué et al., 2021). Cependant, del Bas *et al.* ont rapporté que les procyanidines administrées pendant la gestation et la lactation augmentaient le risque cardiovasculaire chez la descendance qui s'explique par une diminution du RCT (del Bas et al., 2015).

Afin d'évaluer l'effet d'un traitement maternel avec un hypocholestérolémiant seul ou combiné à un traitement avec un antioxydant, sur le développement l'athérosclérose de la descendance adulte, nous avons cherché à :

- 1) Diminuer l'hypercholestérolémie maternelle pendant la grossesse en utilisant une résine séquestrant les acides biliaires, la cholestyramine,
- 2) Diminuer le stress oxydant résultant de l'hypercholestérolémie maternelle par une supplémentation avec un antioxydant, la vitamine E

Les résultats positifs obtenus avec les deux interventions, séparées et combinées, proposent des pistes prometteuses dans la prévention périnatale de l'athérosclérose.

Cependant, il faut noter que les doses utilisées dans notre protocole sont élevées par rapport à celles recommandées chez l'Homme ou la femme enceinte.

Concernant la cholestyramine, une dose de 3% est administrée. Une consommation journalière moyenne de 6g de régime par une souris de 25g, correspondra à une dose de 7200 mg/kg/jour. La dose équivalente chez l'Homme (Reagan-Shaw et al., 2008), sera de 584 mg/kg/jour alors que celle généralement recommandée ne doit pas dépasser 400 mg/kg/jour. Concernant la vitamine E, une dose de 2200 UI/kg soit 1,47 g d'alpha-tocophérol a été utilisée.



Ce qui correspond à 353 mg/kg/jour chez la souris, et une dose équivalente de 29 mg/kg/jour chez l'Homme alors que les recommandations sont de 15 mg chez la femme enceinte et de 19 mg chez la femme allaitante.

Nous nous sommes basées sur la littérature pour le choix de ces doses pour avoir une efficacité du traitement, étant donné la courte durée de la période périnatale («3 semaines pour la gestation ou 6 semaines pour la gestation et lactation»).

## HYPOTHESES, OBJECTIFS ET STRATEGIES

L'objectif de notre étude était d'élucider les mécanismes potentiels par lesquels l'hypercholestérolémie maternelle durant la période périnatale programme le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris ApoE<sup>-/-</sup>, génétiquement prédisposées.

En concordance avec l'hypothèse de l'« Origine Développementale de la Santé et des Maladies » (DOHaD), l'hypercholestérolémie maternelle durant la grossesse augmente le risque cardiovasculaire chez le fœtus. En effet, les cellules macrophagiques spumeuses ainsi que les stries lipidiques, formes précoces de la plaque d'athérosclérose, ont été détectées chez l'Homme dès le stade fœtal.

Au cours de la grossesse, le taux de cholestérol maternel augmente progressivement pour répondre aux besoins accrus du fœtus. Cette augmentation peut s'avérer pathologique chez les femmes souffrantes d'une « hypercholestérolémie familiale » par rapport aux femmes normo-cholestérolémiques avant la grossesse. De plus, l'hypercholestérolémie est associée à un stress oxydant important suite à la peroxydation des lipides. Cet environnement hypercholestérolémique et pro-oxydant est capable de programmer l'athérosclérose chez le fœtus par une altération du fonctionnement placentaire, des modifications épigénétiques ou par modulation du microbiote maternel et fœtal.

Dans l'objectif de distinguer le rôle de l'hypercholestérolémie *per se* de celui du stress oxydant l'accompagnant dans la programmation de l'athérosclérose, nous avons **évaluer l'effet d'un traitement maternel avec un hypocholestérolémiant et/ou un antioxydant durant la période de gestation ou de gestation et lactation sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte.** Les deux traitements maternels ont permis de réduire le développement des plaques d'athérome chez les descendants, et les mécanismes associés variaient entre les descendants de différents traitements.

Cette étude a été réalisée en utilisant le modèle de souris ApoE<sup>-/-</sup> qui présente plusieurs avantages dans l'étude de l'athérosclérose. Le modèle est génétiquement hypercholestérolémique et prédisposé à l'athérosclérose, donc développe spontanément des plaques d'athérome sous régime contrôle. En plus, les plaques développées ont des caractéristiques et une distribution relativement similaire à celles observée chez l'Homme. Finalement, dans ce même modèle, nous avons mis en évidence que les femelles ApoE<sup>-/-</sup>

nées de mères hypercholestérolémiques apoE -/- développaient plus d'athérosclérose que les femelles apoE-/- nées de mères hypercholestérolémiques, et ceci à 25 semaines d'âge.

Pour ce faire, nous avons croisé des mâles et des femelles ApoE -/-, les mâles ne recevant aucun traitement durant le protocole. La présence de bouchon vaginal chez la femelle le matin, était signe que l'accouplement a eu lieu. Par la suite, ces femelles étaient réparties aléatoirement entre le groupe contrôle ne recevant aucun traitement, ou un des groupes traités et suivies durant toute la période de gestation et de lactation.

L'hypolipémiant choisi est la cholestyramine, dont l'administration est autorisée durant la grossesse. Une dose de 3% a été ajoutée au régime. Cette dose est récurrentement utilisée dans les modèles animaux et permet de réduire efficacement le cholestérol total, notamment non-HDL, dès deux semaines d'administration (Masuda et al., 2016). Les périodes de traitement dans notre protocole sont relativement courtes (3 semaines pour la gestation, et 6 semaines pour la gestation et la lactation).

La vitamine E est un puissant antioxydant, capable de neutraliser les radicaux libres et protéger les lipides membranaires contre la peroxydation. Une dose de 2200 unités internationales par kg de régime, soit 1,47 g d'alpha-tocophérol par kg, a été administrée. Dans la littérature, cette dose permet de réduire efficacement les produits de peroxydation lipidiques comme l'isoprostane.

6 groupes de mères ont ainsi été générés :

- 1) Un groupe contrôle (CTR) ne recevant aucun traitement,
- 2) Un groupe recevant la cholestyramine durant la période de gestation uniquement (CTY-G),
- 3) Un groupe recevant la cholestyramine durant la gestation et la lactation (CTY-GL),
- 4) Un groupe recevant la vitamine E durant la gestation uniquement (VE-G),
- 5) Un groupe recevant la vitamine E durant la gestation et la lactation (VE-GL),
- 6) Un groupe recevant un traitement simultané de cholestyramine et de vitamine E durant la gestation (CTY+VE-G).

Après le sevrage (3 semaines d'âge), les descendants ont été élevés sous régime contrôle jusqu'aux sacrifices (25 semaines d'âge).

Mon projet de thèse est co-financé par la région des Pays de la Loire et le département AlimH de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement (INRAE).

# RESULTATS

1. Effet d'un traitement périnatal en un hypocholestérolémiant sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris apoE-/-.

Dans le premier article, nous valorisons les résultats obtenus suite à la réduction des taux de cholestérol maternel par une résine : la cholestyramine. Nous avons mesuré une réduction des plaques d'athérome chez la descendance de ces mères, alors nous avons cherché à identifier les mécanismes impliqués.

Si des résultats similaires avaient été observés en termes de réduction d'athérosclérose dans d'autres conditions (modèles animaux, molécules hypolipémiantes, durée de traitement, et conditions d'élevage de la descendance), nous sommes les premiers à avoir étudié l'effet d'un traitement par la cholestyramine pendant la gestation (à partir de la conception jusqu'à la mise bas) ou la gestation et la lactation (de la conception au sevrage) dans le développement de l'athérosclérose dans la descendance adulte.

**Article 1 : Le traitement périnatal avec la cholestyramine réduit le développement de l'athérosclérose chez les descendants adultes de souris apoE-/- via des mécanismes dépendant du sexe.**

Les résultats obtenus suite au traitement maternel avec la cholestyramine font l'objet d'un article soumis au journal *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.

Nous avons eu un premier retour des relecteurs et nous sommes en train de réaliser les manipulations permettant de répondre à leurs questions.

**Perinatal cholestyramine treatment reduces atherosclerosis development in adult offspring of apoE deficient mice through sex-dependent mechanisms.**  
*ATVB, 2022*

**Marina Habib**, Mikael Croyal, Bertrand Kaeffer, Isabelle Grit, Blandine Castellano, Mathilde Gourdel, Hassan Nazih, Khadija Ouguerram



**Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.**

**URL:** <https://atvb-submit.aha-journals.org/>

**Manuscript Number:** ATVB/2022/318394

**Title:** Perinatal cholestyramine treatment reduces atherosclerosis development in adult offspring of apoE deficient mice through sex-dependent mechanisms.

**Authors:**

Marina Habib (Nantes University)

Mikaël Croyal (Nantes University)

Bertrand Kaeffer (INRAe)

Isabelle Grit (INRAE)

Blandine Castellano (INRAE)

Mathilde Gourdel (Nantes University)

Hassan Nazih (Nantes University)

Khadija OUGUERRAM (INRA)

For ATVB Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.



1 **Perinatal cholestyramine treatment reduces atherosclerosis development in**  
2 **adult offspring of apoE deficient mice through sex-dependent mechanisms.**

3 Marina Habib<sup>1</sup>, Mikael Croyal<sup>2,3,4</sup>, Bertrand Kaeffer<sup>1</sup>, Isabelle Grit<sup>1</sup>, Blandine Castellano<sup>1</sup>,  
4 Mathilde Gourdel<sup>3</sup>, Hassan Nazih<sup>5</sup>, Khadija Ouguerram<sup>1§</sup>

5 <sup>1</sup>Nantes Université, INRAE, UMR 1280, PhAN, F-44000 Nantes, France,

6 <sup>2</sup>CRNH-Ouest Mass Spectrometry Core Facility, F-44000, Nantes, France,

7 <sup>3</sup>Nantes Université, CNRS, INSERM, Institut du thorax, F-44000 Nantes, France

8 <sup>4</sup> Nantes Université, Inserm UMS 016, CNRS, UMS 3556, F-44000 Nantes, France.

9 <sup>5</sup> Nantes Université, UR2160 ISOMer, Nantes, France

10 **Running title:** Perinatal cholestyramine prevents atherosclerosis

11 **Corresponding author:**

12 Khadija Ouguerram

13 UMR 1280 PHAN, CHU Hôtel Dieu, Place Alexis Ricordeau 44093 Nantes, France.

14 Tel: +33 2 53 48 20 15

15 khadija.ouguerram@univ-nantes.fr

16 Word count: 7633

17 Total number of figures: 4

18 Total number of tables: 2

19 Total number of supplemental figures: 7

20 Total number of supplemental tables: 3

21 **Abbreviations and acronyms list**

22 ApoE<sup>-/-</sup>: apolipoprotein E-deficient

23 BA: bile acid

24 BW: body weight

25 CTY: cholestyramine

26 CTY-G: offspring born to dams treated with cholestyramine during gestation only

27 CTY-GL: offspring born to dams treated with cholestyramine during gestation and lactation

28 LDL: low-density lipoprotein

29 LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol

30 LDLr: low-density lipoprotein receptor

31 miR: microRNA

32 TC: total cholesterol

33 TG: triglycerides

34 TMAO: trimethylamine N-oxide

For ATVB Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

## 35 **Abstract**

36 **Background:** Gestational hypercholesterolemia increases the development of  
37 atherosclerotic plaques later in adult offspring. Here we aimed to study the effect of  
38 perinatal maternal treatment with cholestyramine on atherosclerosis development in adult  
39 offspring of hypercholesterolemic apoE deficient (apoE  $-/-$ ) mice.

40 **Methods and results:** ApoE  $-/-$  mice dams were maintained under control chow diet or  
41 treated with cholestyramine during gestation (3 weeks) or gestation (3 weeks) and lactation  
42 (3 weeks). After weaning, male and female offspring were maintained under chow diet until  
43 sacrificed at 25 weeks old. Atherosclerosis development in offspring, together with some of  
44 predefined atherosclerosis regulators such as bile acids and biomarkers as trimethylamine N-  
45 oxide (TMAO) and microRNAs (miRNAs), were investigated by conventional methodologies.  
46 Cholestyramine treatment significantly reduced plasma total cholesterol, LDL-cholesterol  
47 and gallbladder bile acid pool as well as oxidative stress in pregnant dams. Besides,  
48 atherosclerotic plaque development was significantly lowered in offspring born to treated  
49 dams compared with controls, without significant change in plasma levels of total  
50 cholesterol nor triglycerides. In males born to treated dams, hepatic cholesterol content and  
51 gallbladder total bile acid pool were significantly reduced, in line with the regulation of  
52 genes involved in cholesterol homeostasis. In females born to treated dams, plasma level of  
53 hydrophilic tauro-muricholic bile acid was significantly increased, while that of TMAO was  
54 significantly reduced. Finally, the hepatic miRNA-122 expression was downregulated in a sex-  
55 and maternal treatment period- dependent manner.

56 **Conclusion:** We showed that cholestyramine treatment aiming to reduce maternal  
57 hypercholesterolemia during gestation or gestation and lactation provides an anti-  
58 atherogenic benefit in adult offspring. Underlying mechanisms probably involve an *in-utero*  
59 programming of cholesterol-homeostasis related factors in a sex- and maternal treatment  
60 period- dependent manner.

61 **Keywords:** genetic hypercholesterolemia, perinatal, cholestyramine, atherosclerosis, bile  
62 acids, TMAO, microRNAs, oxidative stress

For ATVB Peer Review. Do not distribute. Destroy  
after use.

### 63 Introduction

64 Despite the progress made in the treatment of cardiovascular diseases (CVDs) and the  
65 accessibility of lipid-lowering drugs, CVDs have remained the leading cause of death  
66 worldwide (1) . Hence, prevention, early identification and risk management of CVDs  
67 constitute major health concerns. Atherosclerosis is a progressive complex vascular disease  
68 leading to CVDs. It launches as fatty streak lesions in the wall of arteries and can then lead to  
69 established fibrous lesions. At advanced stages, vulnerable plaques are susceptible to  
70 rupture and cause thrombosis (2). Besides, such fatty streaks in the intima have been  
71 identified during post-mortem examination of coronary arteries and aortas even after the  
72 first decade of life (3). It is well established that chronic hypercholesterolemia plays a major  
73 role in atherogenesis, and that blood hypertension and environmental risk factors, such as  
74 smoking, favor its progression (4).

75 Both experimental and epidemiological studies evidenced the link between pathological  
76 events during fetal life and the development of atherosclerosis-related diseases later in life  
77 (5,6). In this respect, Napoli *et al.* were the firsts to demonstrate the impact of maternal  
78 hypercholesterolemia on atherogenesis in children (7). Then different animal models of  
79 genetical and/or nutritional hypercholesterolemia during gestation underpinned this  
80 observation (8–11) and the mechanisms involved in early atherosclerosis programming are  
81 progressively being highlighted (8–12). In apoE deficient mouse model, we highlighted the  
82 association of maternal hypercholesterolemia and the increase in atherosclerotic plaque

83 development in the aortic root of adult offspring (11) through the metabolisms of  
84 trimethylamine-N-oxide (TMAO), a biomarker of atherosclerosis originating from gut  
85 bacteria metabolism (13), and bile acids, the major route of cholesterol catabolism and  
86 elimination by the liver and the bile (14).

87 Maternal hypercholesterolemia during gestation exposes the fetus to high levels of  
88 cholesterol which is accompanied by an important oxidative stress due to lipid peroxidation  
89 (15). Cholestyramine is a routinely-used effective lipid-lowering drug (16), that can be  
90 considered during hypercholesterolemic pregnancies (17). Cholesterol-lowering and  
91 antioxidant interventions during gestation, using cholestyramine and vitamin E respectively,  
92 were able to successfully reduce atherosclerosis in offspring born to rabbit dams fed high  
93 cholesterol during gestation (8,12). By administrating antioxidant C-Phycocyanin rich extract,  
94 we have also shown, in apoE <sup>-/-</sup> mouse model, that perinatal antioxidant treatment reduces  
95 atherosclerosis development in adult offspring by modulating, among other factors, liver  
96 oxidative status and bile acid metabolism(10).

97 In the current study, we aimed to explore the effects of perinatal (gestation or gestation and  
98 lactation) cholestyramine treatment on atherosclerosis development in adult offspring of  
99 genetically hypercholesterolemic apoE <sup>-/-</sup> mice. We also looked in mechanisms implicated in  
100 cholesterol homeostasis and atherosclerosis along with some biomarkers as TMAO and  
101 miRNAs.

## 102 **Materials and methods**

### 103 **Animals, diets, and tissue sampling**

104 Seven weeks old females and males B6.129P2-Apoe/J were purchased from Charles River  
105 Laboratories (Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). After one week of acclimation, mating  
106 was initiated and females with positive vaginal plug on the following morning were  
107 identified. These females were randomly assigned either to the control group (CTR) fed chow  
108 diet (A03; Safe Diets, Augy, France) during gestation and lactation, or to the cholestyramine-  
109 treated group (A03 + 3% Cholestyramine; customized at Safe Diets) during gestation only  
110 (CTY-G) (3 weeks of gestation) or during gestation and lactation (CTY-GL) (3 weeks of  
111 gestation + 3 weeks of lactation). Animals had *ad libitum* access to water and food under  
112 constant light/dark cycles (12h/12h). Offspring of all groups were weaned at 3 weeks old and  
113 maintained under control chow diet until sacrifice at 25 weeks old. To collect samples from  
114 untreated and treated mothers without disturbing their pregnancies, female apoE -/- mice  
115 were mated as described above. Gestational day 0.5 (GD 0.5) corresponded to the morning  
116 of positive vaginal plug detection. Dams were then randomly assigned either to the control  
117 group (CTR) or to the cholestyramine-treated group during gestation only (CTY-G). At GD 0.5,  
118 GD 11.5 and GD 17.5 and after four hours of fasting, blood samples were collected into K2  
119 EDTA tubes (Sarstedt, Germany) and plasma was isolated by conventional centrifugation  
120 (4,000 RPM, 4 °C, 5 min). Dams on GD 18.5 and 25-weeks old offspring were fasted for four  
121 hours and then anaesthetized under isoflurane (5L/min, 2-3%). Submandibular vein blood of

122 dams and intracardiac blood of offspring were collected on heparinized syringe into K2 EDTA  
123 tubes for plasma separation. In offspring, a physiological saline solution was injected into  
124 systemic circulation to wash out remaining blood in the aorta. Then, the hearts along with  
125 the linked ascending and descending aortas, the gallbladders and the livers were rapidly  
126 collected, frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C until analysis. Gallbladder and  
127 liver samples of dams were also collected and frozen in liquid nitrogen. For hepatic  
128 triglyceride secretion monitoring, offspring were fasted for four hours before intraperitoneal  
129 injection of 10% of triton solution (Tyloxapol, Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France)  
130 at 15 mg/30 g of body weight. Tail blood was harvested in K2 EDTA tubes at 0, 0.5, 1, 2, 3  
131 and 4 hours. All experimental procedures were approved by the Committee of Ethics in  
132 Animal Experiments of Pays de la Loire, France (APAFIS 20118) and performed according to  
133 the European Union regulations for the care and use of animals for experimental procedures  
134 (2010/63/EU).

### 135 **Aortic lesion quantification**

136 To quantify atherosclerotic lesions at the aortic root, perivascular fat was cleaned before  
137 detaching the heart from the aortic arch and aorta. Then, 2-3 mm long aortic arch base were  
138 frozen in embedding medium for serial 10 µm-thick cryosections. Neutral lipids of sections at  
139 600 and 800 µm from the heart were stained as follow: fixation with 4% formol, dehydration  
140 with isopropyl alcohol, staining with oil red O and counterstaining with hematoxylin (Sigma  
141 Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Stained slides were captured using Nanozoomer



142 Hamamatsu 2.0 HT slide scanner and quantification of neutral lipid-stained lesions were  
143 performed using image analysis software QuPath version 0.1.2 using machine learning. All  
144 the scripts developed for this analysis are available online  
145 (<https://github.com/magalieFeyeux/microPICell/tree/master/QuPathScript/AortaPlaqqese>  
146 [gmentation](#)).

#### 147 **Biochemical analyses**

148 Concentrations of predefined biomarkers were measured in plasma, bile and tissue  
149 homogenates (0.1 g/mL in NaCl 0.9%). Lipids were extracted from tissue homogenate using  
150 the Bligh and Dyer method (18). Total plasma and liver cholesterol (TC) and triglycerides (TG)  
151 as well as LDL-cholesterol (LDL-C) concentrations were determined by enzymatic assay kits  
152 (Diasys, EUROBIO Scientific, Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions.  
153 Free and tauro- and glyco-conjugated bile acids (BA) were extracted from gallbladder and  
154 plasma samples and subsequently quantified by reversed-phase liquid chromatography-  
155 tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as described previously (19). Methylamines,  
156 including the TMAO and its precursors, were extracted from plasma samples and quantified  
157 by HILIC LC-MS/MS as described previously (20). To assess the oxidative status, oxidized  
158 (GSSG) and reduced (GSH) glutathione as well as S-adenosylmethionine (SAM) and S-  
159 adenosylhomocysteine (SAH) were quantified in liver homogenates by reversed-phase LC-  
160 MS/MS as described previously (21,22) .

## 161 **Hepatic RNA extraction RT-qPCR and microRNA expression**

162 Trizol reagent (Life Technologies-Thermo-fisher, Courtaboeuf, France) was used for hepatic  
163 RNA extraction according to the manufacturer's instructions. SuperScript IV Reverse  
164 Transcriptase (Life technologies) was used for reverse transcription of 1 µg of total extracted  
165 RNA. For hepatic gene expression, RT-qPCR were performed with Bio-Rad iCycler iQ system  
166 (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) using universal SYBR Green Supermix (Biorad). The  
167 RT-qPCR protocol consisted of 40 cycles, 120s at 95 °C, 15s at 60 °C and 15s at 72 °C each.  
168 Primer sequences are available in **Supplementary Table S1**. Relative expression was  
169 calculated by the 2- $\Delta\Delta$ Ct method using GAPDH as internal control. For hepatic microRNA  
170 (miRNA) expression, hepatic total RNA was extracted as described above. cDNA was  
171 obtained from 4 ng of total RNA using TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit  
172 (ThermoFischer). RT-qPCR were performed using TaqMan™ Fast Advanced Master Mix and  
173 TaqMan™ Advanced miRNA Assay primers with the following protocol: 50 °C for 2 min, 95 °C  
174 for 20s followed by 39 cycles of 95 °C for 3 s and 60 °C for 30 s (CFX Connect™ Real-Time PCR  
175 Detection System). Primer references are reported in **Supplementary Table S2**. Relative  
176 expression was calculated by the 2- $\Delta\Delta$ Ct method using the geometric mean of let 7g-5p and  
177 let 7d-5p as internal control.

## 178 **Statistical analysis**

179 Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (Version 9.4.1, GraphPad  
180 Software Inc., La Jolla, CA, USA). The non-parametric Mann-Whitney test was used to

181 compare sex-matched offspring born to supplemented mothers with offspring born to  
182 control mothers. Data are expressed as means  $\pm$  standard deviations (SD). The results were  
183 considered to be significant at  $P < 0.05$ .

For ATVB Peer Review. Do not distribute. Destroy  
after use.

## 184 **Results**

### 185 **Gestational cholestyramine treatment reduces plasma cholesterol in dams**

186 As shown in **Table 1**, TC, LDL-C and TG levels were similar in all dams at gestational day 0.5  
187 (GD 0.5). As expected, TC and LDL-C were significantly reduced in cholestyramine-treated  
188 mothers at GD 11.5, and remained significantly lower at GD 17.5 in CTY-G dams compared to  
189 untreated CTR dams. In contrast, no significant change was observed in TG concentrations  
190 upon cholestyramine treatment during gestation. Besides, BA levels were altered by the  
191 treatment. A significant decrease in gallbladder total BA, and more specifically free and  
192 tauro-conjugated BA, was measured in CTY-G dams compared to CTR dams (**Table 1** and  
193 **Supplemental Figure S1**,  $P < 0.05$  for all). As hypercholesterolemia is associated to oxidative  
194 stress (15), we also assessed the effect of cholestyramine on liver oxidative balance. Hepatic  
195 GSH and GSSG concentrations were significantly reduced in CTY-G dams compared to CTR ( $P$   
196  $< 0.05$  for both) but no change was observed for the GSH-to-GSSG ratio (**Supplemental Figure**  
197 **S2 A-C**). In addition, hepatic SAM concentrations were increased in CTY-G dams ( $P = 0.008$ ) in  
198 comparison to CTR while no change was noticed for hepatic SAH (**Supplemental Figure S2 D-**  
199 **F**). Of note, the SAM-to-SAH ratio tended to increase after supplementation ( $P = 0.081$ ).

### 200 **Maternal cholestyramine treatment during gestation or gestation and lactation reduces** 201 **atherosclerotic plaques development in offspring**

202 Maternal treatment during gestation or gestation and lactation decreased atherosclerotic  
203 lesion area in both adult male and female offspring. At 600  $\mu\text{m}$  from the heart, CTY-G males

204 displayed less atherosclerotic lesions than CTR males ( $2.7 \pm 1.7\%$  vs  $6.3 \pm 1.8\%$ ,  $P=0.001$ ), as  
205 shown in **Figure 1A**, similar results were obtained for CTY-GL males ( $2.8 \pm 1.3\%$  vs  $6.3 \pm 1.8$   
206  $\%$ ,  $P < 0.001$ ). Atherosclerotic plaque reduction was also significant at  $800\ \mu\text{m}$  from the heart  
207 in CTY-G ( $2 \pm 1.9\%$ ) and CTY-GL males ( $2.2 \pm 1.5\%$ ) compared to CTR males ( $4.4 \pm 1.9\%$ ,  $P$   
208  $=0.014$  and  $P =0.028$ , respectively) (**Figure 1B**). In their turn, CTY-G and CTY-GL females  
209 benefited from less atherosclerotic lesions compared to CTR females at  $600\ \mu\text{m}$  from the  
210 heart ( $3.4 \pm 1.6\%$  and  $4.3 \pm 1.4\%$  vs  $6.1 \pm 1.1\%$ ,  $P =0.003$  and  $P =0.012$ , respectively) (**Figure**  
211 **1C**) and at  $800\ \mu\text{m}$  ( $4 \pm 2\%$  and  $3.8 \pm 1.9\%$  vs  $6.7 \pm 1.7\%$ ,  $P =0.055$  and  $P =0.005$ ) (**Figure**  
212 **1D**). Note that maternal treatment during gestation and lactation did not imply further  
213 atherosclerotic plaques reduction than that observed after gestation treatment only.

#### 214 **Maternal cholestyramine treatment did not impact plasma lipids in offspring**

215 Male and female offspring born to treated dams during gestation (CTY-G) or gestation and  
216 lactation (CTY-GL) weighed significantly higher at weaning (3 weeks old) than sex-matched  
217 offspring born to untreated mothers (CTR), but this difference in weights was no longer  
218 observed at 25 weeks (**Supplemental Table S3**).

219 Offspring plasma TC and TG were not significantly modified by maternal supplementation  
220 during gestation or gestation and lactation (**Supplemental Table S3**). The hepatic cholesterol  
221 content was significantly lower in CTY-G and CTY-GL males compared to CTR males, whereas  
222 no significant change was found in female groups. Besides, hepatic TG content of CTY-G

223 males significantly increased compared to CTR males while those of CTY-GL males or CTY-G  
224 and CTY-GL females was not modified. Hepatic TG secretion was monitored after tyloxapol  
225 injection. Neither CTY-G and CTY-GL males nor females presented significant change in  
226 hepatic TG secretion compared to sex-matched CTR group for 4 hours post-injection  
227 (**Supplemental Figure S3**).

#### **228 Maternal cholestyramine changes the concentrations of bile acids in offspring**

229 In CTY-G and CTY-GL male offspring, the total pool of BAs was significantly reduced in  
230 gallbladder compared to CTR males (**Figure 2A**). Unconjugated BAs were significantly  
231 reduced in CTY-GL males by the significant reduction of cholic acid (CA,  $P = 0.035$ ) and  
232 muricholic acid (MCA,  $P = 0.014$ ) (**Supplemental Figure S4**). Interestingly, the unconjugated  
233 form of ursodeoxycholic acid (UDCA) tended to increase in CTY-G males ( $P = 0.067$ ). Maternal  
234 cholestyramine treatment resulted in tauro-conjugated BAs decrease in both groups of male  
235 offspring (**Figure 2A**). Tauro-cholic acid (tauro-CA), tauro-muricholic acid (tauro-MCA), tauro-  
236 deoxycholic acid (tauro-DCA) and tauro-chenodeoxycholic acid (tauro-CDCA) were reduced  
237 in the two male groups (**Supplemental Figure S4**). CTY-GL males also exhibited reduced  
238 glyco-conjugated BA concentrations in the gallbladder (**Figure 2A**) with a significant  
239 reduction of glyco-CA and glyco-CDCA (**Supplemental Figure S4**). In female offspring,  
**240** maternal cholestyramine treatment did not impact significantly gallbladder total BAs (**Figure**  
241 **2B**). The unconjugated BAs did not differ between groups neither did tauro- and glyco-  
242 conjugated gallbladder BAs. Nevertheless, tauro-DCA and tauro-lithocholic acid (tauro-LCA)

243 levels were significantly higher in CTY-G and CTY-GL females as well as tauro-CDCA in CTY-GL  
244 females (**Supplemental Figure S5**). Finally, glyco-CA and glyco-UDCA levels were significantly  
245 reduced in CTY-GL females compared to CTR.

246 In contrast, maternal cholestyramine supplementation had no significant effect on plasma  
247 total BA concentrations of CTY-G males, whereas a significant increase was observed in CTY-  
248 GL males ( $P = 0.008$ ) compared to CTR (**Figure 3A**). In CTY-GL males, unconjugated BA  
249 concentrations tended to increase ( $P = 0.078$ ), whereas tauro-conjugated BA concentrations  
250 were significantly higher than that of CTR males ( $P = 0.015$ ). Glyco-conjugated BA  
251 concentrations were not changed in males after supplementation. Plasma total and  
252 unconjugated BA concentrations were not significantly modulated in female offspring  
253 (**Figure 3B**), while glyco-conjugated BA concentrations were significantly reduced in CTY-G  
254 and CTY-GL females compared to CTR and tauro-conjugated BA concentrations were  
255 significantly higher in CTY-G females. More specifically, tauro-CA was significantly elevated in  
256 CTY-GL males, CTY-G and CTY-GL females compared to sex-matched CTR, but only females  
257 born to treated mothers had significantly higher tauro-MCA levels (**Supplemental Figure S6**).

### 258 **Maternal cholestyramine treatment reduces plasma TMAO concentrations only in female** 259 **offspring**

260 Interestingly, CTY-G and CTY-GL females benefited from a significant reduction of plasma  
261 TMAO levels ( $13 \pm 6 \mu\text{mol/L}$  and  $12 \pm 5 \mu\text{mol/L}$  vs  $24 \pm 8 \mu\text{mol/L}$ ,  $P = 0.041$  and  $P = 0.017$   
262 respectively, **Supplemental Figure S7**). Other quantified trimethylamine precursors of TMAO

263 (trimethylamine [TMA], choline, carnitine, creatinine, betaine) were not significantly  
264 modified in male or female offspring born to treated dams compared to those born to  
265 untreated dams.

#### 266 **Maternal cholestyramine treatment modifies hepatic miRNA expression in offspring**

267 As shown in **Figure 4**, miR-122-5p and miR-223-3p hepatic expression were significantly  
268 reduced in CTY-G males compared to CTR males ( $P = 0.029$  and  $P = 0.032$ , respectively),  
269 whereas only miR-223-3p expression was significantly reduced in CTY-GL males ( $P = 0.032$ ). In  
270 CTY-GL females, perinatal cholestyramine treatment of dams led to significant reduction in  
271 miR-122-5p ( $P = 0.016$ ) and miR-30c-5p ( $P = 0.016$ ) hepatic expression, and to a significant  
272 increase in miR-27-3p ( $P = 0.029$ ) hepatic expression compared to CTR. MiR-30c-5p hepatic  
273 expression was also reduced in CTY-G females compared to CTR ( $P = 0.029$ ).

#### 274 **Maternal cholestyramine treatment changes hepatic expression of some genes involved in** 275 **lipid metabolism in offspring**

276 Relative gene expression were normalized to GAPDH expression and are reported in **Table 2**.  
277 In CTY-G males, hepatic expression of *Hmgcr*, the rate limiting enzyme in cholesterol  
278 biosynthesis, tended to reduce ( $P = 0.08$ ). *Hmgcr* expression is controlled by *SREBP-2* which  
279 was significantly reduced in CTY-G male offspring ( $P = 0.05$ ). *ABCG8* expression was also  
280 reduced in these males ( $P = 0.03$ ). Hepatic expression of *LDLr* was not significantly modified in  
281 CTY-G males while *pcsk9* expression was significantly reduced ( $P = 0.02$ ). A significant



282 decrease in *LXRα* was also noticed in CTY-G males (P <0.01). Concerning genes involved in  
283 bile acid metabolism, hepatic expression of *Cyp7a1* was not modified nor that of BA  
284 transporters (*ABCB11* and *Slc10a1*). In CTY-GL males, *Hmgcr*, *ACAT-2* and *ABCG8* expression  
285 were significantly downregulated (P =0.03 and P <0.01, respectively), whereas *MTTP* was  
286 upregulated (P <0.01). Again, *pcsk9* expression was reduced (P =0.05) without changes in  
287 *LDLr* expression. Interestingly, another protein that limits LDL uptake is the inducible  
288 degrader of the LDL receptor (*Idol*) that showed a significant upregulation in CTY-GL males (P  
289 =0.01). *ABCG1* was significantly downregulated in CTY-GL males (P <0.01). In these males,  
290 *Slc10a1* and *ABCB4* expression tended to increase (P =0.07) along with a significant  
291 reduction of *Cyp7a1* and *LXRα* expressions (P =0.04 and P =0.01, respectively).

292 Contrarily to males, CTY-G females showed an increased expression of *Hmgcr* (P =0.01).  
293 *Pcsk9* expression tended to increase (P =0.06) without a significant change in *LDLr*  
294 expression. *SR-B1* expression was also significantly increased (P <0.01). *FXR* expression  
295 showed significant upregulation in CTY-G females (P =0.03). No significant changes in BA  
296 influx (*Slc10a1*) or efflux (*ABCB11*, *ABCB4*) transporters were observed in CTY-G females  
297 compared to CTR. In CTY-GL females, *Idol* expression significantly decreased (P <0.01) with  
298 no variation in *LDLr* expression. *LXRα* expression tended to be increased in CTY-GL females  
299 (P =0.06).

## 300 **Discussion**

301 We investigated the effect of maternal cholestyramine treatment in hypercholesterolemic  
302 apoE  $-/-$  mice during gestation or gestation plus lactation in the development of  
303 atherosclerosis in their adult offspring. Our results demonstrated the effectiveness of early  
304 cholestyramine intervention in managing genetical hypercholesterolemia during these two  
305 critical periods of fetal/newborn's development. We showed that gestational  
306 cholestyramine treatment reduces atherosclerotic plaque formation in the aortic valves of  
307 adult offspring through several mechanisms involving bile acid metabolism, plasma levels of  
308 TMAO, and gene and miRNA hepatic expression. Our study also highlighted the importance  
309 of the treatment period for cholestyramine efficiency and unraveled a sexual dimorphism in  
310 the molecular mechanisms related to its benefits.

311 Hypercholesterolemia is a major risk factor for CVD. However, the Clinical guidance from the  
312 National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia ruled that only BA  
313 sequestrants like cholestyramine could be considered as lipid-lowering drug for  
314 hypercholesterolemic pregnant women (17). In the current study, we used the apoE  $-/-$   
315 mice, characterized by elevated plasma cholesterol concentration, their ability to develop  
316 atherosclerosis without nutritional interventions (23), and their responsiveness to  
317 cholestyramine treatment within two weeks (24). Dams were monitored during the  
318 cholestyramine treatment period and no physiological or behavioral disturbances were  
319 noticed. As expected, maternal cholestyramine treatment effectively reduced total plasma

320 and LDL-cholesterol during gestation as previously published in rabbit (8,12). The present  
321 study reports for the first time the effect of cholestyramine treatment in apoE <sup>-/-</sup> mice on  
322 maternal and offspring bile acid (BA) metabolism. Thus, we measured lower gallbladder BA  
323 in treated dams. As hypercholesterolemia is associated with oxidative stress (15), we  
324 investigated the effect of cholestyramine on maternal liver oxidative balance. Our data  
325 suggest a decrease in oxidative stress in cholestyramine treated mothers. Indeed, although  
326 hepatic GSH and GSSH levels were reduced, the ratio of these metabolites did not differ  
327 compared to untreated mothers and the level of hepatic SAM, the main precursor of  
328 antioxidant GSH (25) was significantly increased.

329 Perinatal cholestyramine treatment significantly reduced atherosclerotic plaques  
330 development in offspring. Therefore, we further investigated predefined metabolites known  
331 to play a key role in atherosclerosis development.

332 Here we showed that maternal treatment with cholestyramine did not change plasma  
333 cholesterol of offspring, in line with the absence of modification in *LDLr* expression, despite  
334 the sex-specific changes in two of its regulators (*Idol* and *Pcsk9*). The lack of changes in TC  
335 and TG concentrations in offspring has been already reported in two other studies  
336 conducted in rabbit and mice (8)(12), where cholestyramine during pregnancy decreases  
337 atherosclerotic plaques in offspring while TC and TG were unchanged at birth or later.

338 Cholesterol homeostasis is tightly related to that of BAs (26). After returning to the liver,  
339 cholesterol is converted into BAs, primarily through the cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (or  
340 CYP7A1). BAs are then excreted to the bile and eliminated via feces. This process, also called  
341 reverse cholesterol transport, prevents atherosclerosis (26).

342 In CTY-G and CTY-GL males, gallbladder BAs were significantly reduced whereas only CTY-GL  
343 males exhibited higher plasma BAs compared to CTR males. We can be argued that BAs are  
344 reduced in males since they are predominantly present in the gallbladder during their  
345 enterohepatic cycle (27). This reduction of gallbladder BAs in CTY-G and CTY-GL males can be  
346 explained by the decrease in hepatic cholesterol content in both groups and a trend toward  
347 lowering of mRNA expression of the CYP7A1 as well as a reduction of its nuclear factor  
348 regulator *LXR $\alpha$*  (28) in CTY-G males. This *LXR $\alpha$*  reduction was also measured in CTY-GL males.  
349 However, *FXR* expression, an important nuclear receptor and negative regulator of BA  
350 synthesis (29), did not show any difference between groups. Reduced atherosclerotic  
351 plaques in male offspring seems to be inconsistent with the reduction of the BA pool since  
352 BA excretion prevents atherosclerosis and that its reduction is associated with a higher risk  
353 of atherosclerosis and coronary heart disease (30–32). In the current study, we speculated  
354 that BA pool and metabolism were subjected to *in-utero* and/or post-natal programming  
355 following maternal cholestyramine treatment during these two periods. In this respect, it  
356 was reported that BA concentration is higher in the fetal than in the healthy maternal  
357 circulation in human and mouse (33). Thereby, BAs are eliminated to maternal circulation  
358 creating a fetus-to-mother gradient transfer across the placenta (34). In contrast, this

359 gradient appears to be reversed in cases of increased levels of plasma BAs of intrahepatic  
360 cholestasis of pregnancy (35). Therefore, we can speculate that the decrease in BA pool of  
361 cholestyramine treated dams exacerbates the fetal BA flow toward the mother, thereby  
362 programming a lower BA pool in the progenies that remained irreversible in adulthood.

363 Several studies have also provided programming evidences of maternal treatment on  
364 cholesterol and BA metabolism in offspring. Innis *et al.* reported that maternal treatment of  
365 pregnant rats with cholestyramine enhanced activity of fetal Hmg-CoA reductase with no  
366 significant changes in CYP7A1 activity (36). In a mouse model of intrahepatic cholestasis of  
367 pregnancy, maternal hypercholanemia induced by diet enriched in CA affects the metabolic  
368 phenotype of male and female offspring, with female offspring developing a metabolic  
369 syndrome (33). Colombo *et al.* (34) also suggested a later maturation of fetal BA uptake,  
370 probably taking place postnatally. This could explain the differences observed in the present  
371 study in BA pools with different maternal treatment period (CTY-G and CTY-GL) but in sex-  
372 matched-offspring.

373 Data obtained in males and females showed a sexual dimorphism with a lower BA pool in  
374 males and unchanged one in females. Epigenetic differential programming in male versus  
375 female offspring has been previously reviewed (37,38). In CTY-G and CTY-GL females, we  
376 noticed a significant increase in some BAs in gallbladder like tauro-DCA and tauro-LCA, but  
377 not in the total bile acid pool as observed in males. A role of tauro-LCA, tauro-CA and tauro-  
378 CDCA in upregulating nitric oxide (NO) production by inducing the expression of endothelial  
379 NO synthase (eNOS) was previously described (39). In fact, vascular health and homeostasis

380 are mediated by NO bioavailability. NO is shown to be implicated in multiple factors of  
381 atherosclerosis such as endothelial dysfunction, inflammation, vascular smooth muscle  
382 proliferation (40). Plasma tauro-CA is also increased in CTY-GL males.

383 Importantly, in female offspring, maternal cholestyramine treatment during gestation and  
384 during gestation and lactation decreased plasma TMAO levels without a change in precursor  
385 metabolites which suggests a modification of TMAO turnover. Pro-atherogenic role of  
386 TMAO, described as an independent risk factor of atherosclerosis, is attributed to its ability  
387 to modify macrophages profile by enhancing cholesterol uptake as well as by inhibiting BA  
388 synthesis (41). Our group has previously shown a correlation between TMAO levels in  
389 plasma and atherosclerotic lesions area in the aortic root of apoE -/- (11). This reduction was  
390 not observed in male offspring.

391 MiRNAs are important regulators of cholesterol homeostasis, thus biomarkers and  
392 therapeutic targets of atherosclerosis (42). Furthermore, maternal hypercholesterolemia  
393 during gestation induced programming hepatic miRNAs of offspring (38). In CTY-G males and  
394 CTY-GL females, a significant reduction in miR-122 expression, the predominant miRNA in  
395 the liver, has been observed (43). Recently, it has been reported that increased serum miR-  
396 122 expression increases severity of atherosclerotic lesions (44), and miR-122  
397 downregulation reduces plasma cholesterol and cholesterol synthesis rate (45). These  
398 results are in line with the decrease in *Hmgcr* expression and hepatic cholesterol content  
399 observed in CTY-G males. Anti-atherosclerotic properties of miR-223 are partially due to its  
400 implication in cholesterol homeostasis and endothelial inflammation (46). However, in CTY-G

401 and CTY-GL male offspring, miR-223-3p hepatic expression was significantly downregulated.  
402 As Vickers *et al.* revealed a positive association between miR-223 hepatic expression and  
403 cholesterol levels (47), the reduced hepatic cholesterol content observed here may explain  
404 reduced miR-223 hepatic expression. Note that miR-122 and miR-233 recently gained more  
405 attention in atherosclerosis as they were proposed to be markers of plaques instability (48).  
406 Finally, hepatic expression of miR-27b was significantly increased in CTY-GL females. It was  
407 shown that treatment of apoE <sup>-/-</sup> mice with miR-27-3p agomir leads to reduced  
408 atherosclerotic plaques area associated with reduced pro-inflammatory cytokines' secretion  
409 and reduced lipid accumulation in macrophages in abdominal cavity (49).

410 MiRNAs are known to post-transcriptionally inhibit the expression of their target mRNAs. We  
411 state that, while looking for inverse correlation between the expression of studied miRNAs  
412 and that of their target mRNAs, we frequently rather found no correlation or positive  
413 correlation which appears to be commonly occurring as discussed elsewhere (50).

414 Finally, we showed that treatment with cholestyramine during gestation is associated with a  
415 decrease in hepatic oxidative stress in mothers. This result is consistent with data reported  
416 by Napoli *et al.* in rabbit (12). Several mechanisms by which oxidative stress may promote  
417 atherogenesis have been reported (51–53) and antioxidant intervention during gestation  
418 attenuated atherosclerosis development in offspring (8,10,12). It can be assumed that this  
419 decrease in maternal oxidative stress reduces the exposition of the fetus to the deleterious  
420 effects of free radicals. Nevertheless, it would be interesting to examine in a future study the  
421 consequence of this reduction on placental exchanges between the mother and the fetus.

422 Some limitations of our study must be acknowledged as we were not able to study the  
423 dynamics of BAs in the progeny. However, we can assume an increase in their turnover in  
424 part supported by sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) gene expression  
425 tendency to increase. Unfortunately, we did not measure intestine BA pool which limits the  
426 possibility of having an accurate view of BA metabolism in different compartments of the  
427 enterohepatic cycle.

428 To our knowledge, this is the first study to evaluate atherosclerosis development in adult  
429 offspring born to cholestyramine-treated apoE deficient mice, during gestation or during  
430 gestation and lactation. Our results showed that cholestyramine treatment during gestation  
431 solely is able to provide anti-atherogenic effects in offspring and that a prolonged treatment  
432 during the lactation did not exacerbate these effects. Thus, to better understand the anti-  
433 atherogenic properties of this uterine environment, studies focusing on the potential  
434 histological and functional modifications of placenta upon maternal cholestyramine  
435 treatment are needed. It would be also interesting, in further study, to measure the kinetics  
436 of BAs turnover to better understand the change in their pool observed in our study at least  
437 in males.

### 438 **Acknowledgments**

439 We thank the IBISA MicroPICell facility (Biogenouest), member of the national infrastructure  
440 France-Bioimaging supported by the French national research agency (ANR-10-INBS-04) for  
441 their technical support in atherosclerotic plaques quantification, and LVTS UMRS1148 (Paris,



442 France) for the help in histological preparation of the aortic valves. We are also grateful for  
443 Alexis Gandon, Agnes David and Chloe Chaine for their technical help.

#### 444 **Sources of Funding**

445 This work was supported by AlimH Inrae department and research program EPERSAT by  
446 region Pays de la Loire.

#### 447 **Disclosures**

448 Nothing to disclose

#### 449 **Supplemental Materials**

450 Supplemental tables S1 to S3

451 Supplemental figures S1 to S7

For ATVB Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

## 452 References

- 453 1. Cardiovascular diseases (CVDs). Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))  
454 sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)
- 455 2. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000 Sep;407(6801):233–41.
- 456 3. Stary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of  
457 children and young adults. *Arterioscler Dallas Tex*. 1989 Feb;9(1 Suppl):I19-32.
- 458 4. Frohlich J, Lear SA. Old and new risk factors for atherosclerosis and development of  
459 treatment recommendations. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29(9):838–42.
- 460 5. Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*. 1995 Jul 15;311(6998):171–4.
- 461 6. Mendelson MM, Lyass A, O'Donnell CJ, D'Agostino RB, Levy D. Association of  
462 Maternal Prepregnancy Dyslipidemia With Adult Offspring Dyslipidemia in Excess of  
463 Anthropometric, Lifestyle, and Genetic Factors in the Framingham Heart Study. *JAMA*  
464 *Cardiol*. 2016 Apr 1;1(1):26.
- 465 7. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, et al.  
466 Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal  
467 hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation  
468 precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1997 Dec  
469 1;100(11):2680–90.
- 470 8. Palinski Wulf, D'Armiento Francesco P., Witztum Joseph L., de Nigris Filomena,  
471 Casanada Florencia, Condorelli Mario, et al. Maternal Hypercholesterolemia and  
472 Treatment During Pregnancy Influence the Long-Term Progression of Atherosclerosis in  
473 Offspring of Rabbits. *Circ Res*. 2001 Nov 23;89(11):991–6.
- 474 9. Napoli C, de Nigris F, Welch JS, Calara FB, Stuart RO, Glass CK, et al. Maternal  
475 Hypercholesterolemia During Pregnancy Promotes Early Atherogenesis in LDL  
476 Receptor-Deficient Mice and Alters Aortic Gene Expression Determined by Microarray.  
477 *Circulation*. 2002 Mar 19;105(11):1360–7.
- 478 10. Coué M, Croyal M, Habib M, Castellano B, Aguesse A, Grit I, et al. Perinatal  
479 Administration of C-Phycocyanin Protects Against Atherosclerosis in apoE-Deficient  
480 Mice by Modulating Cholesterol and Trimethylamine-N-Oxide Metabolisms.  
481 *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021 Oct;41(12):e512–e523
- 482 11. Trenteseaux C, Gaston A thu, Aguesse A, Poupeau G, de Coppet P, Andriantsitohaina R,  
483 et al. Perinatal Hypercholesterolemia Exacerbates Atherosclerosis Lesions in Offspring  
484 by Altering Metabolism of Trimethylamine-N-Oxide and Bile Acids. *Arterioscler*  
485 *Thromb Vasc Biol*. 2017 Nov;37(11):2053–63.

- 486 12. Napoli C, Witztum JL, Calara F, de Nigris F, Palinski W. Maternal  
487 Hypercholesterolemia Enhances Atherogenesis in Normocholesterolemic Rabbits,  
488 Which Is Inhibited by Antioxidant or Lipid-Lowering Intervention During Pregnancy:  
489 An Experimental Model of Atherogenic Mechanisms in Human Fetuses. *Circ Res*. 2000  
490 Nov 10;87(10):946–52.
- 491 13. Croyal M, Saulnier PJ, Aguesse A, Gand E, Ragot S, Roussel R, et al. Plasma  
492 Trimethylamine N-Oxide and Risk of Cardiovascular Events in Patients With Type 2  
493 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020 Jul 1;105(7):2371–80.
- 494 14. Russell DW. Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J Lipid Res*.  
495 2009 Apr;50:S120–5.
- 496 15. Liguori A, D’Armiento F, Palagiano A, Balestrieri M, Williams-Ignarro S, De Nigris F,  
497 et al. Effect of gestational hypercholesterolaemia on omental vasoreactivity, placental  
498 enzyme activity and transplacental passage of normal and oxidised fatty acids. *BJOG Int  
499 J Obstet Gynaecol*. 2007 Sep 28;114(12):1547–56.
- 500 16. Scaldaferrri F, Pizzoferrato M, Ponziani FR, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Use and  
501 indications of cholestyramine and bile acid sequestrants. *Intern Emerg Med*. 2013  
502 Apr;8(3):205–10.
- 503 17. Goldberg AC, Hopkins PN, Toth PP, Ballantyne CM, Rader DJ, Robinson JG, et al.  
504 Familial Hypercholesterolemia: Screening, diagnosis and management of pediatric and  
505 adult patients. *J Clin Lipidol*. 2011 Jun;5(3):S1–8.
- 506 18. Bligh EG, Dyer WJ. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND  
507 PURIFICATION. :7.
- 508 19. Brochard C, Bouguen G, Olivier R, Durand T, Henno S, Peyronnet B, et al. Altered  
509 epithelial barrier functions in the colon of patients with spina bifida. *Sci Rep*. 2022  
510 Dec;12(1):7196.
- 511 20. Pelletier CC, Croyal M, Ene L, Aguesse A, Billon-Crossouard S, Krempf M, et al.  
512 Elevation of Trimethylamine-N-Oxide in Chronic Kidney Disease: Contribution of  
513 Decreased Glomerular Filtration Rate. *Toxins*. 2019 Nov 1;11(11):635.
- 514 21. Bláhová L, Kohoutek J, Lebedová J, Bláha L, Večeřa Z, Buchtová M, et al.  
515 Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in tissues by a novel  
516 liquid chromatography-mass spectrometry method: application in an inhalation study of  
517 Cd nanoparticles. *Anal Bioanal Chem*. 2014 Sep;406(24):5867–76.
- 518 22. Kirsch SH, Knapp JP, Geisel J, Herrmann W, Obeid R. Simultaneous quantification of  
519 S-adenosyl methionine and S-adenosyl homocysteine in human plasma by stable-isotope  
520 dilution ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J  
521 Chromatogr B*. 2009 Nov;877(30):3865–70.

- 522 23. Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donckt C, Martinet W, et  
523 al. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2017 Dec;816:3–13.
- 524 24. Masuda Y, Yamaguchi S, Nishizawa T. Cholesterol-lowering pattern affects the  
525 progression of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *J Pharmacol Sci*. 2016  
526 Dec;132(4):271–4.
- 527 25. Lozano-Sepulveda SA, Bautista-Osorio E, Merino-Mascorro JA, Varela-Rey M, Muñoz-  
528 Espinosa LE, Cordero-Perez P, et al. S-adenosyl-L-methionine modifies antioxidant-  
529 enzymes, glutathione-biosynthesis and methionine adenosyltransferases-1/2 in hepatitis  
530 C virus-expressing cells. *World J Gastroenterol*. 2016;22(14):3746.
- 531 26. Afonso MS, Machado RM, Lavrador M, Quintao ECR, Moore K, Lottenberg A.  
532 Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis. *Nutrients*. 2018 Jun  
533 13;10(6):760.
- 534 27. Hofmann AF. The Continuing Importance of Bile Acids in Liver and Intestinal Disease.  
535 *Arch Intern Med*. 1999 Dec 13;159(22):2647.
- 536 28. Chiang JYL, Ferrell JM. Up to date on cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1) in  
537 bile acid synthesis. *Liver Res*. 2020 Jun;4(2):47–63.
- 538 29. Claudel T, Staels B, Kuipers F. The Farnesoid X Receptor: A Molecular Link Between  
539 Bile Acid and Lipid and Glucose Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005  
540 Oct;25(10):2020–30.
- 541 30. Charach G, Grosskopf I, Rabinovich A, Shochat M, Weintraub M, Rabinovich P. The  
542 association of bile acid excretion and atherosclerotic coronary artery disease. *Ther Adv  
543 Gastroenterol*. 2011 Mar;4(2):95–101.
- 544 31. Charach G, Rabinovich A, Argov O, Weintraub M, Rabinovich P. The Role of Bile Acid  
545 Excretion in Atherosclerotic Coronary Artery Disease. *Int J Vasc Med*. 2012;2012:1–3.
- 546 32. Charach G, Argov O, Geiger K, Charach L, Rogowski O, Grosskopf I. Diminished bile  
547 acids excretion is a risk factor for coronary artery disease: 20-year follow up and long-  
548 term outcome. *Ther Adv Gastroenterol*. 2018 Jan 1;11:1756283X1774342.
- 549 33. Papacleovoulou G, Abu-Hayyeh S, Nikolopoulou E, Briz O, Owen BM, Nikolova V, et  
550 al. Maternal cholestasis during pregnancy programs metabolic disease in offspring. *J  
551 Clin Invest*. 2013 Jul 1;123(7):3172–81.
- 552 34. Colombo C, Roda A, Roda E, Buscaglia M, Dell'agnola CA, Filippetti P, et al.  
553 Correlation between Fetal and Maternal Serum Bile Acid Concentrations. *Pediatr Res*.  
554 1985 Feb;19(2):227–31.

- 555 35. Geenes V, Lövgren-Sandblom A, Benthin L, Lawrance D, Chambers J, Gurung V, et al.  
556 The Reversed Feto-Maternal Bile Acid Gradient in Intrahepatic Cholestasis of  
557 Pregnancy Is Corrected by Ursodeoxycholic Acid. *Lobaccaro JMA*, editor. *PLoS ONE*.  
558 2014 Jan 8;9(1):e83828.
- 559 36. Innis SM. Influence of Maternal Cholestyramine Treatment on Cholesterol and Bile  
560 Acid Metabolism in Adult Offspring. *J Nutr*. 1983 Dec 1;113(12):2464–70.
- 561 37. Gabory A, Attig L, Junien C. Sexual dimorphism in environmental epigenetic  
562 programming. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 May 25;304(1–2):8–18.
- 563 38. Dumolt JH, Patel MS, Rideout TC. Gestational hypercholesterolemia programs hepatic  
564 steatosis in a sex-specific manner in ApoE-deficient mice. *J Nutr Biochem*. 2022  
565 Mar;101:108945.
- 566 39. Guizoni DM, Vettorazzi JF, Carneiro EM, Davel AP. Modulation of endothelium-  
567 derived nitric oxide production and activity by taurine and taurine-conjugated bile acids.  
568 *Nitric Oxide*. 2020 Jan;94:48–53.
- 569 40. Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide  
570 and atherosclerosis: An update. *Nitric Oxide*. 2006 Dec;15(4):265–79.
- 571 41. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, DuGar B, et al. Gut flora  
572 metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011  
573 Apr;472(7341):57–63.
- 574 42. Willeit P, Skroblin P, Kiechl S, Fernández-Hernando C, Mayr M. Liver microRNAs:  
575 potential mediators and biomarkers for metabolic and cardiovascular disease? *Eur Heart*  
576 *J*. 2016 Nov 14;37(43):3260–6.
- 577 43. Jopling C. Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biol*. 2012  
578 Feb;9(2):137–42.
- 579 44. Wang YL, Yu W. Association of circulating microRNA-122 with presence and severity  
580 of atherosclerotic lesions. *PeerJ*. 2018 Jul 4;6:e5218.
- 581 45. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of  
582 lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab*. 2006 Feb;3(2):87–  
583 98.
- 584 46. Zhang MW, Shen YJ, Shi J, Yu JG. MiR-223-3p in Cardiovascular Diseases: A  
585 Biomarker and Potential Therapeutic Target. *Front Cardiovasc Med*. 2021 Jan  
586 20;7:610561.

- 587 47. Vickers KC, Landstreet SR, Levin MG, Shoucri BM, Toth CL, Taylor RC, et al.  
588 MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. *Proc Natl Acad Sci*. 2014 Oct  
589 7;111(40):14518–23.
- 590 48. Singh S, de Ronde MWJ, Kok MGM, Beijk MA, De Winter RJ, van der Wal AC, et al.  
591 MiR-223-3p and miR-122-5p as circulating biomarkers for plaque instability. *Open*  
592 *Heart*. 2020 Jun;7(1):e001223.
- 593 49. Xie W, Li L, Zhang M, Cheng HP, Gong D, Lv YC, et al. MicroRNA-27 Prevents  
594 Atherosclerosis by Suppressing Lipoprotein Lipase-Induced Lipid Accumulation and  
595 Inflammatory Response in Apolipoprotein E Knockout Mice. Zhang Y, editor. *PLOS*  
596 *ONE*. 2016 Jun 3;11(6):e0157085.
- 597 50. Hill CG, Matyunina LV, Walker D, Benigno BB, McDonald JF. Transcriptional  
598 override: a regulatory network model of indirect responses to modulations in microRNA  
599 expression. *BMC Syst Biol*. 2014 Dec;8(1):36.
- 600 51. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J*  
601 *Clin Invest*. 1991 Dec 1;88(6):1785–92.
- 602 52. Liao F, Andalibi A, deBeer FC, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic control of  
603 inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in  
604 response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest*. 1993 Jun 1;91(6):2572–9.
- 605 53. Fruebis J, Silvestre M, Shelton D, Napoli C, Palinski W. Inhibition of VCAM-1  
606 expression in the arterial wall is shared by structurally different antioxidants that reduce  
607 early atherosclerosis in NZW rabbits. *J Lipid Res*. 1999 Nov;40(11):1958–66.

608

## 609 Legends

610 **Figure 1. Quantification of atherosclerotic lesions of aortic roots in male (A-B) and female**  
611 **(C-D) offspring.** After Oil red O staining, atherosclerotic plaques in aortic cross-sections were  
612 quantified (%) in males (n = 7-10) and females (n = 7-9) at 600  $\mu\text{m}$  (A and C) and 800  $\mu\text{m}$  (B  
613 and D) from the heart. *CTR: offspring of control/untreated mothers; CTY-G: offspring of*  
614 *cholestyramine-treated mothers during gestation; CTY-GL: offspring of cholestyramine-*  
615 *treated mothers during gestation and lactation.*

616 **Figure 2. Bile acid concentrations in gallbladder of male (A) and female (B) offspring.** N = 6-  
617 7 per group. A) Bile acid (BA) concentrations in male offspring. B) BA concentrations in  
618 female offspring. *CTR: offspring of control/untreated mothers; CTY-G: offspring of*  
619 *cholestyramine-treated mothers during gestation; CTY-GL: offspring of cholestyramine-*  
620 *treated mothers during gestation and lactation.*

621 **Figure 3. Bile acid concentrations in plasma of male (A) and female (B) offspring.** N = 6-7  
622 per group. A) Bile acid (BA) concentrations in male offspring (n = 6-7). B) BA concentrations  
623 in female offspring (n = 6-7). *CTR: offspring of control/untreated mothers; CTY-G: offspring of*  
624 *cholestyramine treated mothers during gestation; CTY-GL: offspring of cholestyramine-*  
625 *treated mothers during gestation and lactation.*

626 **Figure 4. Hepatic expression of miRNA in male (A) and female (B) offspring.** Hepatic relative  
627 expression of miR-122-5p, miR-223-3p, miR-30c-5p and miR-27-3p were determined in  
628 offspring (n = 4-5). *CTR: offspring of control/untreated mothers; CTY-G : offspring of*  
629 *cholestyramine-treated mothers during gestation; CTY-GL : offspring of cholestyramine-*  
630 *treated mothers during gestation and lactation.*

For ATVB Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.



**Table 1. Maternal plasma cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides and gallbladder bile acids during gestation.** Plasma total cholesterol (TC) (n = 5-6), LDL-Cholesterol (LDL-C) and triglycerides (TG) (n = 4-5) (mg/dL) of pregnant dams were measured at GD 0.5, GD 11.5 and GD 17.5. Total bile acids (BA) (mg/mL) were measured in gallbladder of dams (n=5-7) on GD 18.5.

Groups	Plasma									Gallbladder
	TC (mg/dL)			LDL-C (mg/dL)			TG (mg/dL)			Total BA (mg/mL)
	GD 0.5	GD 11.5	GD 17.5	GD 0.5	GD 11.5	GD 17.5	GD 0.5	GD 11.5	GD 17.5	GD 18.5
CTR	268 ± 44	125 ± 19	187 ± 43	165 ± 23	73 ± 6	96 ± 16	79 ± 14	85 ± 17	107 ± 20	67 ± 9
CTY-G	291 ± 57	73 ± 30	122 ± 44	155 ± 19	52 ± 7	62 ± 15	92 ± 20	79 ± 20	128 ± 44	45 ± 16
P values	0.662	0.030	0.052	0.556	0.016	0.032	0.190	0.730	0.556	0.030

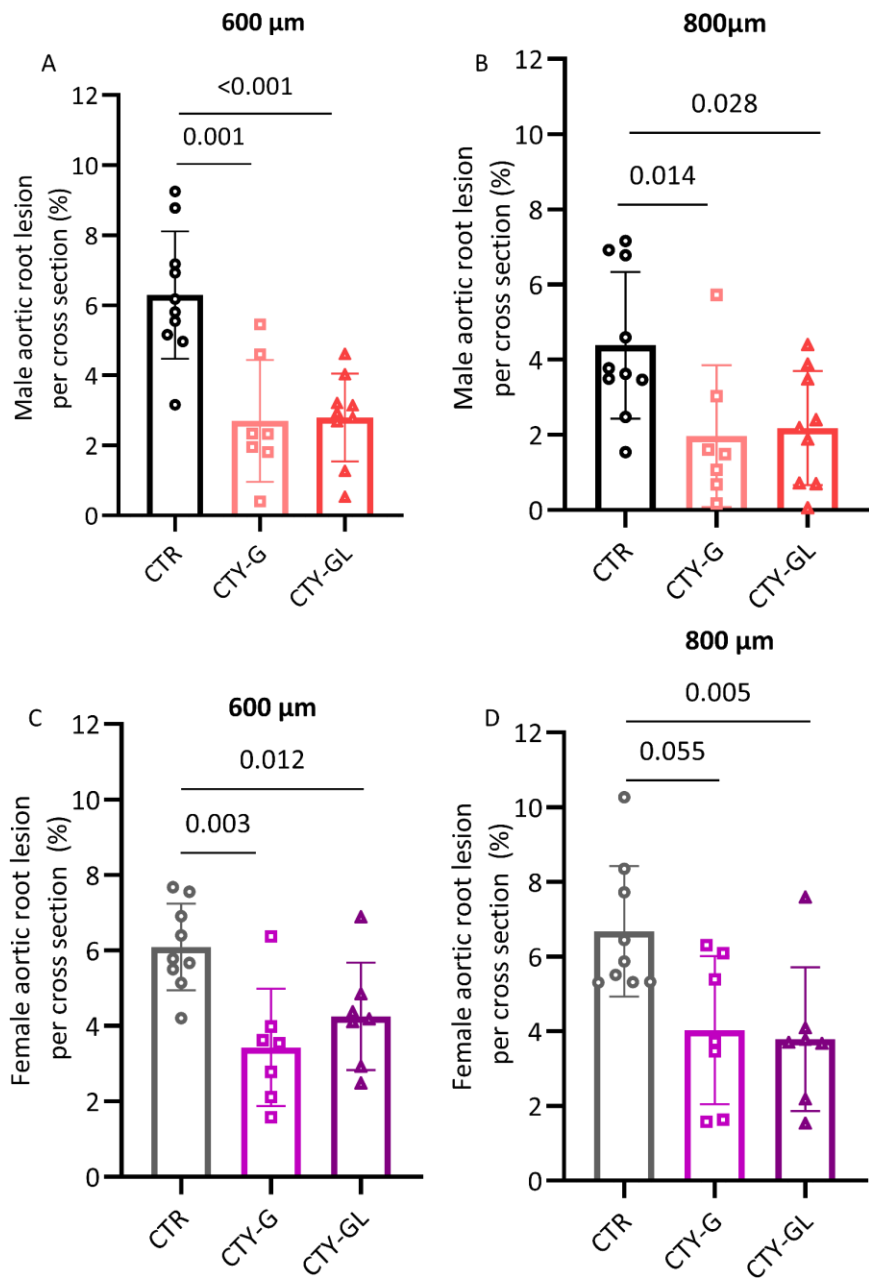
GD: Gestational day. CTR: control/untreated mothers; CTY-G: cholestyramine-treated mothers during gestation, P values are for comparison of CTR vs CTY-G at the same GD, for each variable.

**Table 2. Hepatic gene expression in offspring.** Relative expression of genes involved in lipogenesis, cholesterol homeostasis, lipoprotein metabolism, cholesterol efflux and reverse cholesterol transport (RCT), lipids receptors/regulators and bile acid metabolism were quantified by RT-qPCR and normalized to GAPDH.

	Males					Females				
	CTR	CTY-G		CTY-GL		CTR	CTY-G		CTY-GL	
	2 <sup>Δ(-ΔΔCq)</sup> ± SD	2 <sup>Δ(-ΔΔCq)</sup> ± SD	P value	2 <sup>Δ(-ΔΔCq)</sup> ± SD	P value	2 <sup>Δ(-ΔΔCq)</sup> ± SD	2 <sup>Δ(-ΔΔCq)</sup> ± SD	P value	2 <sup>Δ(-ΔΔCq)</sup> ± SD	P value
Lipogenesis										
<i>SREBP-1</i>	1.2 ± 0.5	1.1 ± 0.6	0.72	0.7 ± 0.3	0.14	1.0 ± 0.3	1.2 ± 0.2	0.43	1.1 ± 0.2	0.43
Cholesterol homeostasis										
<i>Hmgcr</i>	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.08	0.6 ± 0.2	0.03	1.0 ± 0.3	2.6 ± 1.5	0.01	0.9 ± 0.6	0.59
<i>SREBP-2</i>	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.05	0.9 ± 0.1	0.19	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.3	0.69	0.9 ± 0.3	0.40
<i>ACAT-2</i>	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.4	0.54	0.7 ± 0.1	<0.01	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.76	1.1 ± 0.2	>0.99
<i>ABCG5</i>	1.0 ± 0.3	0.9 ± 0.4	0.35	0.8 ± 0.1	0.14	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.3	0.39	0.9 ± 0.2	0.19
<i>ABCG8</i>	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.03	0.7 ± 0.1	<0.01	1.0 ± 0.7	1.1 ± 0.3	0.94	0.9 ± 0.3	0.28
Lipoprotein metabolism										
<i>MTTP</i>	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.06	1.2 ± 0.2	<0.01	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.5	0.14	1.0 ± 0.3	0.76
Cholesterol efflux and RCT										
<i>ABCA1</i>	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.10	1.0 ± 0.1	0.66	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.11	1.3 ± 0.3	0.08

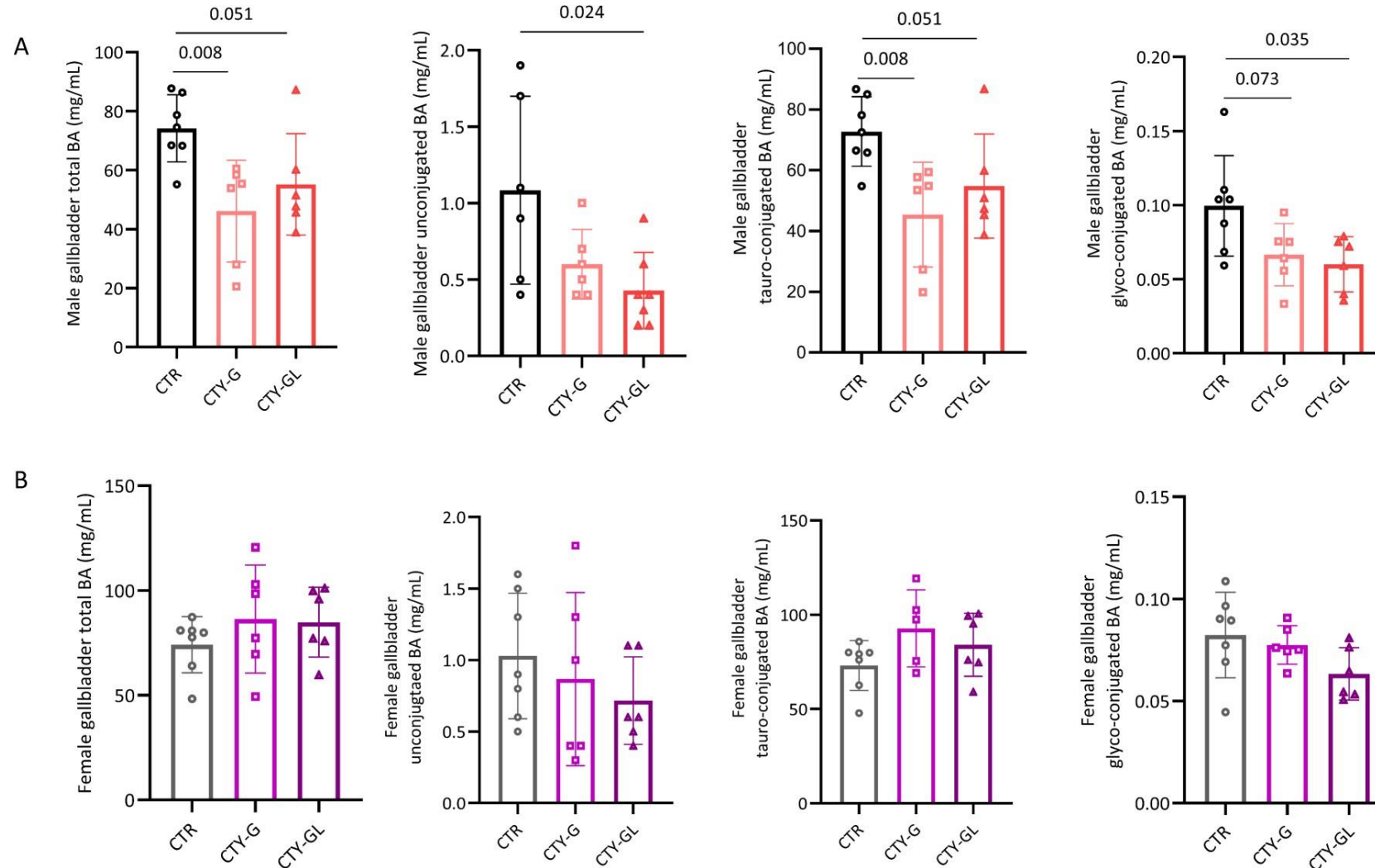
<i>ABCG1</i>	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.04	0.5 ± 0.2	<0.01	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.4	0.30	1.2 ± 0.2	0.14
Receptors and regulators										
<i>LDLr</i>	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.40	1.1 ± 0.2	0.50	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.3	0.18	1.0 ± 0.2	0.95
<i>Lrp1</i>	1.0 ± 0.3	0.9 ± 0.1	0.93	1.1 ± 0.1	0.36	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.75	1.0 ± 0.3	0.84
<i>SR-B1</i>	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.26	1.0 ± 0.1	0.84	1.0 ± 0.1	1.5 ± 0.3	<0.01	1.4 ± 0.5	0.12
<i>Pcsk9</i>	1.0 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.02	0.7 ± 0.3	0.05	1.0 ± 0.2	1.5 ± 0.5	0.06	1.2 ± 0.7	0.57
<i>Idol</i>	1.1 ± 0.5	1.1 ± 0.2	0.33	1.9 ± 0.8	0.01	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.08	0.7 ± 0.2	<0.01
Bile acid metabolism										
<i>Cyp7a1</i>	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.5	0.27	0.7 ± 0.3	0.04	1.1 ± 0.4	2.1 ± 0.9	0.06	1.6 ± 0.4	0.06
<i>ABCB11 (BSEP)</i>	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.3	0.32	1.1 ± 0.2	0.44	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.73	1.1 ± 0.3	0.23
<i>FXR</i>	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.12	1.0 ± 0.1	0.24	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0.03	0.9 ± 0.1	0.12
<i>Slc10a1 (NTCP)</i>	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.74	1.2 ± 0.1	0.07	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.3	0.63	0.9 ± 0.2	0.38
<i>ABCB4 (MDR3)</i>	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.94	1.2 ± 0.3	0.07	1.0 ± 0.3	1.5 ± 0.6	0.28	1.2 ± 0.1	0.20
<i>LXR alpha</i>	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	<0.01	0.9 ± 0.1	0.01	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.57	1.1 ± 0.1	0.06

*CTR: offspring of control/untreated mothers; CTY-G: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation; CTY-GL: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation and lactation.*

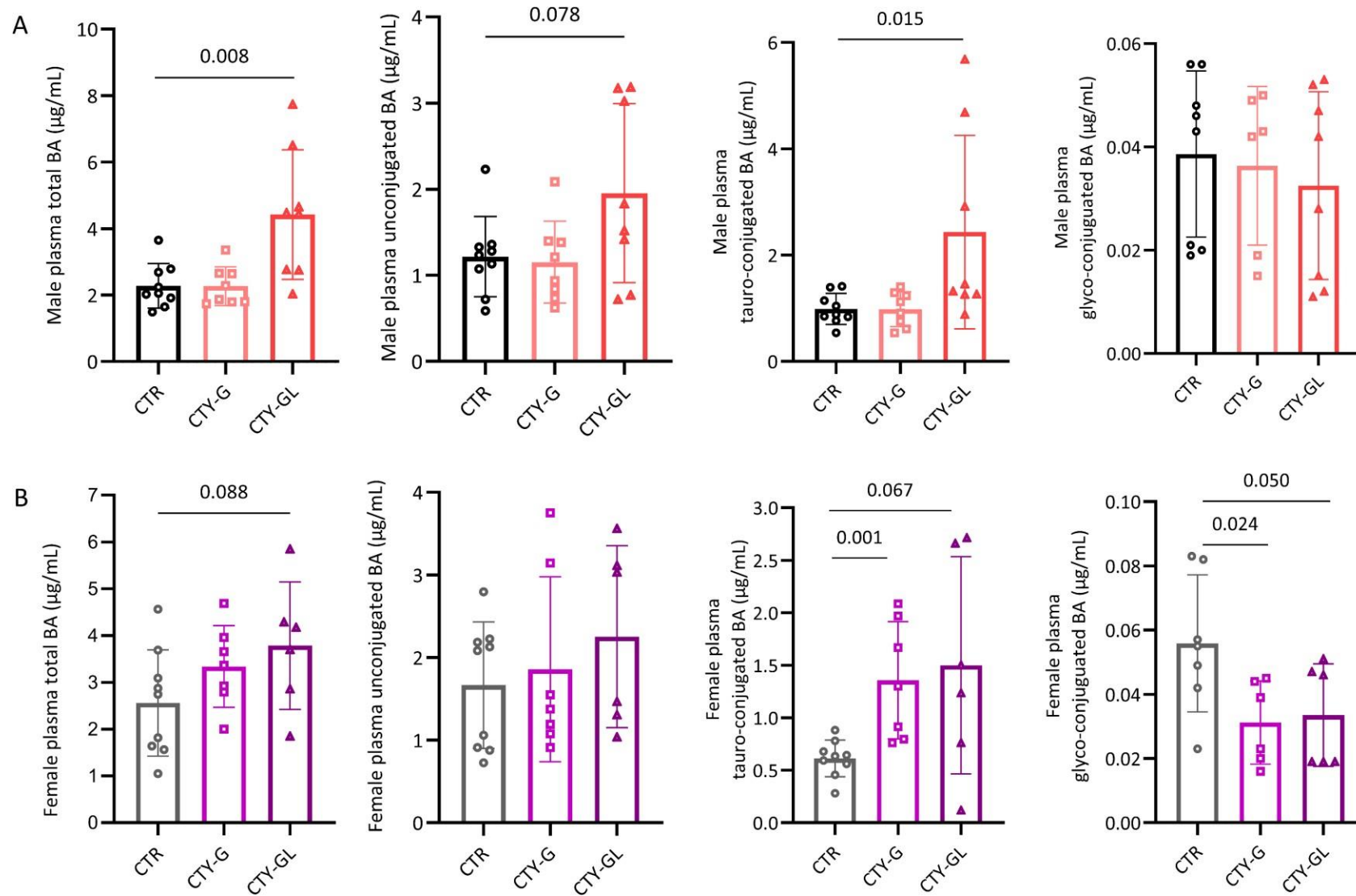


**Figure 1. Quantification of atherosclerotic lesions of aortic roots in male (A-B) and female (C-D) offspring.** After Oil red O staining, atherosclerotic plaques in aortic cross-sections were quantified (%) in males (n = 7-10) and females (n = 7-9) at 600 μm (A and C) and 800 μm (B and D) from the heart. *CTR*: offspring of control/untreated mothers; *CTY-G*: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation; *CTY-GL*: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation and lactation.

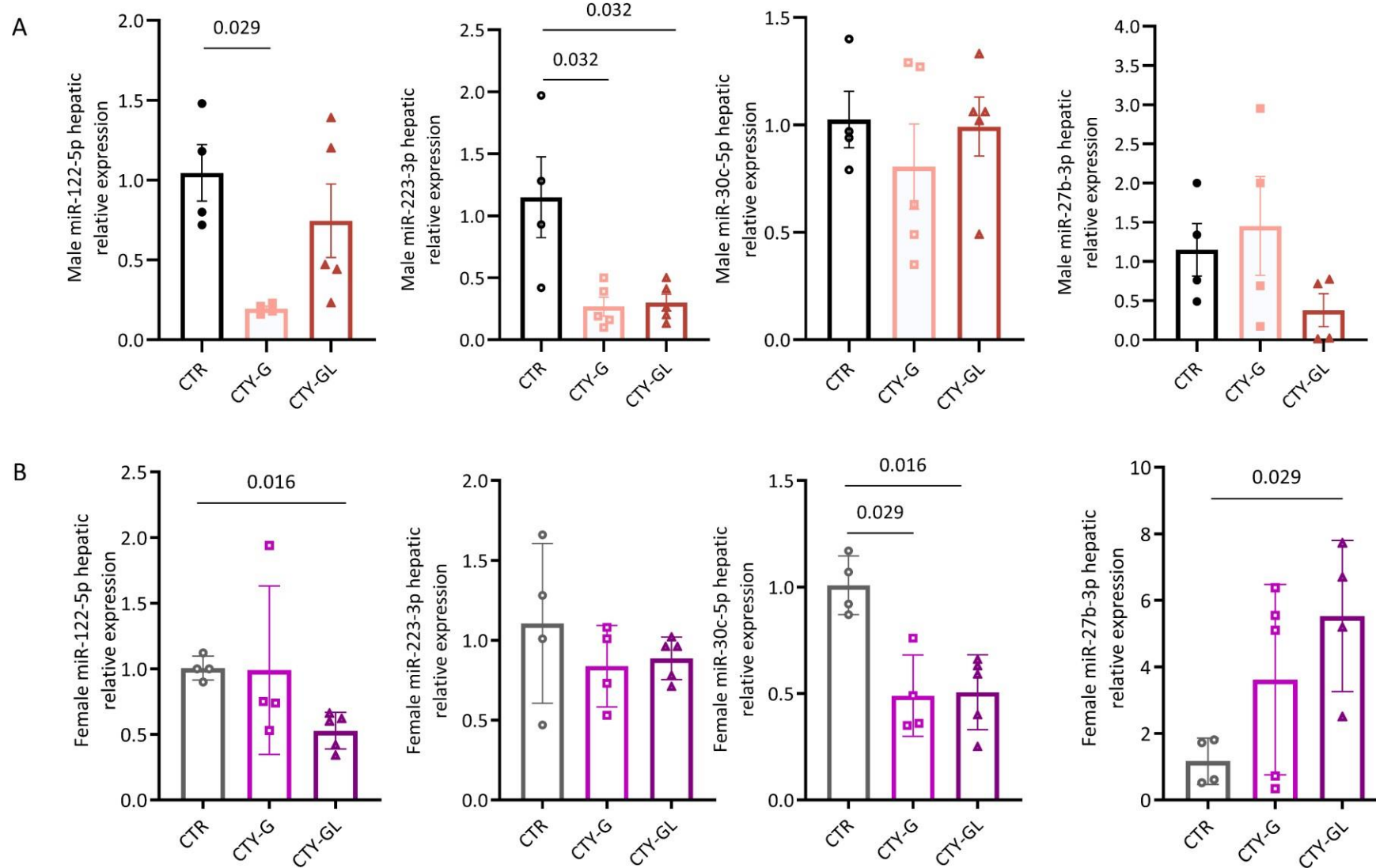
**Figure 2. Bile acid concentrations in gallbladder of male (A) and female (B) offspring.** N = 6-7 per group. A) Bile acid (BA) concentrations in male offspring .B) BA concentrations in female offspring . *CTR: offspring of control/untreated mothers; CTY-G: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation;CTY-GL: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation and lactation.*



**Figure 3. Bile acid concentrations in plasma of male (A) and female (B) offspring.** N = 6-7 per group. A) Bile acid (BA) concentrations in male offspring (n = 6-7). B) BA concentrations in female offspring (n = 6-7). *CTR*: offspring of control/untreated mothers; *CTY-G*: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation; *CTY-GL*: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation and lactation.



**Figure 4. Hepatic expression of miRNA in male (A) and female (B) offspring.** Hepatic relative expression of miR-122-5p, miR-223-3p, miR-30c-5p and miR-27-3p were determined in offspring (n = 4-5). *CTR*: offspring of control/untreated mothers; *CTY-G* : offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation; *CTY-GL* : offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation and lactation.



## SUPPLEMENTAL MATERIAL

### **Perinatal cholestyramine treatment reduces atherosclerosis development in adult offspring of apoE deficient mice through sex-dependent mechanisms.**

Marina Habib<sup>1</sup>, Mikael Croyal<sup>2,3,4</sup>, Bertrand Kaeffer<sup>1</sup>, Isabelle Grit<sup>1</sup>, Blandine Castellano<sup>1</sup>, Mathilde Gourdel<sup>3</sup>, Hassan Nazih<sup>5</sup>, Khadija Ouguerram<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>*Nantes Université, INRAE, UMR 1280, PhAN, F-44000 Nantes, France,*

<sup>2</sup>*CRNH-Ouest Mass Spectrometry Core Facility, F-44000, Nantes, France,*

<sup>3</sup>*Nantes Université, CNRS, INSERM, Institut du thorax, F-44000 Nantes, France*

<sup>4</sup>*Nantes Université, Inserm UMS 016, CNRS, UMS 3556, F-44000 Nantes, France.*

<sup>5</sup>*Nantes Université, UR2160 ISOMer, Nantes, France*



**Supplemental Table S1.** Primer sequences

Gene Name and symbol	Forward 5' to 3'	Reverse 5' to 3'
ATP binding cassette subfamily A member 1 ( <i>ABCA1</i> )	GCA GGC GAA TGT TGG TCT CC	CCA CAG AGG GCA GAA ACT TCC
ATP binding cassette subfamily B member 11 ( <i>ABCB11</i> )	ACA GAA GCA AAG GGT AGC CAT C	GGT AGC CAT GTC CAG AAG CAG
ATP binding cassette subfamily B member 4 ( <i>ABCB4</i> )	CAA AGA GCT AGA AAG GTA TCA G	GAG AAG AAG ACT GTC ATT GC
ATP binding cassette subfamily G member 1 ( <i>ABCG1</i> )	TGC TGC CTC ACC TCA CTG TTC	TCC CCG TGC GTG TGT TGG
ATP binding cassette subfamily G member 5 ( <i>ABCG5</i> )	GAC TGC AAA TCA AAT TGT CC	GGG TAA CCA CAG TTA TTG AAG
ATP binding cassette subfamily G member 8 ( <i>ABCG8</i> )	TGA CCA ACT GCT GCC CAA CC	AGC TCG GCG ATT ACG TCT TCC
Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase ( <i>ACAT-2</i> )	GAC TTG GTG CAA TGG ACT CG	GGT CTT GCT TGT AGA ATC TGG
Cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1 ( <i>Cyp7a1</i> )	CGC ACC TCG TGA TCC TCT GG	AGG CTG CTT TCA TTG CTT CAG G
Farnesoid X receptor ( <i>FXR</i> )	GAG GGC TGC AAA GGT TTC TTC	CGG CAC TCC TGG CAC TTC C
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ( <i>GAPDH</i> )	CGT GCC GCC TGG AGA AAC C	CAA CCT GGT CCT CAG TGT AGC C
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase ( <i>Hmgcr</i> )	GAT AGC TGA TCC TTC TCC TC	ATG CTG ATC ATC TTG GAG GAG
Myosin regulatory light chain interacting protein ( <i>MyIip</i> ) also known and here referred to as ( <i>Idol</i> )	ACC AGA ACA CCG CCC AAT ACA G	GAT GCC CTC CAG CTC CTT ATG C
Low density lipoprotein receptor ( <i>LDLr</i> )	ACT CAG ACG AAC AAG GCT GTC C	AGG CAA TCT CGG TCT CCA TCA C

Low density lipoprotein receptor-related protein 1 ( <i>Lrp1</i> )	GAC CAG GTG TTG GAC ACA GAT G	AGT CGT TGT CTC CGT CAC ACT TC
Liver X receptor alpha ( <i>LXRα</i> )	GAG GGA GGA GTG TGT GCT GTC	GCA GGA CTT GAG GAG GTG AGG
Microsomal triglyceride transfer protein ( <i>MTTP</i> )	TGA GCG GCT ATA CAA GCT CA	CTG GAA GAT GCT CTT CTC GC
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 ( <i>Pcsk9</i> )	GCT ATG TCA TCA AGG TTC TAC	AGT CTT CCT CAA TGT ACT CC
Solute carrier family 10 member 1 ( <i>Slc10a1</i> )	GGT CTT TCA TCT GAC CAG C	CAT GGC CAG GGT GAA GAG G
Scavenger receptor class B member 1 ( <i>SR-B1</i> )	ACC TCC CAG ACA TGC TTC CC	CGA TCT TGC TGA GTC CGT TCC
Sterol regulatory element binding protein 1 ( <i>SREBP-1</i> )	TCC TGC CTC CGA GCT TCC C	TGG TGG CTG CTG AGT GTT TCC
Sterol regulatory element binding protein 2 ( <i>SREBP-2</i> )	GCT GAC TCT CGG GGA CAT GC	GTT GCC ACT GCC ACC ATT GC

**Supplemental Table S2.** TaqMan™ Advanced miRNA Assay primers references

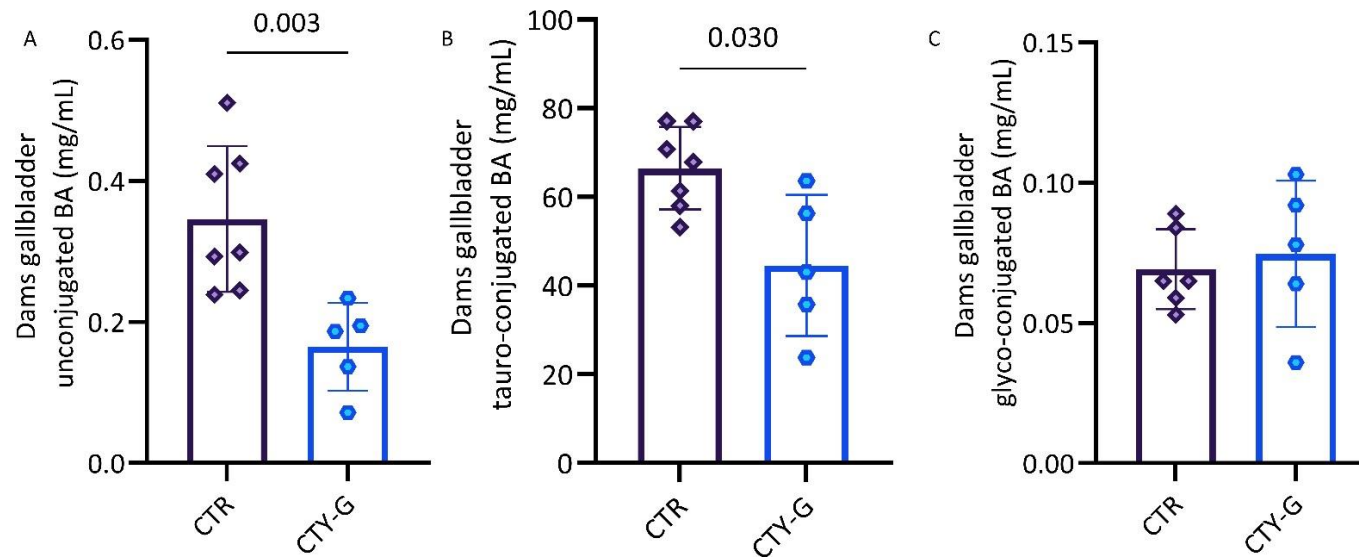
<b>microRNA</b>	<b>Assay Name</b>	<b>Reference</b>
let 7g-5p	hsa-let 7g-5p	478580_mir
let 7d-5p	mmu-let 7d-5p	mmu478439_mir
miR 122-5p	mmu-miR 122-5p	mmu480899_mir
miR223-3p	mmu-miR223-3p	mmu481007_mir
miR 27-3p	mmu-miR 27b-3p	mmu478270_mir
miR 30c-5p	mmu-miR 30c-5p	mmu481757_mir

**Supplemental table S3. Offspring body weights, plasma and liver cholesterol and triglyceride concentrations.** Offspring were weighed at weaning (3 weeks old) and before sacrifice (25 weeks old) (n = 7-11). Total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) plasma (n = 7-11) and liver (n=6) concentrations were measured in offspring at sacrifice.

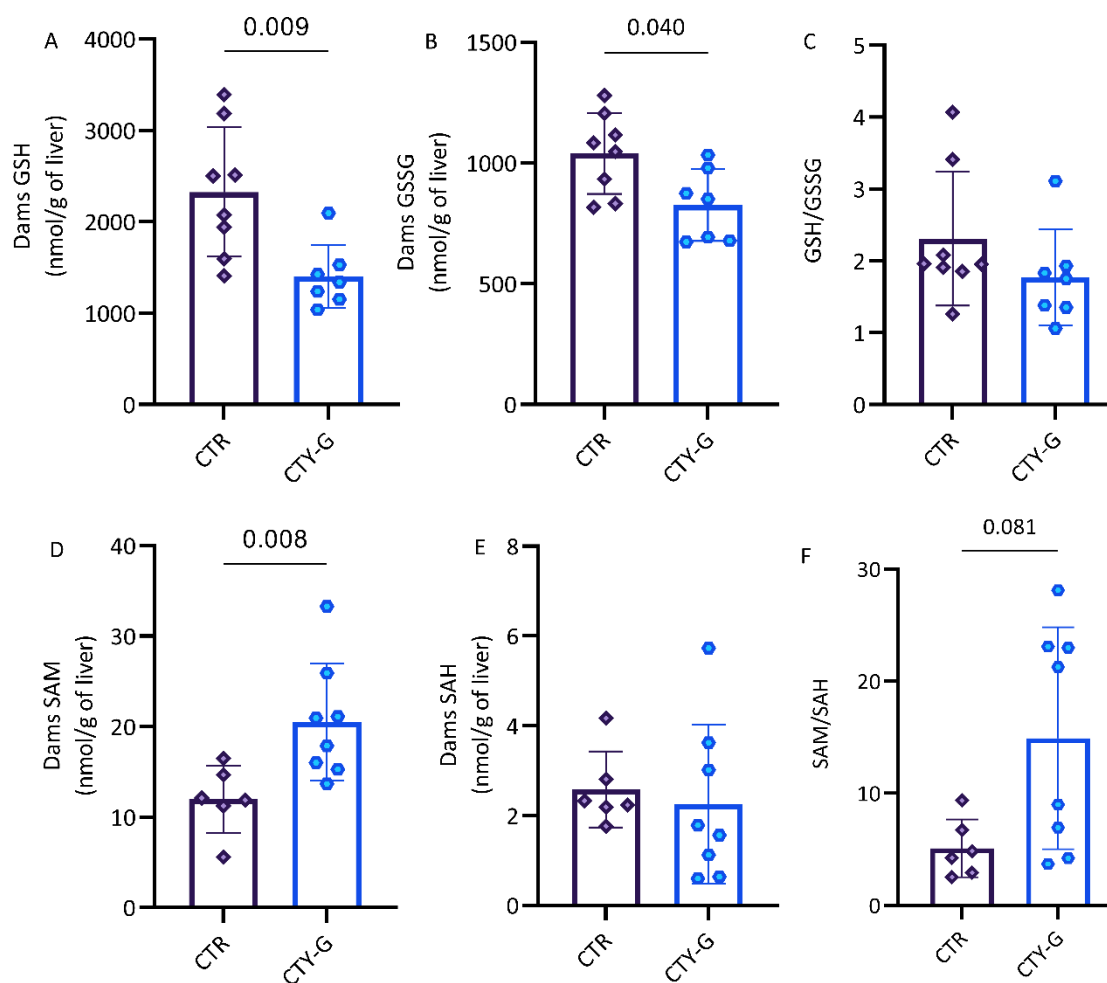
		CTR	CTY-G	P value	CTY-GL	P value
BW (g)	Males	8.5 ± 0.6	9.3 ± 0.6	0.051	9.4 ± 0.8	0.008
	<i>Weaning</i> Females	7.9 ± 1.0	9.3 ± 0.8	0.008	9.0 ± 1.0	0.024
BW (g)	Males	33.1 ± 1.3	34.4 ± 1.8	0.202	33.7 ± 1.6	0.273
	<i>Sacrifice</i> Females	23.6 ± 1.2	24.9 ± 1.7	0.109	25.0 ± 1.8	0.079
Plasma TC (mg/dl)	Males	431.9 ± 82.1	452.3 ± 60.7	0.601	426.9 ± 80.1	0.863
	Females	285.6 ± 52.1	292.4 ± 66.5	0.837	288.8 ± 34.05	0.837
Plasma TG (mg/dl)	Males	84.6 ± 32.3	91.4 ± 22.4	0.740	77.9 ± 23.0	0.684
	Females	59.9 ± 8.7	62.4 ± 10.7	0.758	63.2 ± 11.2	0.536
Liver TC (mg/g)	Males	6.7 ± 2.8	3.7 ± 1.5	0.041	3.9 ± 1.2	0.041
	Females	7.4 ± 1.5	6.9 ± 2.2	0.699	8.6 ± 3.3	0.937
Liver TG (mg/g)	Males	12.6 ± 6.3	25.9 ± 10.5	0.015	25.3 ± 13.5	0.093
	Females	40.3 ± 9.6	37.2 ± 13.2	0.485	51.8 ± 20.6	0.394

*BW: body weight, CTR: offspring of control/untreated mothers; CTY-G: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation; CTY-GL: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation and lactation.*

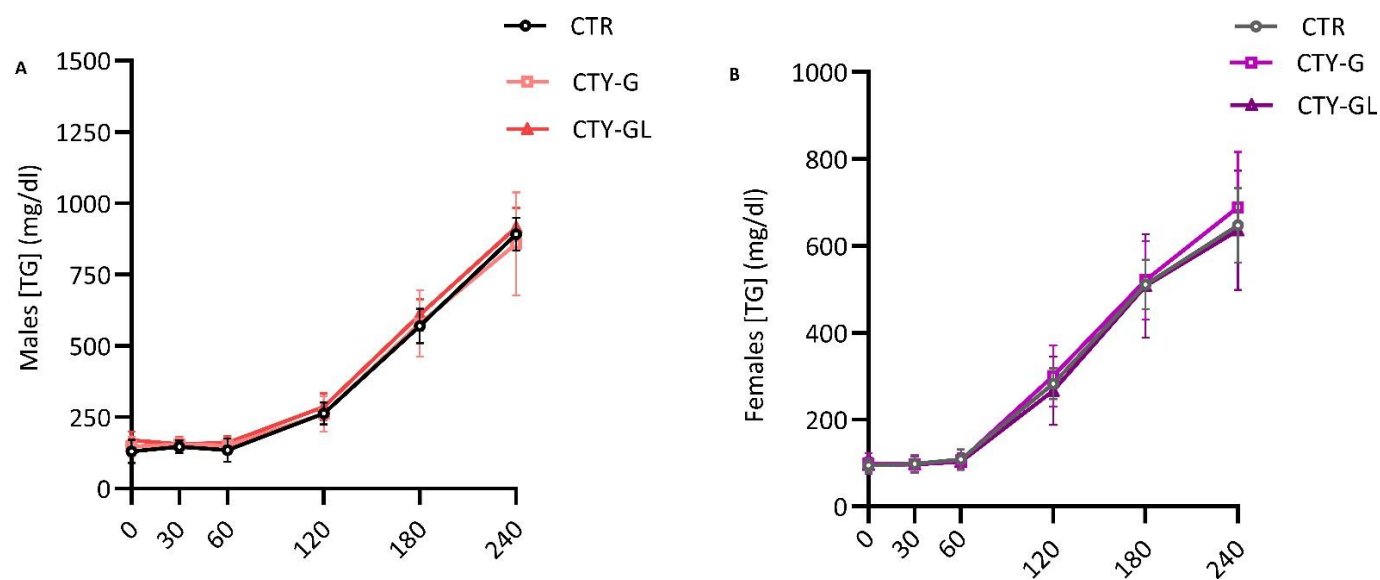
**Supplemental Figure S1. Bile acid concentrations in gallbladder of dams.** Bile acids of CTR and CTY-G dams (n =5-7) were quantified on GD 18.5. (A) Unconjugated, (B) tauro-conjugated and (C) glyco-conjugated BA (mg/mL) were measured in gallbladder of dams. *CTR is for control/untreated mothers; CTY-G for cholestyramine-treated mothers during gestation, BA: bile acids.*



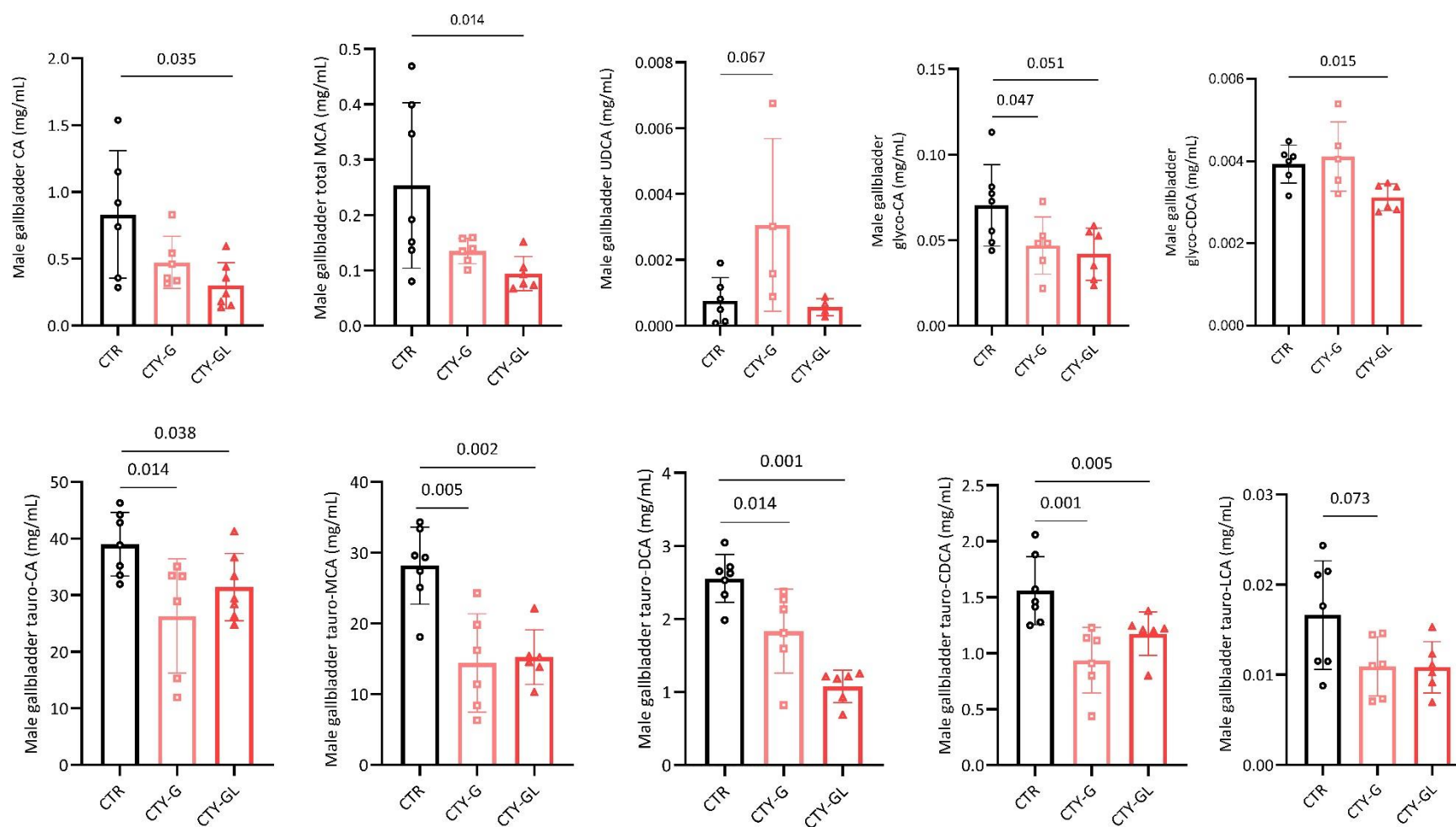
**Supplementary Figure S2. Hepatic antioxidant defense in dams.** (A, B) Oxidized and reduced glutathione (GSH and GSSG, respectively) liver concentrations and (C) GSH-to-GSSG ratio. (D) S-adenosyl-methionine (SAM) and (E) S-Adenosylhomocysteine (SAH) liver concentrations and (F) SAM-to-SAH ratio. Concentrations were determined in dams' liver (nmol/g of liver) at GD 18.5. *CTR*: control/untreated mothers; *CTY-G*: cholestyramine-treated mothers during gestation.



**Supplemental Figure S3. Offspring hepatic triglycerides secretion.** Plasma triglycerides (TG) concentration accumulation (mg/dL) during 4h after tyloxapol injection was measured in (A) male (n = 6-10) and (B) female (n = 6) offspring. *CTR*: offspring of control/untreated mothers; *CTY-G*: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation; *CTY-GL*: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation and lactation.

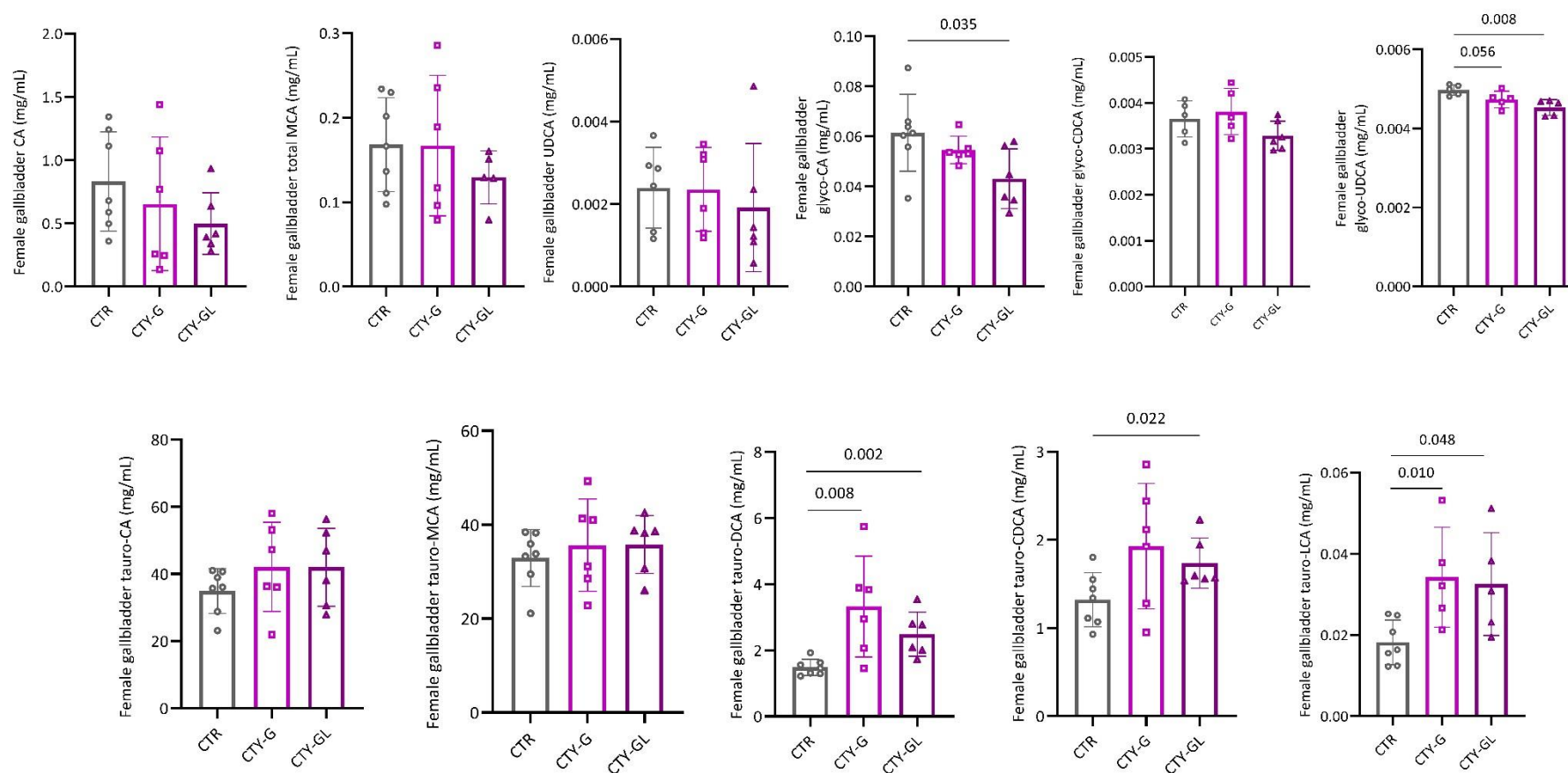


**Supplemental Figure S4. Concentrations of bile acid species in gallbladder of male offspring.** *Cholic-acid (CA), muricholic (MCA), ursodeoxycholic acid (UDCA), glyco-cholic acid (glyco-CA), glyco-chenodeoxycholic acid (glyco-CDCA), tauro-cholic acid (tauro-CA), tauro-muricholic acid (tauro-MCA), tauro-deoxycholic acid (tauro-DCA), tauro-chenodeoxycholic acid (tauro-CDCA) and tauro-lithocholic acid (LCA).* *N = 5-7, CTR: offspring of control/untreated mothers; CTY-G: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation; CTY-GL: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation and lactation.*

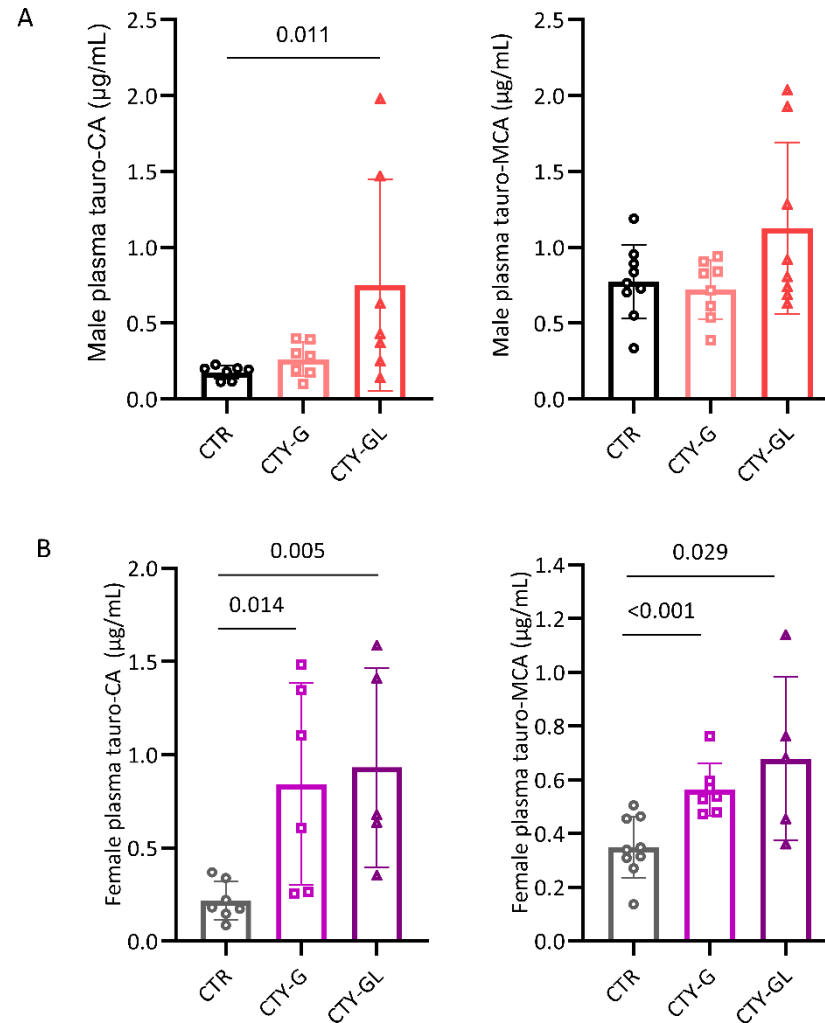




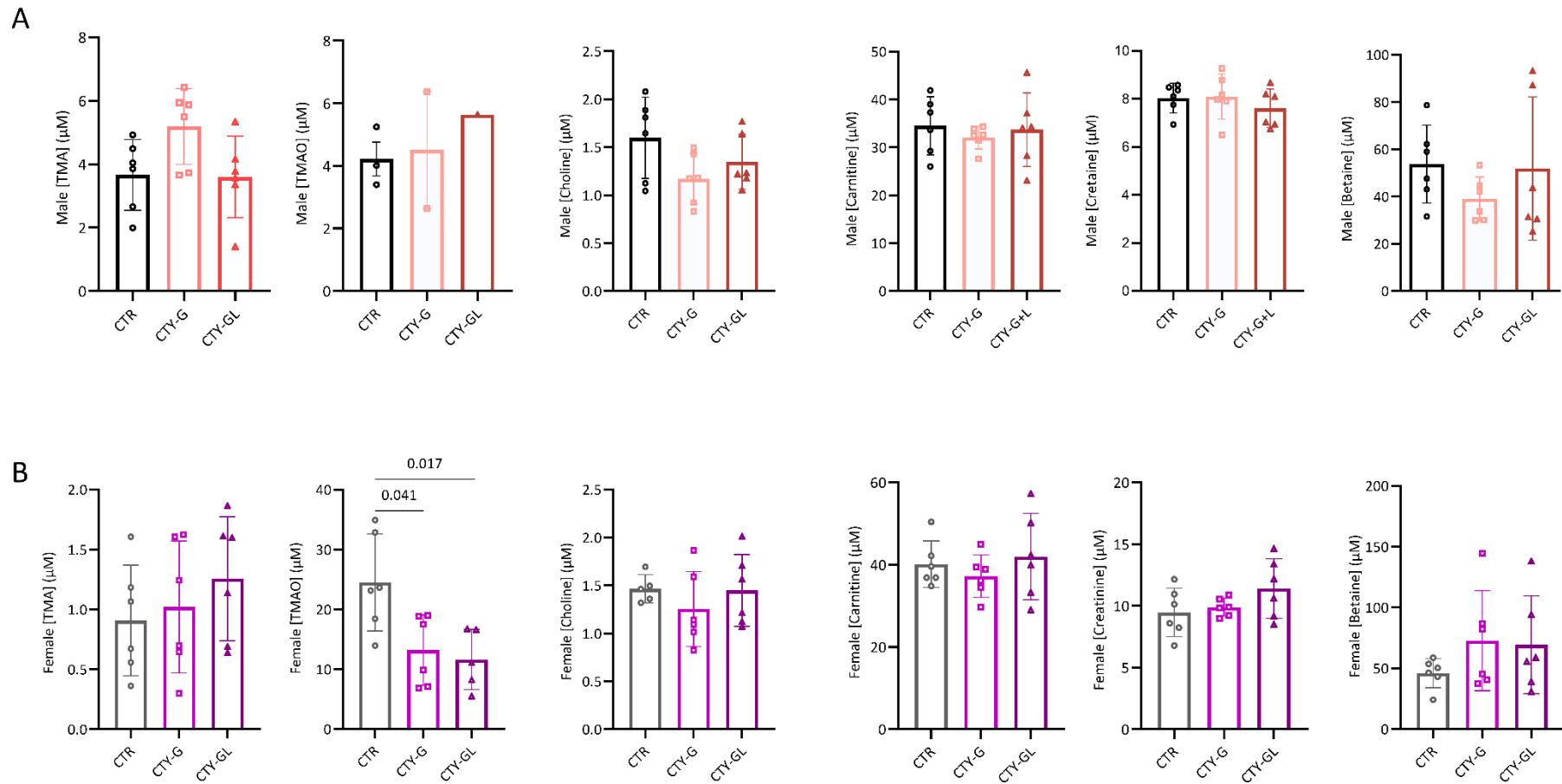
**Supplemental Figure S5. Concentrations of bile acid species in gallbladder of female offspring.** *Cholic-acid (CA), murocholic (MCA), ursodeoxycholic acid (UDCA), glyco-cholic acid (glyco-CA), glyco-chenodeoxycholic acid (glyco-CDCA), ursodeoxycholic acid (glyco-UDCA), taurocholic acid (tauro-CA), tauro-murocholic acid (tauro-MCA), tauro deoxycholic acid (tauro-DCA), tauro-chenodeoxycholic acid (tauro-CDCA) and tauro-lithocholic acid (LCA).* *N = 6-7, CTR: offspring of control/untreated mothers; CTY-G: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation; CTY-GL: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation and lactation.*



**Supplemental Figure S6. Plasma concentrations of bile acids in (A) male and (B) female offspring. Tauro-cholic acid (tauro-CA), tauro-murocholic acid (tauro-MCA). N = 6-7, CTR: offspring of control/untreated mothers; CTY-G: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation; CTY-GL: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation and lactation.**



**Supplemental Figure S7. Plasma concentrations of methylamines in offspring.** N = 5-6 per group. *TMA*: trimethylamine; *TMAO*: trimethylamine-*N*-oxide. *CTR*: offspring of control/untreated mothers; *CTY-G*: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation; *CTY-GL*: offspring of cholestyramine-treated mothers during gestation and lactation.



i. Principaux résultats :

Dans cette étude, nous avons montré que la cholestyramine diminue le cholestérol des LDL pendant la gestation et que ce traitement réduit le développement des plaques d'athérosclérose chez la descendance adulte de souris apoE<sup>-/-</sup>. Les descendants des deux sexes ont bénéficié de cette réduction mais les mécanismes associés montrent un dimorphisme sexuel. Le traitement maternel n'implique pas de différences significatives dans les taux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides, cependant le contenu hépatique de cholestérol était significativement réduit chez les mâles CTY-G et CTY-GL. Les mâles présentaient également une diminution de la concentration des acides biliaires dans la bile. En parallèle, seuls les mâles CTY-GL présentent une augmentation des acides biliaires tauro-conjugués dans le plasma. Ceci pourrait être la conséquence d'un cycle entero-hépatique active chez ces mâles.

Quant aux femelles, la fraction tauro-conjuguée d'acides biliaires plasmatiques est significativement augmentée dans les femelles CTY-G et montrent une tendance à l'augmentation dans les femelles CTY-GL. Les deux groupes de femelles semblent être protégées contre le développement de l'athérosclérose par la diminution du TMAO.

Deux variations importantes de l'expression des miR sont la réduction du miR-122 chez les mâles CTY-G et les femelles CTY-GL ainsi que la réduction du miR-223 chez les 2 groupes de mâles. La variation des miR reflète l'effet du traitement maternel avec la cholestyramine sur la programmation fœtale de l'athérosclérose.

ii. Discussion et conclusion

Nos résultats montrent qu'un traitement maternel avec la cholestyramine, durant la gestation ou durant la lactation réduit le développement des plaques d'athérosclérose chez la descendance adulte de souris apoE déficientes, malgré sa prédisposition génétique à l'hypercholestérolémie.

Dans notre étude nous n'avons mesuré que quelques paramètres classiques reconnus comme facteurs de risque du développement de l'athérosclérose.

Chez la descendance mâle, la réduction significative du cholestérol hépatique pourrait provenir de sa transformation accrue en acides biliaires. Or, la concentration des acides biliaires dans la bile était diminuée avec une diminution significative du gène de la Cyp7a1

chez les mâles GL. Il aurait été important de quantifier les acides biliaires dans les contenus caecaux de ces animaux afin de vérifier une élimination plus importante des acides biliaires dans les fèces mais nous n'avons pas pu collecter cette matrice comme les abattages ont dû avoir lieu d'une manière stricte durant le confinement lié à la pandémie du covid-19. Cependant, d'autres enzymes comme la CYP8B1 et la CYP27A1 participent avec la CYP7A1 à la synthèse des acides biliaires. L'étude de l'expression des gènes codant ces enzymes nous permettra de mieux évaluer la synthèse hépatique d'acides biliaires chez les descendants.

D'autre part, un cycle entero-hépatique plus active chez ces descendants reflèterait un transport reverse de cholestérol (RCT) accru des macrophages au niveau artériel vers le foie, protégeant les descendants contre l'accumulation du cholestérol et l'athérogenèse. Or, le RCT est médié par les lipoprotéines de haute densité (HDL), pour cela nous avons planifié la caractérisation du profile lipidique des descendants (en cours de réalisation, octobre 2022). Par exemple, un traitement hypocholestérolémiant avec le phytostérol durant la gestation et la lactation entraîne une diminution des particules non-HDL-C et LDL-C chez la descendance à 21 jours d'âge, ainsi qu'une diminution du cholestérol hépatique (Rideout et al., 2015).

A part les facteurs impliqués dans l'homéostasie du cholestérol, d'autres études utilisant un traitement hypocholestérolémiant en périnatal décrivent des variations au niveau d'autres facteurs de risque, comme l'hypertension artérielle systolique, la sédentarité et le stress oxydant. Dans un modèle d'hypercholestérolémie nutritionnelle de souris, un traitement avec la pravastatine à partir de la mi-gestation et durant la lactation réduit le risque cardiovasculaire chez leurs descendants (Elahi et al., 2008). A 27 semaines d'âge, les descendants de mères traitées présentaient une tension artérielle systolique inférieure et étaient plus actifs par rapport aux descendants de mères non-traitées. Chez les lapins, Napoli et al. ont démontré une réduction des produits de peroxydation chez les descendants de mères traitées à la cholestyramine pendant la gestation (Napoli et al., 2000).

La descendance femelle issues de mères recevant la cholestyramine semble être protégée contre l'accumulation de TMAO plasmatique chez la progéniture féminine. Plusieurs rapports ont indiqué que la TMAO contribue au développement de l'athérosclérose, en partie en favorisant l'absorption du cholestérol dans les macrophages et en inhibant la synthèse des acides biliaires (Koeth et al., 2013; Z. Wang et al., 2011). En parallèle, les femelles CTY-G présentaient une augmentation des acides biliaires plasmatiques tauro-conjuguées, et les 2 groupes de femelles CTY-G et CTY-GL, présentaient une augmentation du tauro-CA et du

tauro-MCA dans le plasma, ainsi qu'une tendance à l'augmentation de l'expression du gène de la CYP7A1.

Finalement, les variations observées dans l'expression des miR impliqués dans le métabolisme du cholestérol pourrait refléter l'impact du traitement maternel sur leur programmation foétale. Après leur synthèse au niveau du foie, les miR sont secrétés dans la circulation. Nous avons observé une réduction significatif du miR-122 chez les mâles CTY-G ainsi que les femelles CTY-GL, dont des taux élevés étaient retrouvés chez les patients avec les maladies coronaires (Y.-L. Wang & Yu, 2018). Les miR étudiés sont impliqués dans la synthèse du cholestérol mais aussi dans le métabolisme et l'assemblage des lipoprotéines. Bien que nous n'avions pas toujours retrouvé des corrélations inverses entre l'expression de ces miR et celles de leurs gènes cibles, un établissement du profile lipidique des descendants ainsi que la détermination des concentrations plasmatiques des apolipoprotéines (deux dosages prévus en octobre 2022), nous permettront d'étudier d'autres aspects de leur implication dans l'athérosclérose.

2. Effet d'un traitement périnatal avec un antioxydant sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris apoE<sup>-/-</sup>.

Dans ce deuxième article, nous présentons les résultats obtenus suite au traitement maternel par un antioxydant : la vitamine E. Nous avons mesuré une réduction des plaques d'athérome chez la descendance issue de mères traitées par rapport à celles issue de mères non traitées. Nous avons cherché à identifier les mécanismes par lesquels le traitement maternel protégerait la descendance contre le développement de l'athérosclérose.

**Article 2: Perinatal treatment with vitamin E reduces the development of atherosclerosis in adult offspring of apoE<sup>-/-</sup> mice.** Habib *et al.*, ATVB, 2022.

Les résultats obtenus suite au traitement maternel avec la vitamine E font l'objet d'un article en cours de préparation pour une soumission au journal « Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology ».

## **Introduction:**

Cardiovascular diseases (CVD) are responsible of one third of all death in the world (1). Atherosclerosis (ATS) is a progressive disease initiated by the accumulation of lipids in the intima of arteries (2). The identification of inherited and environmental risk factors of atherosclerosis (3) has helped developing efficient therapeutic strategies. Since the emergence of the “Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) hypothesis” (4), it has been progressively demonstrated that *in utero* and neonatal exposure to pathophysiological conditions, such gestational hypercholesterolemia, is also an impactful risk factors of CVD development in adult life.

Napoli et al. were the first to report that foetuses born to hypercholesterolemic mothers during gestation developed more and larger fatty streaks lesions (5), and that these lesions developed strikingly faster in infants and adolescents compared to those born from normocholesterolemic mothers (6). Animal studies (7–10) showed similar results. Furthermore, maternal hypercholesterolemia is associated with increased oxidative stress due to over production of reactive oxygen species (ROS) (11,12). The detection of oxidized lipids in the aortic intima of hypercholesterolemic mothers’ offspring (5) raised the question whether maternal hypercholesterolemia *per se* or the ensuing oxidative stress is responsible for atherogenesis in offspring. Both lipid-lowering and/or antioxidant treatments in hypercholesterolemic rabbits provided anti-atherogenic protection in their offspring (7,13). In our previous works on the apoE deficient mouse model, we showed that hypercholesterolemic adult apoE<sup>-/-</sup> offspring born to normocholesterolemic apoE<sup>+/-</sup> mothers exhibit less atherosclerotic plaques than apoE<sup>-/-</sup> offspring born to hypercholesterolemic apoE<sup>-/-</sup> (10), and that perinatal treatment with anti-oxidative Phycocyanin rich extract (14) reduces atherosclerotic plaques development in adult offspring. Also, we recently demonstrated the effectiveness of lipid-lowering cholestyramine treatment in providing anti-atherosclerotic protection (article 1. Habib Marina et al. under review). The aim of the current study was to evaluate the effect of maternal treatment with antioxidative vitamin E (15–17), on atherosclerosis development in adult offspring of apoE<sup>-/-</sup> mice. We were interested in the effect of the treatment during the two critical periods of early development: the *in utero* (gestation) and neonatal (lactation) period.

For this purpose, apoE<sup>-/-</sup> dams received vitamin E treatment during gestation or during gestation and lactation and atherosclerotic plaques were quantified in 25 weeks old adult



offspring. To evaluate whether a combined prenatal treatment of a lipid-lowering drug plus an antioxidant would provide an additive effect in terms of atherosclerotic plaques reduction in adult offspring, another group of dams received cholestyramine and vitamin E during gestation only. In order to understand the underlying mechanisms, we measured some classical atherosclerosis-related risk factors such as plasma cholesterol and triglycerides levels, as well as bile acids which reflect the “reverse cholesterol transport” (RCT) efficiency. RCT, an athero-protective process (19), requires cholesterol efflux from peripheral tissues into HDL (high density lipoprotein) in order to be excreted as free cholesterol or converted to BA. We also quantified some other biomarkers involved in atherosclerosis development. Trimethylamine-N-oxide (TMAO), a metabolite of a gut microbiota, has been shown to promote atherosclerosis by enhancing formation of foam cells, than accumulates in the intima, leading to atherosclerosis progression (20,21). MicroRNAs (miR) have emerged as regulators (22) as well as biomarkers (23,24) of the multi-factorial and multi-step onset of ATS, thus promising therapeutic targets (25). Furthermore, miR expression plays a significant role in epigenetic programming of diseases (26), and it was shown to be influenced by maternal hypercholesterolemia (27), dietary components (28) and oxidative-stress associated (29). Thus, we analysed the expression of miRs that are abundantly in liver, and implicated in lipids metabolism such as miR-122, miR-223, miR-30c and miR-27 (22), and that have shown altered expression in offspring born to hypercholesterolemic mothers (27).

## **Materials and methods**

### **Animals, diets, and tissue sampling**

Seven weeks old females and males B6.129P2-Apoe/J were purchased from Charles River Laboratories (Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). After one week of acclimation, mating was initiated and females with positive vaginal plug on the following morning were identified. These females were randomly assigned either to the control group (CTR) fed chow diet (A03; Safe Diets, Augy, France) during gestation and lactation, or to the vitamin-E treated group (A03 + 2200 IU of alpha-tocopherol/kg of diet; customized at Safe Diets) during gestation only (VE-G) (3 weeks of gestation) or during gestation and lactation (VE-GL) (3 weeks of gestation + 3 weeks of lactation). Another group of dams received a combined treatment of cholestyramine and vitamin E (3% of cholestyramine/kg of diet + 2200 UI of alpha-tocopherol/kg of diet; customized at safe diets) during gestation period (CTY+VE-G). Animals had ad libitum access to water and food under constant light/dark cycles (12h/12h). Offspring of all groups were weaned at 3 weeks old and maintained under control chow diet until sacrifice at 25 weeks old. To collect samples from untreated and treated mothers without disturbing their pregnancies, female apoE -/- mice were mated as described above. Gestational day 0.5 (GD 0.5) corresponded to the morning of positive vaginal plug detection. Dams were then randomly assigned either to the control group (CTR), to the vitamin E-treated group during gestation only (VE-G), or for CTY+VE-G group receiving the combined treatment during gestation. At GD 0.5, GD 11.5 and GD 17.5 and after four hours of fasting, blood samples were collected into K2 EDTA tubes (Sarstedt, Germany) and plasma was isolated by conventional centrifugation (4,000 RPM, 4 °C, 5 min). Dams on GD 18.5 and 25-weeks old offspring were fasted for four hours and then anaesthetized under isoflurane (5L/min, 2-3%). Submandibular vein blood of dams and intracardiac blood of offspring were collected on heparinized syringe into K2 EDTA tubes for plasma separation. In offspring, a physiological saline solution was injected into systemic circulation to wash out remaining blood in the aorta. Then, the hearts along with the linked ascending and descending aortas and livers were rapidly collected, frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C until analysis. Gallbladder and liver samples of dams were also collected and frozen in liquid nitrogen. All experimental procedures were approved by the Committee of Ethics in Animal Experiments of Pays de la Loire, France (APAFIS 20118) and performed according to the European Union regulations for the care and use of animals for experimental procedures (2010/63/EU).

### **Aortic lesion quantification**

To quantify atherosclerotic lesions at the aortic root, perivascular fat was cleaned before detaching the heart from the aortic arch and aorta. Then, 2-3 mm long aortic arch base were frozen in embedding medium for serial 10 µm-thick cryosections. Neutral lipids of sections at 600 and 800 µm from the heart were stained as follow: fixation with 4% formol, dehydration with isopropyl alcohol, staining with oil red O and counterstaining with hematoxylin (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Stained slides were captured using Nanozoomer Hamamatsu 2.0 HT slide scanner and quantification of neutral lipid-stained lesions were performed using image analysis software QuPath version 0.1.2 using machine learning. All the scripts developed for this analysis are available online (<https://github.com/magalieFeyeux/microPICell/tree/master/QuPathScript/AortaPlaqquesegmentation>).

### **Biochemical analyses**

Concentrations of predefined biomarkers were measured in plasma and tissue homogenates (0.1 g/mL in NaCl 0.9%). Lipids were extracted from tissue homogenate using the Bligh and Dyer method (30). Total plasma and liver cholesterol (TC) and triglycerides (TG) as well as LDL-cholesterol (LDL-C) concentrations were determined by enzymatic assay kits (Diasys, EURO BIO Scientific, Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions. Free and tauro- and glyco-conjugated bile acids (BA) were extracted from plasma samples and subsequently quantified by reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as described previously (31). Methylamines, including the TMAO and its precursors, were extracted from plasma samples and quantified by HILIC LC-MS/MS as described previously (32). To assess the oxidative status, oxidized (GSSG) and reduced (GSH) glutathione as well as S-adenosylmethionine (SAM) and S-adenosylhomocysteine (SAH) were quantified in liver homogenates by reversed-phase LC-MS/MS as described previously (33,34) .

### **Hepatic RNA extraction RT-qPCR and microRNA expression**

Trizol reagent (Life Technologies-Thermo-fisher, Courtaboeuf, France) was used for hepatic RNA extraction according to the manufacturer's instructions. For hepatic microRNA (miR) expression, cDNA was obtained from 4 ng of total RNA using TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (ThermoFischer). RT-qPCR were performed using TaqMan™ Fast Advanced Master Mix and TaqMan™ Advanced miRNA Assay primers with the following protocol: 50 °C for 2 min, 95 °C for 20s followed by 39 cycles of 95 °C for 3 s and 60 °C for 30 s (CFX Connect™

Real-Time PCR Detection System). Relative expression was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method using the geometric mean of let 7g-5p and let 7d-5p as internal control.

TaqMan™ Advanced miRNA Assay primers references.

microRNA	Assay Name	Reference
let 7g-5p	hsa-let 7g-5p	478580_mir
let 7d-5p	mmu-let 7d-5p	mmu478439_mir
miR 122-5p	mmu-miR 122-5p	mmu480899_mir
miR223-3p	mmu-miR223-3p	mmu481007_mir
miR 27-3p	mmu-miR 27b-3p	mmu478270_mir
miR 30c-5p	mmu-miR 30c-5p	mmu481757_mir

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (Version 9.4.1, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The non-parametric Mann-Whitney test was used to compare sex-matched offspring born to supplemented mothers with offspring born to control mothers. Data are expressed as means  $\pm$  standard deviations (SD). The results were considered to be significant at  $P < 0.05$ .

## Results

### A) Effect of vitamin E (VE-G) and cholestyramine plus vitamin E (CTY+VE-G) treatments during gestation in dams

As shown in **Table 1**, TC, LDL-C and TG levels were similar in all dams at gestational day 0.5 (GD 0.5). TC and LDL-C levels of VE-G dams were significantly increased towards the end of gestation (GD 17.5) compared to CTR dams, with no significant changes at mid-gestation (GD 11.5). TG levels of VE-G dams did not significantly vary upon treatment.

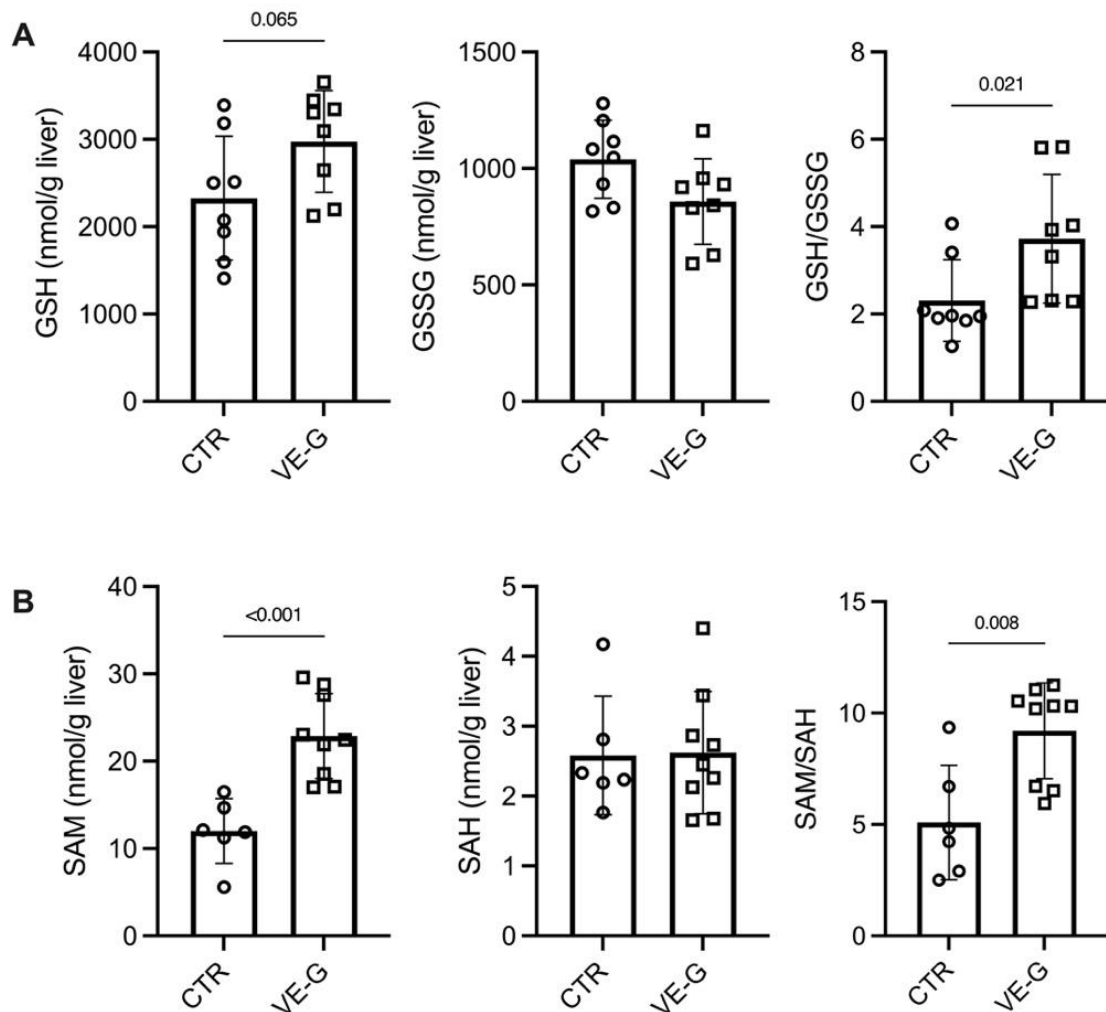
We also measured TC and LDL-C levels in dams treated with CTY and VE simultaneously during gestation (CTY+VE-G). At GD 11.5, TC of CTY+VE-G dams showed a tendency to reduction, while LDL-C levels were significantly reduced compared to CTR dams. No significant change of TC or LDL-C was observed at GD 17.5 (**Supplemental Table 1**).

	Total cholesterol (mg/dL)			LDL-C (mg/dL)			TG (mg/dL)		
	GD 0.5	GD 11.5	GD 17.5	GD 0.5	GD 11.5	GD 17.5	GD 0.5	GD 11.5	GD 17.5
CTR	268±44	125±19	187±43	165±23	73±6.3	96±16	79±14	85±17	107±20
VE-G	292±35	137±30	236±22	174±16	79±16	116±12	82±11	102±17	95±20
P values	0.836	0.628	0.022	0.537	0.662	0.030	0.595	0.175	0.460

**Table 1. Maternal plasma cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides during gestation.** Plasma total cholesterol (TC), LDL-Cholesterol (LDL-C) and triglycerides (TG) (mg/dl) (n =4- 5) of pregnant dams were measured at GD 0.5, GD 11.5 and GD 17.5.

As hypercholesterolemia is associated to oxidative stress, we assessed the effect of antioxidant VE treatment on liver oxidative balance. Hepatic GSH concentrations tended to increase but no significant change was observed for GSSG levels, leading to a significantly higher GSH-to-GSSG ratio (**Figure 1 A**). Hepatic SAM concentration was significantly increased upon VE treatment, while SAH remained unchanged, leading to a significant increase in SAM-to-SAH ratio (**Figure 1B**). When measured in CTY+VE-G dams' liver, nor GSH, GSSG or GSH-to-GSSG ratio were significantly modified (**Supplemental Figure 1 A**). Nevertheless, in these

dams, SAM and SAM-to-SAH significantly increased, while SAH levels were significantly lower compared to CTR dams (**Supplemental Figure 1B**).



**Figure 1. Hepatic antioxidant defense in VE-G dams.** (A) Reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione hepatic concentrations and GSH-to-GSSG ratio. (B) S-adenosyl-methionine (SAM) and S-Adenosylhomocysteine (SAH) liver concentrations and SAM-to-SAH ratio. Concentrations were determined in VE-G dams' liver at GD 18.5 (n=6-9).

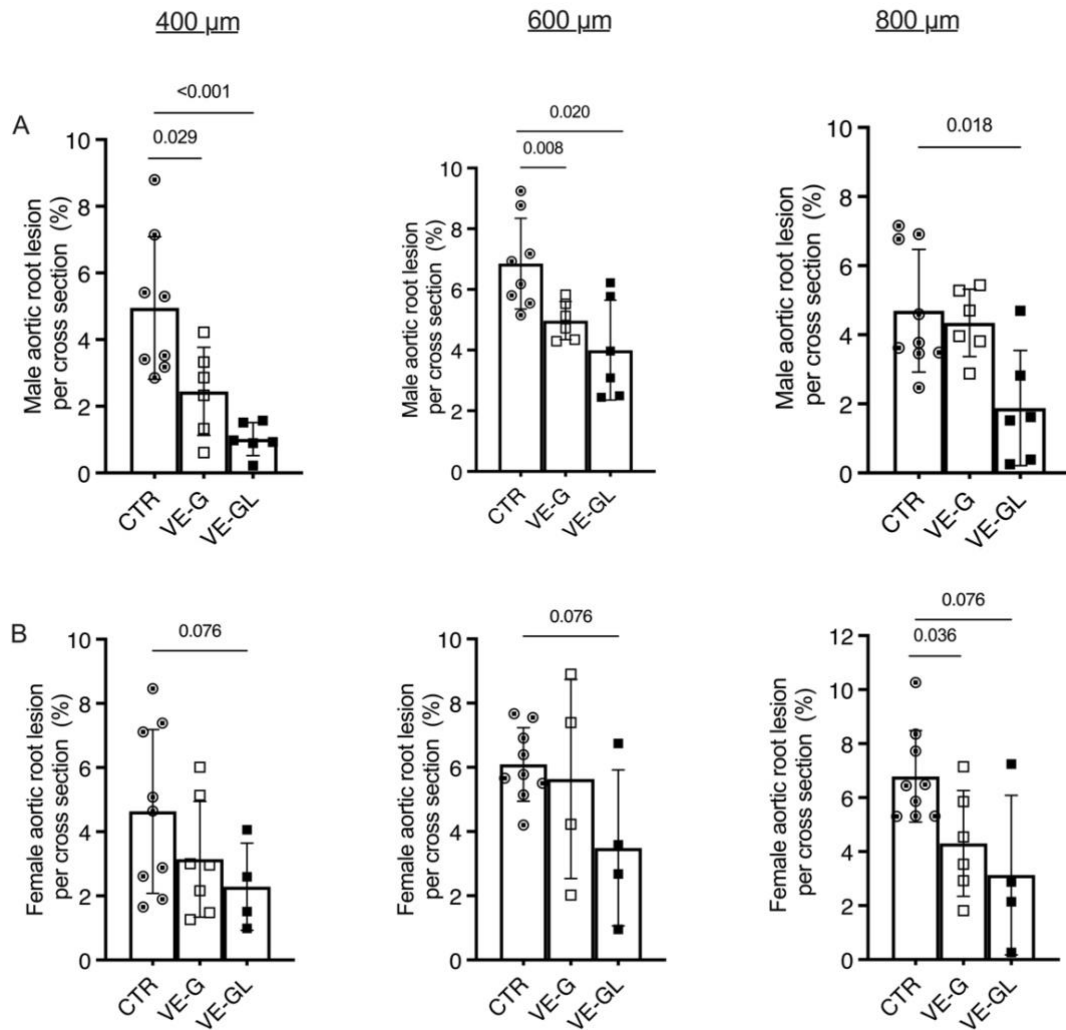
Given that cholestyramine is a bile acid sequestrant, we measured BA in dams' gallbladder at GD 18.5. Vitamin E treatment did not imply significant modifications on gallbladder BA, contrarily to CTY+VE treatment that led to a significant reduction in total and BA pool (**Supplemental Figure 2**).

## **B) Effect of perinatal VE and CTY+VE treatment in offspring**

As shown in **Figure 2**, atherosclerotic plaques in males born to vitamin E-treated dams during gestation only (VE-G) are significantly reduced at 400 and 600  $\mu\text{m}$  from the heart ( $P=0.029$  and  $P=0.008$ , respectively) compared to CTR males. VE-G females displayed significantly less atherosclerotic lesions than CTR females at 800  $\mu\text{m}$  ( $P=0.036$ ) and in VE-GL females, a tendency of atherosclerotic plaques reduction ( $P=0.076$ ) was measured at the 3 distances from the heart.

Maternal combined CTY and VE treatment during gestation (CTY+VE-G) significantly reduced atherosclerotic plaques development in males at the 3 distances from the heart ( $P=0.021$ ,  $P<0.001$  and  $P=0.021$  at 400, 600 and 800  $\mu\text{m}$ , respectively) compared to CTR males, but this anti-atherogenic effect of maternal treatment was not observed in female offspring (**Supplemental Figure 3**).

We aimed to compare if combined treatment (CTY+VE) would provide further anti-atherosclerotic protection compared to VE treatment alone during gestation. In CTY+VE-G males, the area of atherosclerotic plaques was significantly lower at 600  $\mu\text{m}$  and 800  $\mu\text{m}$  ( $p<0.01$  and  $p=0.013$  respectively, not shown on the graph) compared to VE-G males, with no significant reduction in CTY+VE-G female offspring



**Figure 2. Quantification of atherosclerotic lesions of aortic roots in male (A) and female (B) VE-G and VE-GL offspring.** After Oil red O staining, atherosclerotic plaques in aortic cross-sections were quantified (%) in males (n = 5-8) and females (n = 4-8) at 400, 600 and 800  $\mu\text{m}$  from the heart.

To better understand the underlying mechanisms, we investigated some cholesterol homeostasis-related pathways in offspring.

Offspring plasma TC and TG levels were not significantly modified by maternal supplementation during gestation or gestation and lactation in offspring of both sexes (**Table 2**). Meanwhile, the hepatic cholesterol content was significantly lower in VE-G and VE-GL males born to treated dams compared to those born to untreated dams ( $P=0.009$  and  $P=0.030$ ), but no significant change found for female groups. Hepatic TG content of VE-GL males significantly increased compared to CTR males ( $P=0.017$ ), while hepatic TG content was

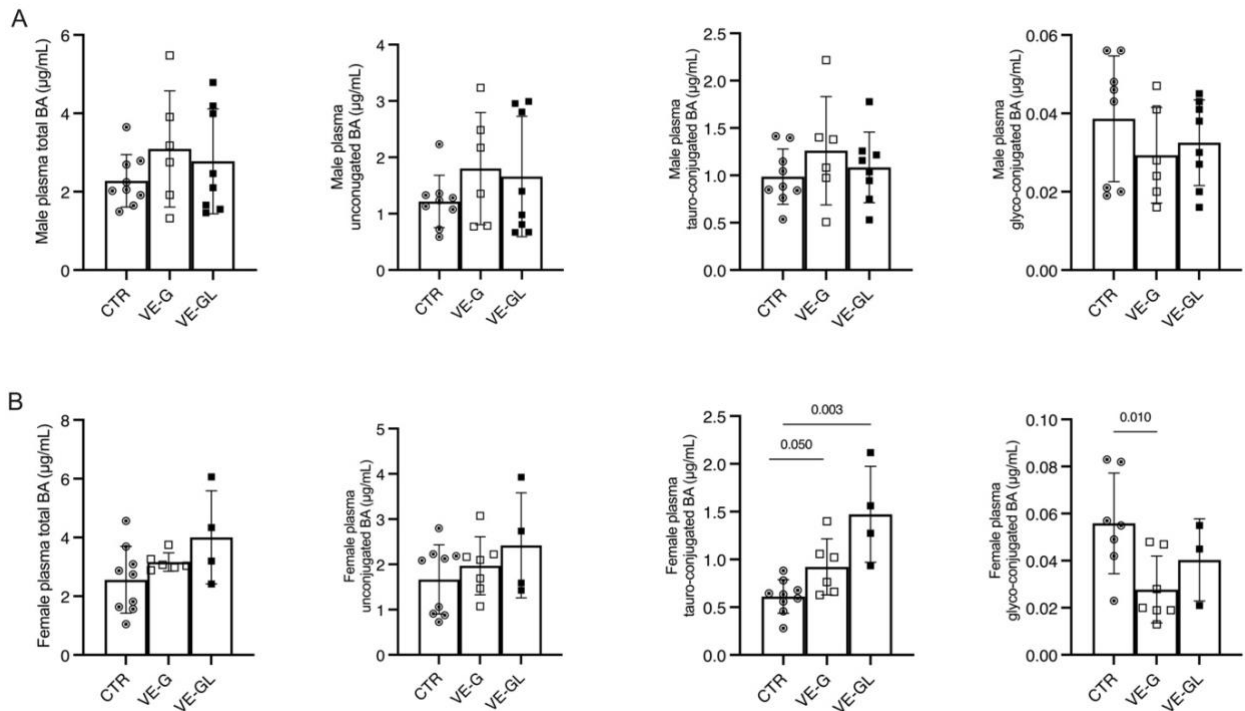


not significantly modified in either VE-G males or female offspring compared to sex-matched CTR (**Table 2**). CTY+VE-G males also showed a significant decrease in hepatic cholesterol and increase in hepatic TG (P=0.026). Hepatic lipids content was not modified for CTY+VE-G females (**Supplemental Table 2**).

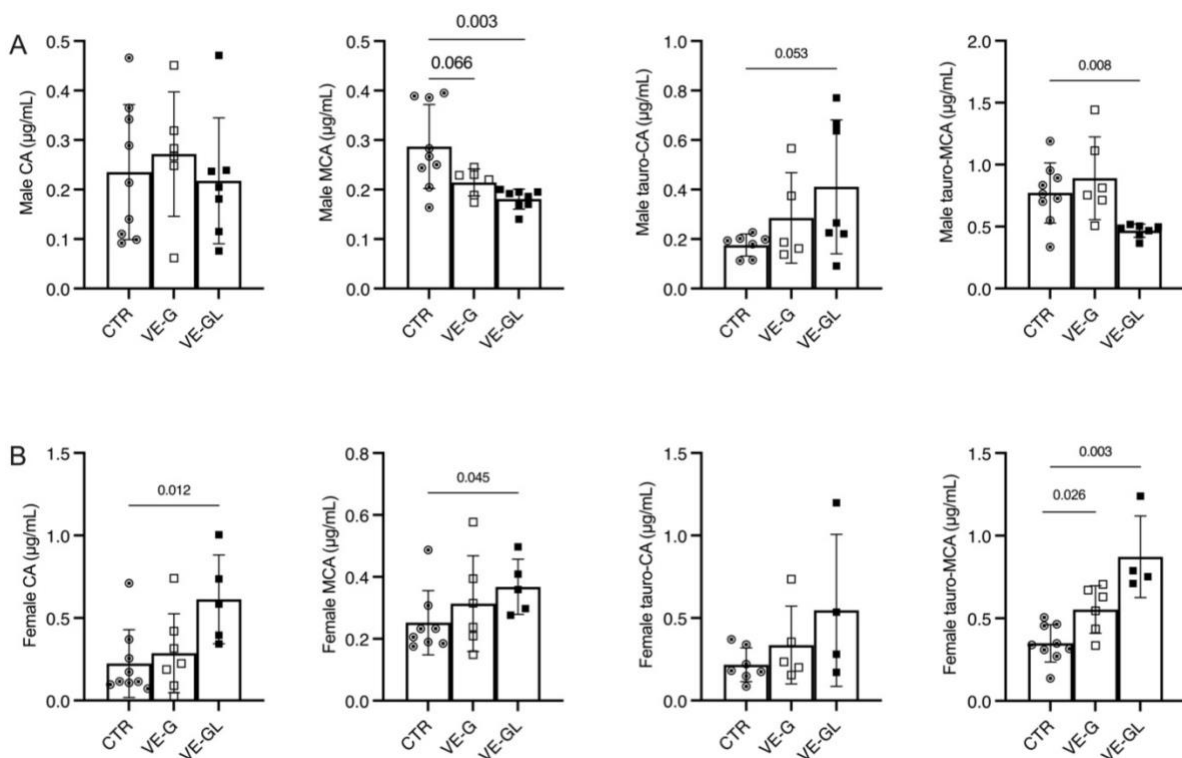
		CTR	VE-G	P value	VE-GL	P value
Plasma TC (mg/dl)	Males	421 ± 79	385 ± 48	0.481	423 ± 71	>0.999
	Females	293 ± 50	292 ± 33	0.950	282 ± 63	0.524
Plasma TG (mg/dl)	Males	85 ± 32	87 ± 22	0.829	103 ± 26	0.230
	Females	60 ± 9	67 ± 12	0.224	57 ± 20	0.797
Liver TC (mg/g)	Males	6.7 ± 2.8	2.7 ± 0.6	0.009	3.2 ± 1.0	0.030
	Females	7.4 ± 1.5	6.6 ± 2.4	0.485	5.9 ± 1.8	0.093
Liver TG (mg/g)	Males	12.6 ± 6.3	7.3 ± 3.2	0.257	27.1 ± 8.6	0.017
	Females	40.3 ± 9.6	38.7 ± 18.6	0.699	41.2 ± 16.1	0.699

**Table 2. VE-G and VE-GL offspring plasma and liver cholesterol and triglycerides concentrations.** Total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) concentrations were measured in VE-G and VE-GL offspring' (A) plasma and (B) livers at sacrifice (n = 6-11).

None of the maternal treatment patterns had a significant effect on plasma total BA concentrations in male or female offspring (**Figure 3**). Nevertheless, VE-G and VE-GL females had higher levels of tauro-conjugated BA than that of CTR females (P = 0.050 and P=0.003). VE-G females also had lower glyco-conjugated BA concentrations compared to CTR females (P= 0.010). When analyzed individually, VE-GL males had reduced muricholic acid (MCA) (p=0.003) and tauro-muricholic acid (tauro-MCA) (P=0.008), while tauro-cholic acid (tauro-CA) showed a tendency to increase (P=0.053) compared to CTR males (**Figure 4A**). Tauro-MCA was significantly increased in VE-G females (P=0.050). VE-GL female had higher cholic acid (CA), MCA and tauro-MCA (P<0.05 for all) (**Figure 4B**)

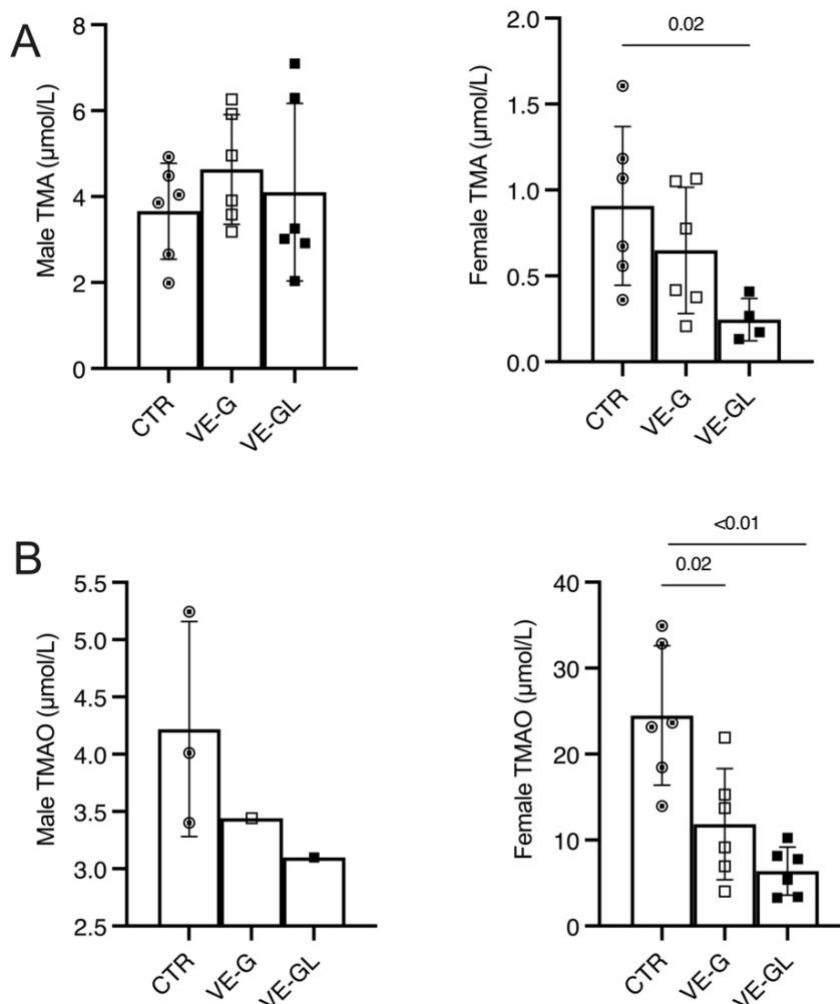


**Figure 3. Bile acid (BA) concentrations in plasma of male (A) and female (B) offspring.** Total, unconjugated, tauro-conjugated and glyco-conjugated BA concentration in plasma at sacrifice (N = 6-9 per group).

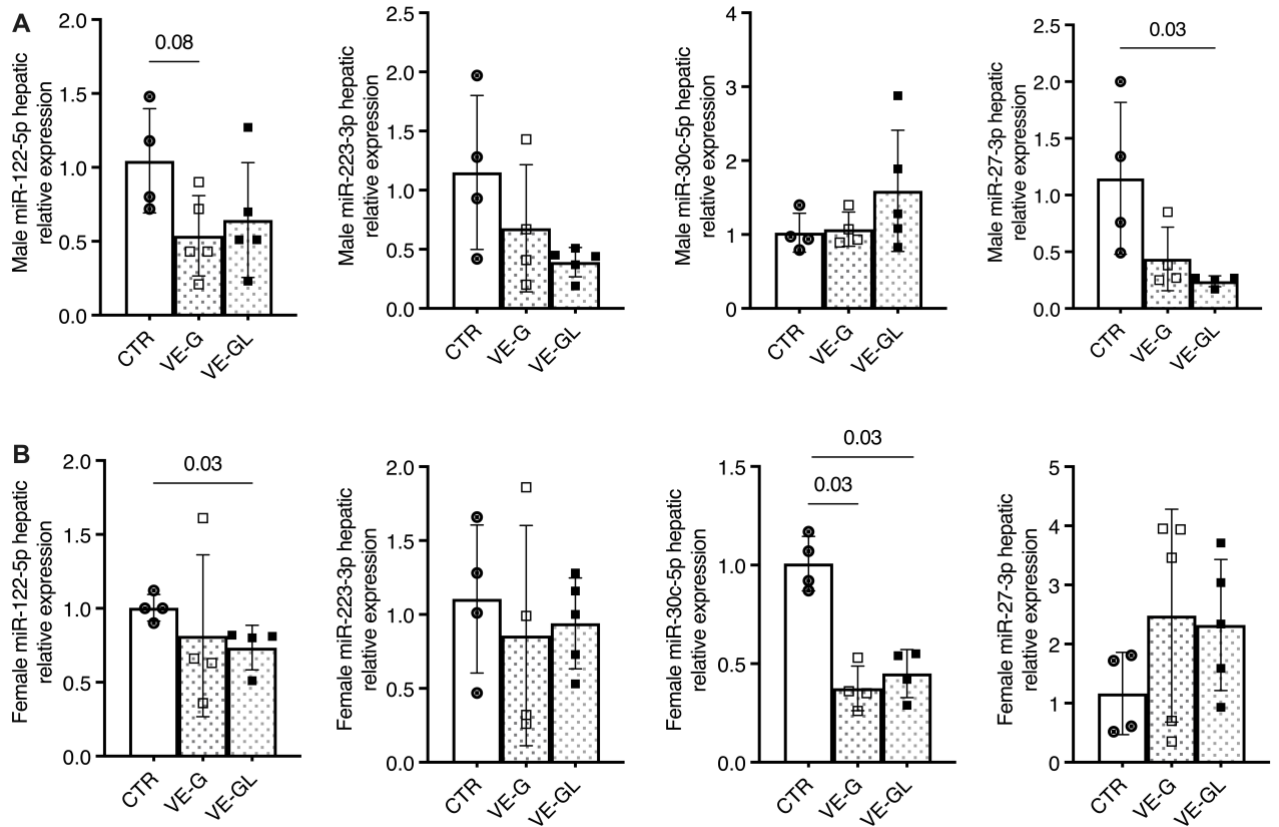


**Figure 4. Bile acid species concentrations in plasma of VE-G and VE-GL offspring.** Cholic-acid (CA), murocholic (MCA), tauro-cholic acid (tauro-CA) and tauro-murocholic acid (tauro-MCA) in (A) male and (B) female offspring.

TMAO have emerged as a biomarker for atherosclerosis (20). We measured TMAO and its defined precursors in offspring plasma. In male offspring, TMA levels were not significantly modified (**Figure 5A**), whereas TMAO levels were not detected in the majority of male offspring (**Figure 5B**). In VE-GL females, plasma TMA was significantly reduced ( $P=0.2$ ). Interestingly, plasma TMAO levels were significantly reduced in both VE-G and VE-GL females compared to CTR females ( $P=0.02$  and  $P<0.01$ , **Figure 5B**). We also quantified other trimethylamines precursors of TMAO (choline, carnitine, creatinine, betaine) (**Supplemental Figure 7**). Choline levels were significantly reduced in all males born to treated-mothers as well as CTY+VE-G females compared to sex-matched CTR. Betaine level tended to be lower in CTY+VE-GL males whereas it was significantly reduced in CTY+VE-G females. CTY+VE-G males also had lower creatinine levels.



**Figure 5. Plasma concentrations of TMA and TMAO in VE-G and VE-GL male (A) and female (B) offspring (n=5-6 per group, except for undetected values in males). TMA: trimethylamine; TMAO: trimethylamine-N-oxide**



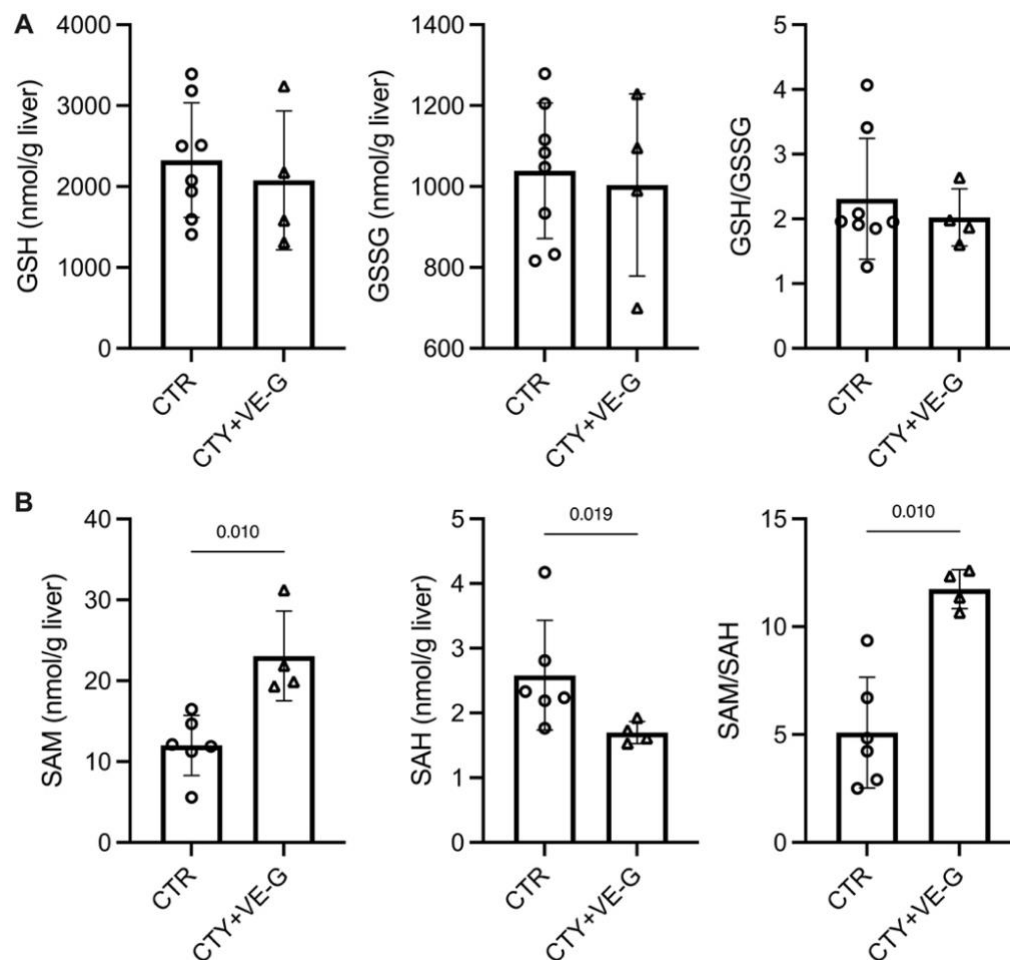
**Figure 6. Hepatic expression of miRNA in male (A) and female (B) offspring.** Hepatic relative expression of miR-122-5p, miR-223-3p, miR-30c-5p and miR-27-3p were determined in offspring (n = 4-5).

As shown in **Figure 6**, hepatic miR-122-5p expression in VE-G males tended to be reduced ( $P=0.08$ ), and miR-27-3p expression was significantly lower in VE-GL males. MiR-122-5p and miR-30c-5p hepatic expression were significantly reduced in VE-GL females compared to CTR females ( $P = 0.03$ ), whereas only miR-30c-5p expression was significantly reduced in VE-GL females ( $P = 0.03$ ).

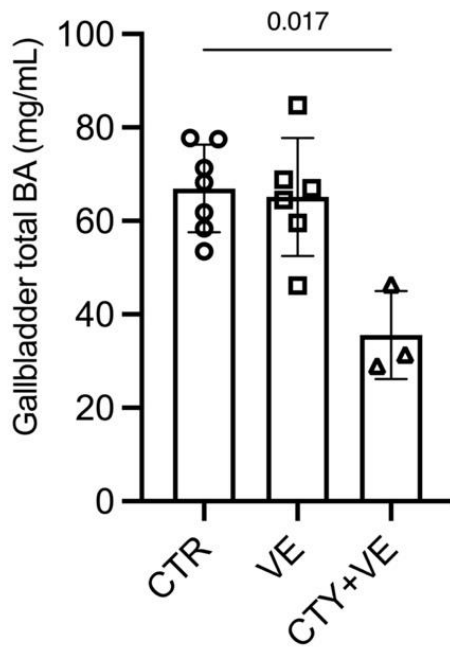
## Supplemental data

	Total cholesterol (mg/dL)			LDL-C (mg/dL)		
	GD 0.5	GD 11.5	GD 17.5	GD 0.5	GD 11.5	GD 17.5
CTR	268±44	125±19	187±43	165±23	73±6.3	96±16
CTY+VE-G	315±38	100±14	192±34	156±39	56±6.8	86±18
P values	0.171	0.067	>0.999	0.556	0.032	0.413

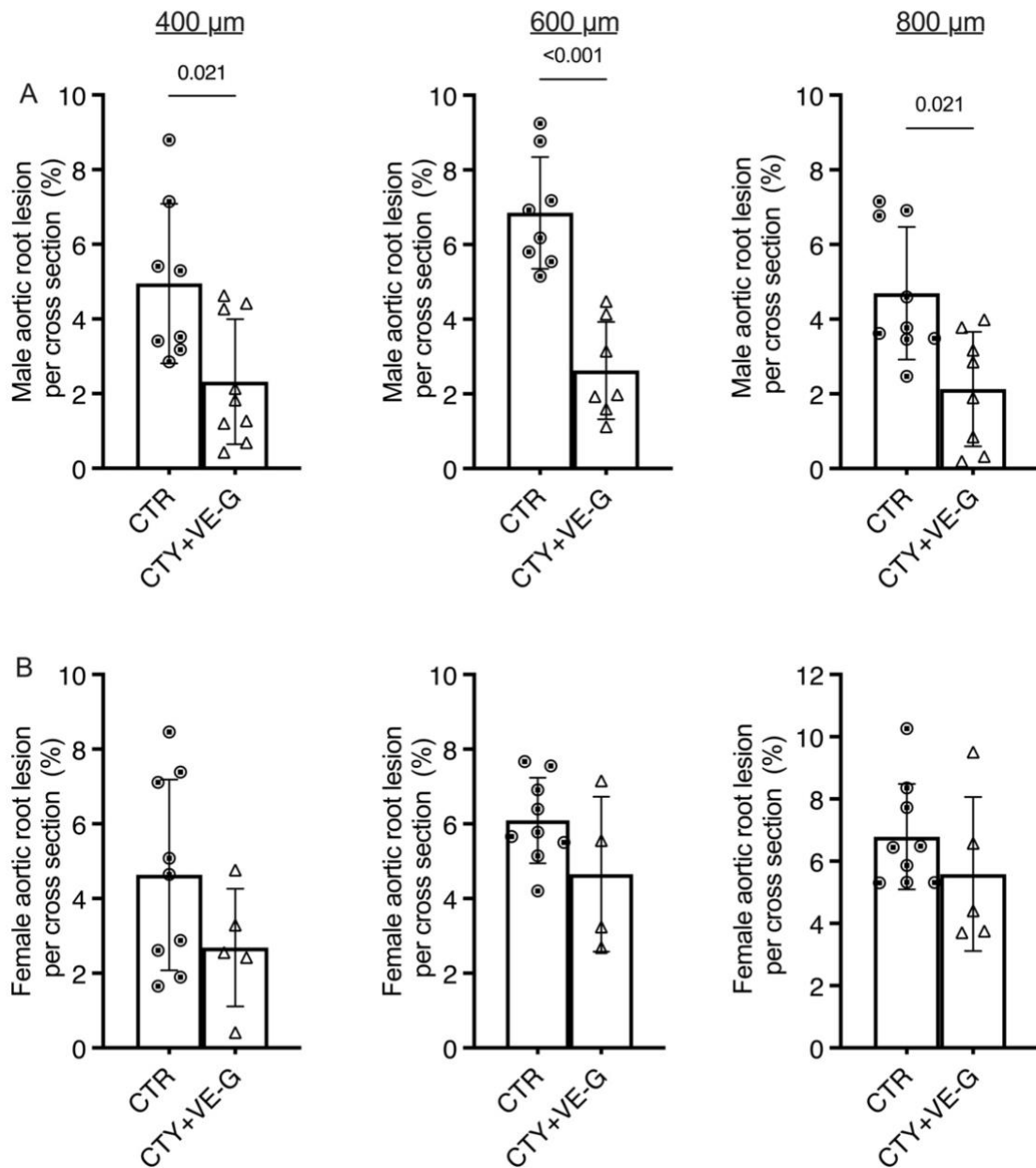
**Supplemental Table 1. Maternal plasma cholesterol and LDL-cholesterol of CTY+VE-G dams during gestation.** Plasma total cholesterol (TC) and LDL-Cholesterol (LDL-C) (mg/dL) of pregnant dams were measured at GD 0.5, GD 11.5 and GD 17.5 (n=4).



**Supplemental Figure 1. Hepatic antioxidant defense in CTY+VE-G dams.** (A) Reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione hepatic concentrations and GSH-to-GSSG ratio. (B) S-adenosyl-methionine (SAM) and S-Adenosylhomocysteine (SAH) liver concentrations and SAM-to-SAH ratio. Concentrations were determined in VE-G dams' liver at GD 18.5 (n=4-6).



**Supplemental Figure 2. Dams' gallbladder bile acid concentrations.** Bile acids of dams were quantified on GD 18.5 (n =3-7).

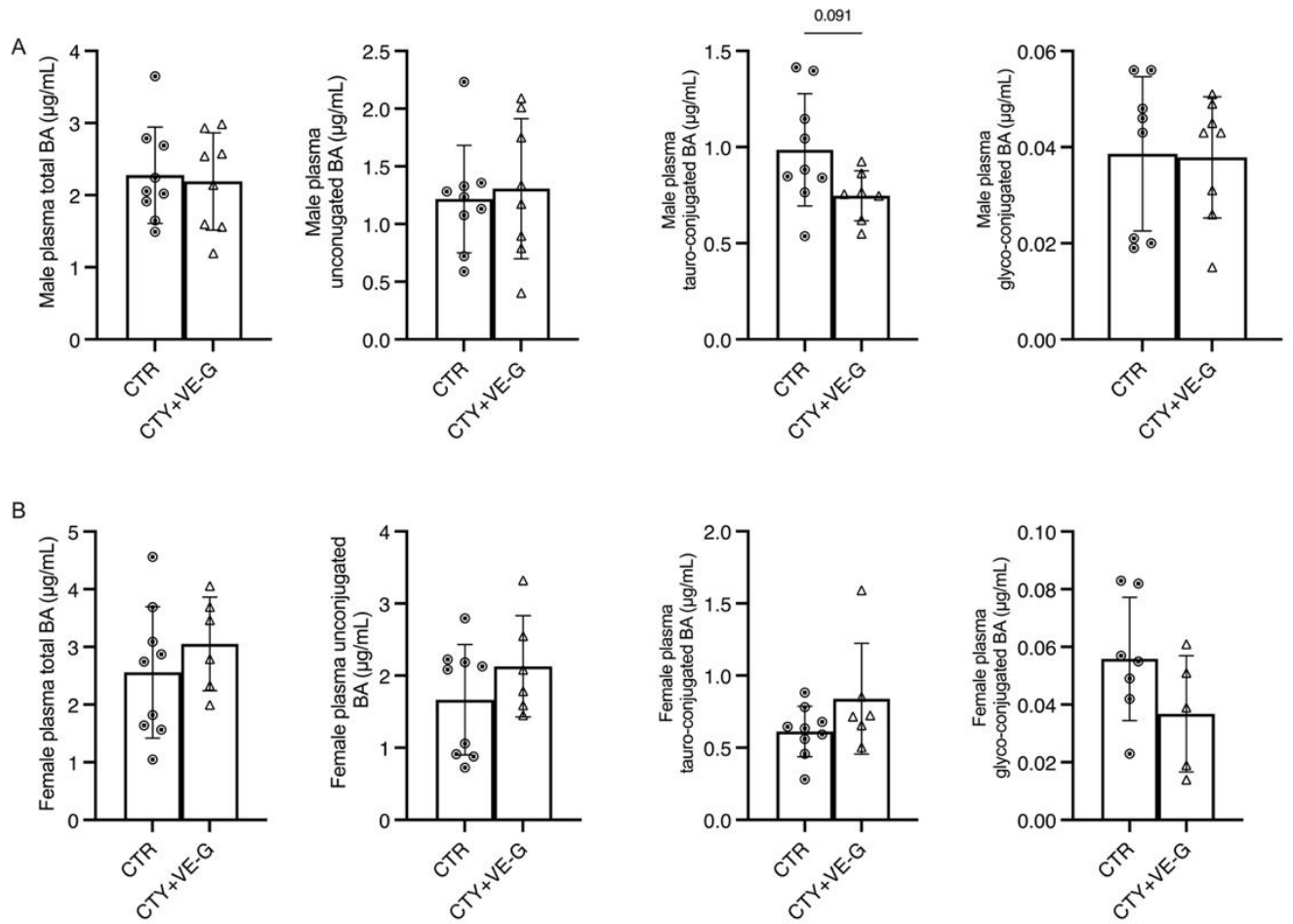


**Supplemental Figure 3. Quantification of atherosclerotic lesions of aortic roots in male (A) and female (B) CTY+VE-G offspring.** After Oil red O staining, atherosclerotic plaques in aortic cross-sections were quantified (%) in males (n = 5-8) and females (n = 4-8) at 400, 600 and 800 μm from the heart.

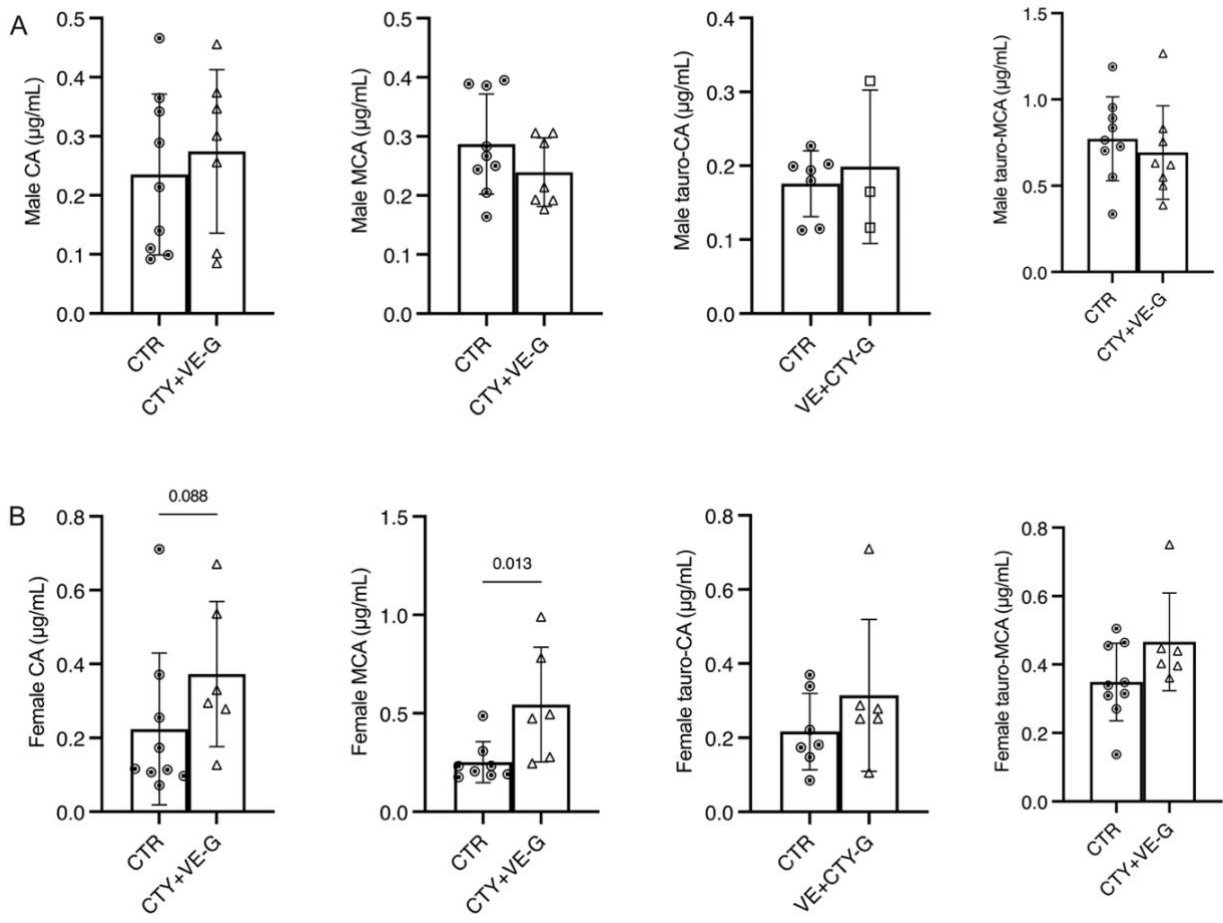
		CTR	CTY+VE-G	P value
Plasma TC (mg/dl)	Males	421 ± 79	364 ± 67	0.139
	Females	293 ± 50	310 ± 30	0.328
Plasma TG (mg/dl)	Males	85 ± 32	66 ± 20	0.237
	Females	60 ± 9	60 ± 20	0.796
Liver TC (mg/g)	Males	6.7 ± 2.8	3.6 ± 1.0	0.026
	Females	7.4 ± 1.5	5.7 ± 1.3	0.126
Liver TG (mg/g)	Males	12.6 ± 6.3	25.0 ± 11.4	0.026
	Females	40.3 ± 9.6	34.3 ± 10.7	0.240

**Supplemental Table 2. CTY+VE-G offspring plasma and liver cholesterol and triglycerides concentrations.** Total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) concentrations were measured in CTY+VE-G offspring' (A) plasma and (B) livers at sacrifice (n = 6-11).

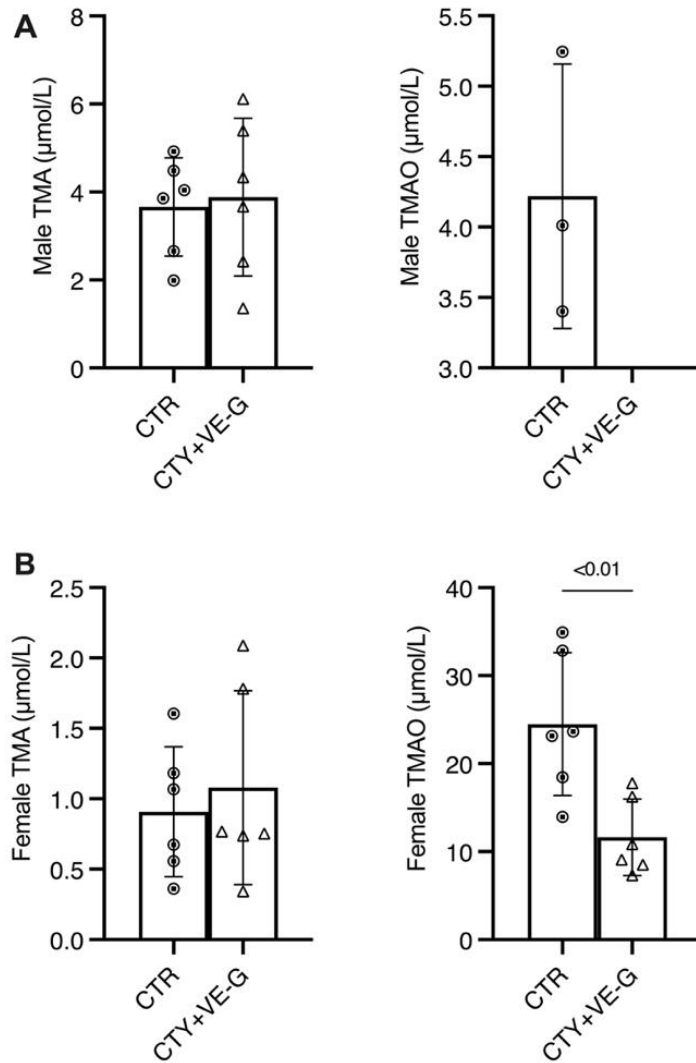




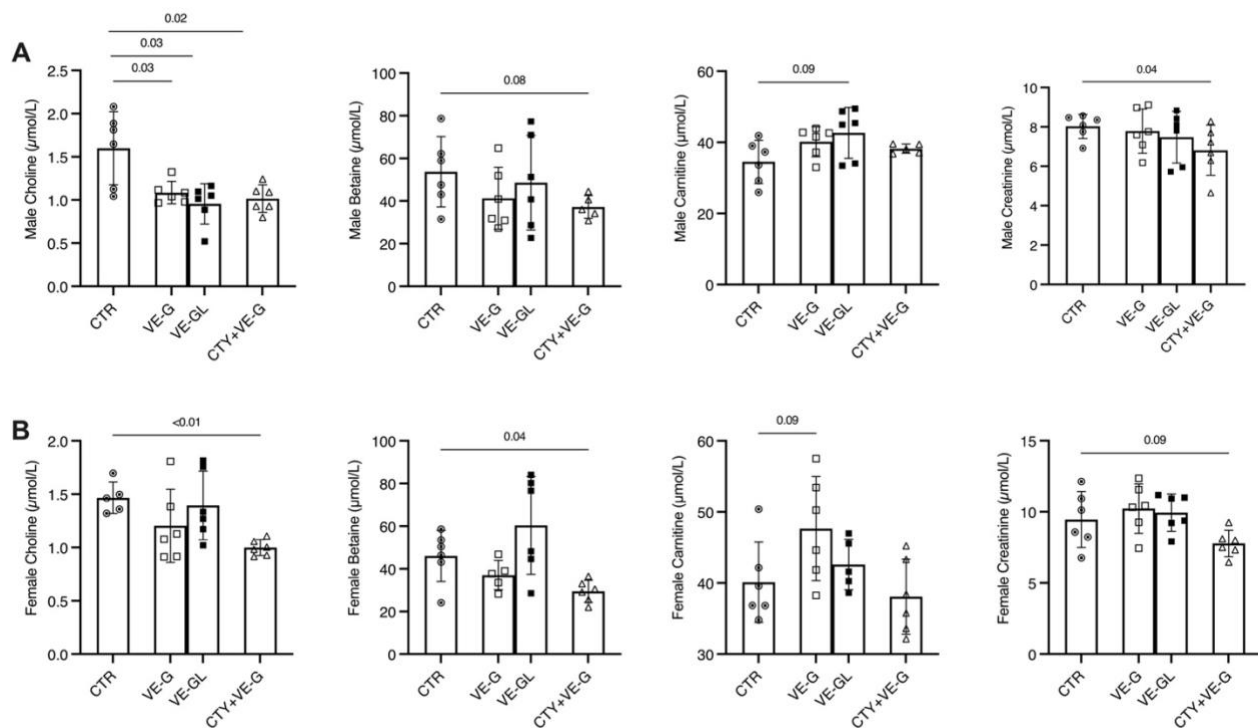
**Supplemental Figure 4. Bile acid (BA) concentrations in plasma of CTY+VE-G male (A) and female (B) offspring (n = 6-9 per group). Total, unconjugated, tauro-conjugated and glyco-conjugated BA concentration in plasma at sacrifice.**



**Supplemental Figure 5. Bile acid species concentrations in plasma of CTY+VE offspring.** Cholic-acid (CA), murocholic (MCA), tauro-cholic acid (tauro-CA) and tauro-murocholic acid (tauro-MCA) in (A) male and (B) female offspring. (n=3-8).



**Supplemental Figure 6. Plasma concentrations of TMA and TMAO in CTY+VE-G male (A) and female (B) offspring** (n =5-6 per group, except for undetected values in males). TMA: trimethylamine; TMAO: trimethylamine-N-oxide



**Supplemental Figure 7. Plasma methylamines concentrations of male (A) and female (B) offspring (n =5-6 per group).**

### **Discussion:**

We aimed to evaluate the effect of maternal antioxidant treatment during gestation or gestation and lactation on atherosclerosis development in adult offspring of apoE deficient mice. Since the high plasma cholesterol levels of apoE deficient mice are a major cause for oxidative imbalance (5,35), we also studied the effect of a lipid-lowering drug simultaneously with the antioxidant treatment during gestation.

Atherosclerotic plaques were reduced in males born to vitamin E-treated mothers during gestation (VE-G) and during gestation and lactation (VE-GL) compared to those born to untreated mothers (CTR). VE-G females also benefited from a significant reduction of plaques at 800  $\mu\text{m}$  from the heart, whereas VE-GL females only showed a tendency to reduction at all distances, and CTY+VE-G females didn't show any significant reduction compared to CTR females.

When assessing the effect of a combined CTY and VE treatment during gestation, CTY+VE-G males had significantly less atherosclerotic plaques compared to VE-G males, but no significant change observed between CTY+VE-G and VE-G in female offspring.

Vitamin E is a potent non-enzymatic antioxidant(36), and its ability to reduce oxidative stress by scavenging lipid peroxidation products was demonstrated in apoE deficient mice (15,16). Cholestyramine is among the few authorized lipid-lowering drugs during gestation (37), and had led to a significant reduction in total cholesterol and LDL-cholesterol in apoE<sup>-/-</sup> mice (article , HABIB et al., submitted to ATVB 2022).

In dams, we observed a significant increase in total and LDL-C cholesterol in VE-G dams around the end of gestation (GD 17.5). This is contradictory with results reported where vitamin E reduced plasma cholesterol in the non-pregnant C57BL/6 mice (38) but did not induce a significant changes in the non-pregnant apoE<sup>-/-</sup> (39,40) and rabbits (7,13). Note that in these studies, VE supplementation wasn't exclusive to gestational periods. We did not investigate in our study whether this increase in LDL is not related to an increase in broad LDL known to be easily removed by LDL R and less atherogenic than small ones. In addition, we believe that this increase would not affect offspring since maternal and fetal cholesterol levels are shown to be correlated during the two first semesters of gestation only in women (5).

Supplementation with vitamin E enhanced antioxidative defense system in dams. Reduced glutathione (GSH) is a potent endogenous antioxidant able to protect lipids from peroxidation (41). Hepatic GSH levels tended to increase in VE-G dams along with a significant increase in

GSH/GSSG ratio. GSH and GSH/GSSG ratio were not modified in CTY+VE-G dams probably due to the role of cholestyramine that is known to lessen GSH levels (42). Nevertheless, hepatic SAM and SAM/SAH ratio were significantly increased in VE-G, VE-GL and CTY+VE-G of dams. To further understand the underlying mechanisms of maternal antioxidative treatment against atherosclerosis development in offspring, we measured key parameters involved in cholesterol homeostasis, such as reverse transport to the liver (RCT). RCT is an athero-protective process, responsible for cholesterol transport from peripheral tissues and macrophages to the liver, where it is directly excreted to bile or converted to bile acids (43). These parameters were compared between sex-matched offspring as sexual dimorphism in the pathogenesis of atherosclerosis is well described in humans and in rodents (44,45).

Offspring born to treated mothers had comparable plasma cholesterol and triglycerides levels to those of sex-matched CTR offspring. In the literature, two studies in dietary-induced hypercholesterolemia during gestation of NZW rabbits used cholestyramine, vitamin E and the combined treatment to assess atherosclerosis development in offspring at different age (7,13). Similar results were obtained in term of atherosclerosis reduction in offspring of treated mothers. In our study combined maternal treatment during gestation provided further protection in males, whereas no similar results obtained in Napoli *et al.*, 's study (7), even with higher VE doses (13). Note that, two important differences between our studies are the animal model of hypercholesterolemia (dietary versus genetical) and treatment periods. Treatments were initiated 2 weeks before mating and continued until 1-week post-partum, whereas in our design we were interested in maternal environment optimization starting at conception (GD 0.5) and the treatment was continued during 3 weeks of gestation for G groups and during all lactation period for GL groups (3 additional weeks). Also, offspring used in our study were maintained under chow diet until sacrificed.

Several studies have showed that maternal hypercholesterolemia is associated with modifications in offspring' hepatic cholesterol metabolism (46–48) . Hepatic cholesterol content of VE-G and VE-GL males were significantly reduced compared to CTR males. Similar results were reported in apoE heterozygote mice (apoE +/-) where hepatic cholesterol synthesis was induced by maternal hypercholesterolemia (48). In another study (49), hepatic cholesterol levels in apoE -/- offspring born to mothers fed high cholesterol were significantly increased.

Total plasma BA levels were not significantly different between offspring. In mice, tauro-conjugated bile acids compose the major fraction of total bile acids (50). In VE-G and VE-GL females, tauro-conjugated bile acids were significantly increased which could reflect an increase in bile acid synthesis, stimulated by a more active peripheral cholesterol elimination (43). In VE-GL males, a significant increase of tauro-cholic acid (tauro-CA) was observed. Yang, *et al.* has shown that taurine reduced atherosclerosis development in TMAO-fed apoE<sup>-/-</sup> mice concomitantly with significant increase in tauro-cojugated BA (51). VE-GL females also showed a significant increase in hydrophilic muricholic acid (MCA). Hydrophilic bile acids feeding inhibits intestinal cholesterol absorption (52), providing anti-atherosclerotic protection (53). Furthermore, our findings reveal a protection against an accumulation of plasma TMAO in female offspring born to VE-treated mothers. Several reports indicate that TMAO contribute to the development of atherosclerosis in part by enhancing cholesterol uptake in macrophages and inhibiting BA synthesis (20,21). Regrading plasma TMAO of male offspring, it was only detected in n=1-3 male(s) of n=6 where it was measured. Testosterone was reported to inhibit liver flavin monooxygenase 3, the major enzyme converting trimethylamine into TMAO (54). Despite no statistical evidence, we could observe that TMAO was detected in higher levels in 3 CTR male offspring but only 1 VE-G and 1 VE-GL male.

Epigenetic modifications have been implicated as key modulators in the programming of offspring metabolic health (55,56). In a recent study by Dumolt. *et al.*, they showed that maternal hypercholesterolemia during gestation induced programming hepatic miRNAs of offspring (38). MiR are also important regulators acting in multiple aspect of atherosclerosis including lipid metabolism (22,57). VE-G males showed a tendency to reduction of miR-122, while in VE-GL females miR-122 was significantly reduced. Recently, it has been reported that increased serum miR-122 expression increases severity of atherosclerotic lesions (58,59), and miR-122 downregulation reduces plasma cholesterol and cholesterol synthesis rate (57). miR30-c expression was significantly reduced in VE-G and VE-GL female offspring despite atherosclerotic plaques reduction in these females. This is contradictory with the findings that miR-30c has anti-atherosclerotic role in apoE<sup>-/-</sup> mice (60).

Finally, hepatic expression of miR-27b was significantly increased in VE-GL males. It was shown that treatment of apoE<sup>-/-</sup> mice with miR-27-3p agomir leads to reduced atherosclerotic plaques area and reduced both pro-inflammatory cytokines' secretion and lipid accumulation in macrophages in abdominal cavity (61). Furthermore, miR-27 reduction in the liver may

increase plasma levels of apoA1 and enhance ABCA1- mediated cholesterol efflux (62). MiR are post-transcriptional regulators of gene expression and translation through degradation of mRNA. Thus, it will be needed to measure gene expression of the mRNA targets of these miR in order to better understand their potential contribution to atherosclerosis reduction in offspring.

To our knowledge, we are the first to study maternal vitamin E treatment, during two critical periods of fetal development, on atherosclerosis development in adult offspring of apoE deficient mice. Our data showed that the beneficial effect of this early intervention was sex-dependent and also varied upon maternal treatment period.



## **References:**

1. Dalen JE, Alpert JS, Goldberg RJ, Weinstein RS. The Epidemic of the 20th Century: Coronary Heart Disease. *Am J Med.* 2014 Sep;127(9):807–12.
2. Proctor, L. Mamo. Retention of fluorescent-labelled chylomicron remnants within the intima of the arterial wall - evidence that plaque cholesterol may be derived from post-prandial lipoproteins: Arterial retention of fluorescent post-prandial remnants. *Eur J Clin Invest.* 1998 Jun;28(6):497–503.
3. Abidov A, Chehab O. Cardiovascular risk assessment models: Have we found the perfect solution yet? *J Nucl Cardiol.* 2020 Dec;27(6):2375–85.
4. Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ.* 1995 Jul 15;311(6998):171–4.
5. Napoli C, D’Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1997 Dec 1;100(11):2680–90.
6. Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D’Armiento FP, Palinski W. Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *The Lancet.* 1999 Oct;354(9186):1234–41.
7. Napoli C, Witztum JL, Calara F, de Nigris F, Palinski W. Maternal Hypercholesterolemia Enhances Atherogenesis in Normocholesterolemic Rabbits, Which Is Inhibited by Antioxidant or Lipid-Lowering Intervention During Pregnancy: An Experimental Model of Atherogenic Mechanisms in Human Fetuses. *Circ Res.* 2000 Nov 10;87(10):946–52.
8. Napoli C, de Nigris F, Welch JS, Calara FB, Stuart RO, Glass CK, et al. Maternal Hypercholesterolemia During Pregnancy Promotes Early Atherogenesis in LDL Receptor-Deficient Mice and Alters Aortic Gene Expression Determined by Microarray. *Circulation.* 2002 Mar 19;105(11):1360–7.
9. Alkemade FE, Gittenberger-de Groot AC, Schiel AE, VanMunsteren JC, Hogers B, van Vliet LSJ, et al. Intrauterine Exposure to Maternal Atherosclerotic Risk Factors Increases the Susceptibility to Atherosclerosis in Adult Life. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Oct;27(10):2228–35.
10. Trenteseaux C, Gaston A, Aguesse A, Poupeau G, de Coppet P, Andriantsitohaina R, et al. Perinatal Hypercholesterolemia Exacerbates Atherosclerosis Lesions in Offspring by Altering Metabolism of Trimethylamine-N-Oxide and Bile Acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017 Nov;37(11):2053–63.
11. Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am J Med.* 1993 Apr;94(4):350–6.
12. Napoli C, Postiglione A, Triggiani M, Corso G, Palumbo G, Carbone V, et al. Oxidative structural modifications of low density lipoprotein in homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1995 Dec;118(2):259–73.

13. Palinski Wulf, D'Armiento Francesco P., Witztum Joseph L., de Nigris Filomena, Casanada Florencia, Condorelli Mario, et al. Maternal Hypercholesterolemia and Treatment During Pregnancy Influence the Long-Term Progression of Atherosclerosis in Offspring of Rabbits. *Circ Res.* 2001 Nov 23;89(11):991–6.
14. Coué M, Croyal M, Habib M, Castellano B, Aguesse A, Grit I, et al. Perinatal Administration of C-Phycocyanin Protects Against Atherosclerosis in apoE-Deficient Mice by Modulating Cholesterol and Trimethylamine-N-Oxide Metabolisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2021 Dec [cited 2022 Aug 23];41(12). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.121.316848>
15. Zhao L, Praticò D, Rader DJ, Funk CD. 12/15-Lipoxygenase gene disruption and Vitamin E administration diminish atherosclerosis and oxidative stress in apolipoprotein E deficient mice through a final common pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2005 Dec;78(1–4):185–93.
16. Praticò D, Tangirala RK, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA. Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Nat Med.* 1998 Oct;4(10):1189–92.
17. Princen HMG, van Duyvenvoorde W, Buytenhek R, van der Laarse A, van Poppel G, Leuven JAG, et al. Supplementation With Low Doses of Vitamin E Protects LDL From Lipid Peroxidation in Men and Women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Mar;15(3):325–33.
18. Jishage K ichi, Tachibe T, Ito T, Shibata N, Suzuki S, Mori T, et al. Vitamin E Is Essential for Mouse Placentation but Not for Embryonic Development Itself. *Biol Reprod.* 2005 Nov 1;73(5):983–7.
19. Annema W, Tietge UJ. Regulation of reverse cholesterol transport - a comprehensive appraisal of available animal studies. *Nutr Metab.* 2012;9(1):25.
20. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, DuGar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011 Apr;472(7341):57–63.
21. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.* 2013 May;19(5):576–85.
22. Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):703–20.
23. Willeit P, Skrobilin P, Kiechl S, Fernández-Hernando C, Mayr M. Liver microRNAs: potential mediators and biomarkers for metabolic and cardiovascular disease? *Eur Heart J.* 2016 Nov 14;37(43):3260–6.
24. Churov A, Summerhill V, Grechko A, Orekhova V, Orekhov A. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 7;20(22):5547.
25. Zhang MW, Shen YJ, Shi J, Yu JG. MiR-223-3p in Cardiovascular Diseases: A Biomarker and Potential Therapeutic Target. *Front Cardiovasc Med.* 2021 Jan 20;7:610561.

26. Svoboda P, Flemr M. The role of miRNAs and endogenous siRNAs in maternal-to-zygotic reprogramming and the establishment of pluripotency. *EMBO Rep.* 2010 Aug;11(8):590–7.
27. Dumolt JH, Patel MS, Rideout TC. Gestational hypercholesterolemia programs hepatic steatosis in a sex-specific manner in ApoE-deficient mice. *J Nutr Biochem.* 2022 Mar;101:108945.
28. Chango A, Pogribny I. Considering Maternal Dietary Modulators for Epigenetic Regulation and Programming of the Fetal Epigenome. *Nutrients.* 2015 Apr 14;7(4):2748–70.
29. Engedal N, Žerovnik E, Rudov A, Galli F, Olivieri F, Procopio AD, et al. From Oxidative Stress Damage to Pathways, Networks, and Autophagy via MicroRNAs. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:1–16.
30. Bligh EG, Dyer WJ. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. :7.
31. Brochard C, Bouguen G, Olivier R, Durand T, Henno S, Peyronnet B, et al. Altered epithelial barrier functions in the colon of patients with spina bifida. *Sci Rep.* 2022 Dec;12(1):7196.
32. Pelletier CC, Croyal M, Ene L, Aguesse A, Billon-Crossouard S, Krempf M, et al. Elevation of Trimethylamine-N-Oxide in Chronic Kidney Disease: Contribution of Decreased Glomerular Filtration Rate. *Toxins.* 2019 Nov 1;11(11):635.
33. Bláhová L, Kohoutek J, Lebedová J, Bláha L, Večeřa Z, Buchtová M, et al. Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in tissues by a novel liquid chromatography-mass spectrometry method: application in an inhalation study of Cd nanoparticles. *Anal Bioanal Chem.* 2014 Sep;406(24):5867–76.
34. Kirsch SH, Knapp JP, Geisel J, Herrmann W, Obeid R. Simultaneous quantification of S-adenosyl methionine and S-adenosyl homocysteine in human plasma by stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2009 Nov;877(30):3865–70.
35. Liguori A, D’Armiento F, Palagiano A, Balestrieri M, Williams-Ignarro S, De Nigris F, et al. Effect of gestational hypercholesterolaemia on omental vasoreactivity, placental enzyme activity and transplacental passage of normal and oxidised fatty acids. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* 2007 Sep 28;114(12):1547–56.
36. Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr.* 1991 Apr 1;53(4):1050S-1055S.
37. Goldberg AC, Hopkins PN, Toth PP, Ballantyne CM, Rader DJ, Robinson JG, et al. Familial Hypercholesterolemia: Screening, diagnosis and management of pediatric and adult patients. *J Clin Lipidol.* 2011 Jun;5(3):S1–8.
38. Munday JS, Thompson KG, James KAC, Manktelow BW. Dietary Antioxidants Do Not Reduce Fatty Streak Formation in the C57BL/6 Mouse Atherosclerosis Model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Jan;18(1):114–9.

39. Peluzio MCG, Homem APP, Cesar GC, Azevedo GS, Amorim R, Cara DC, et al. Influences of alpha-tocopherol on cholesterol metabolism and fatty streak development in apolipoprotein E-deficient mice fed an atherogenic diet. *Braz J Med Biol Res.* 2001 Dec;34(12):1539–45.
40. Busso D, Mascareño L, Salas F, Berkowitz L, Santander N, Quiroz A, et al. Early Onset Intrauterine Growth Restriction in a Mouse Model of Gestational Hypercholesterolemia and Atherosclerosis. *BioMed Res Int.* 2014;2014:1–11.
41. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* [Internet]. 2014 Aug 26 [cited 2022 Sep 29];5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2014.00196/abstract>
42. Wang Y, Li J, Matye D, Zhang Y, Dennis K, Ding WX, et al. Bile acids regulate cysteine catabolism and glutathione regeneration to modulate hepatic sensitivity to oxidative injury. *JCI Insight.* 2018 Apr 19;3(8):e99676.
43. Wang HH, Garruti G, Liu M, Portincasa P, Wang DQH. Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis: Recent Advances in Reverse Cholesterol Transport. *Ann Hepatol.* 2017 Nov;16:S27–42.
44. Man JJ, Beckman JA, Jaffe IZ. Sex as a Biological Variable in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2020 Apr 24;126(9):1297–319.
45. Bubb KJ, Khambata RS, Ahluwalia A. Sexual dimorphism in rodent models of hypertension and atherosclerosis: Sex and cardiovascular disease. *Br J Pharmacol.* 2012 Sep;167(2):298–312.
46. Dumolt JH, Ma M, Mathew J, Patel MS, Rideout TC. Gestational hypercholesterolemia alters fetal hepatic lipid metabolism and microRNA expression in Apo-E-deficient mice. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 2019 Nov 1;317(5):E831–8.
47. Mathew J, Huang S chi, Dumolt JH, Patel MS, Rideout TC. Maternal hypercholesterolemia programs dyslipidemia in adult male mouse progeny. *Reproduction.* 2020 Jul;160(1):1–10.
48. Goharkhay N, Tamayo EH, Yin H, Hankins GDV, Saade GR, Longo M. Maternal hypercholesterolemia leads to activation of endogenous cholesterol synthesis in the offspring. *Am J Obstet Gynecol.* 2008 Sep;199(3):273.e1-273.e6.
49. Dumolt JH, Browne RW, Patel MS, Rideout TC. Malprogramming of Hepatic Lipid Metabolism due to Excessive Early Cholesterol Exposure in Adult Progeny. *Mol Nutr Food Res.* 2019 Jan;63(2):1800563.
50. Li J, Dawson PA. Animal models to study bile acid metabolism. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2019 May;1865(5):895–911.
51. Yang JY, Zhang TT, Yu ZL, Wang CC, Zhao YC, Wang YM, et al. Taurine Alleviates Trimethylamine *N*-Oxide-Induced Atherosclerosis by Regulating Bile Acid Metabolism in ApoE<sup>-/-</sup> Mice. *J Agric Food Chem.* 2022 May 11;70(18):5738–47.
52. Wang DQH, Tazuma S, Cohen DE, Carey MC. Feeding natural hydrophilic bile acids inhibits intestinal cholesterol absorption: studies in the gallstone-susceptible mouse. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Sep;285(3):G494–502.

53. Zou J, Zhang S, Li P, Zheng X, Feng D. Supplementation with curcumin inhibits intestinal cholesterol absorption and prevents atherosclerosis in high-fat diet-fed apolipoprotein E knockout mice. *Nutr Res.* 2018 Aug;56:32–40.
54. Bennett BJ, Vallim TQ de A, Wang Z, Shih DM, Meng Y, Gregory J, et al. Trimethylamine-N-Oxide, a Metabolite Associated with Atherosclerosis, Exhibits Complex Genetic and Dietary Regulation. *Cell Metab.* 2013 Jan;17(1):49–60.
55. Heerwagen MJR, Miller MR, Barbour LA, Friedman JE. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 2010 Sep;299(3):R711–22.
56. Lee HS. Impact of Maternal Diet on the Epigenome during In Utero Life and the Developmental Programming of Diseases in Childhood and Adulthood. *Nutrients.* 2015 Nov 17;7(11):9492–507.
57. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 2006 Feb;3(2):87–98.
58. Wang YL, Yu W. Association of circulating microRNA-122 with presence and severity of atherosclerotic lesions. *PeerJ.* 2018 Jul 4;6:e5218.
59. Singh S, de Ronde MWJ, Kok MGM, Beijk MA, De Winter RJ, van der Wal AC, et al. MiR-223-3p and miR-122-5p as circulating biomarkers for plaque instability. *Open Heart.* 2020 Jun;7(1):e001223.
60. Soh J, Iqbal J, Queiroz J, Fernandez-Hernando C, Hussain MM. MicroRNA-30c reduces hyperlipidemia and atherosclerosis in mice by decreasing lipid synthesis and lipoprotein secretion. *Nat Med.* 2013 Jul;19(7):892–900.
61. Xie W, Li L, Zhang M, Cheng HP, Gong D, Lv YC, et al. MicroRNA-27 Prevents Atherosclerosis by Suppressing Lipoprotein Lipase-Induced Lipid Accumulation and Inflammatory Response in Apolipoprotein E Knockout Mice. Zhang Y, editor. *PLOS ONE.* 2016 Jun 3;11(6):e0157085.
62. Zhang M, Wu JF, Chen WJ, Tang SL, Mo ZC, Tang YY, et al. MicroRNA-27a/b regulates cellular cholesterol efflux, influx and esterification/hydrolysis in THP-1 macrophages. *Atherosclerosis.* 2014 May;234(1):54–64.

i. Discussion:

Dans cette étude, nous avons démontré qu'un traitement périnatal avec la vitamine E, augmente la défense antioxydante maternelle et réduit le développement de plaques d'athérosclérose chez la descendance adulte de souris ApoE<sup>-/-</sup>.

De même, un traitement maternel combiné de cholestyramine (hypocholestérolémiant) et de vitamine E pendant la gestation réduit le stress oxydant maternel et prévient le développement de l'athérosclérose au niveau des valves aortiques chez la descendance mâle uniquement. De plus, les mâles issus de mères recevant le double traitement (CTY+VE-G) développaient significativement moins de plaques par rapport aux mâles VE-G. Ces effets n'étaient pas observés chez les femelles CTY+VE-G.

Les résultats obtenus sont encourageants pour exploiter un ou plusieurs mécanisme(s) derrière la prévention périnatale de l'athérosclérose par réduction du stress oxydant maternel, dans un modèle de souris génétiquement hypercholestérolémiques. Cependant, des analyses supplémentaires seront nécessaires, afin de mettre en évidence le ou les mécanismes impliqués dans cette protection.

- A part la quantification des plaques d'athérome au niveau des valves aortiques, leur quantification au niveau d'autres zones prônes à l'athérosclérose, comme l'arc aortique et les branches principales de l'aorte thoracique (technique *en face aorta*), permettra une estimation plus générale de l'effet du traitement maternel.
- Les mâles des 3 groupes (VE-G, VE-GL et CTY+VE-G) présentent une réduction significative du cholestérol hépatique. Le contenu lipidique dans les foies des femelles restait inchangé entre les différents groupes. La quantification du stress oxydant dans les foies des descendants (GSH/GSSG et SAM/SAH) ainsi que les expressions de gènes impliqués dans la synthèse de cholestérol et de la régulation du stress oxydant sont en cours de réalisation, et permettront de détecter une potentielle programmation foétale de l'activité hépatique.
- Pour l'instant, nous avons quantifié les acides biliaires dans le plasma. Cette mesure sera complétée par leur dosage au niveau de la bile, un deuxième compartiment du cycle entero-hépatique, ainsi que par les expressions de gènes codant les enzymes de synthèse des acides biliaires (CYP7A1, CYP8B1, CYP27A1...). La synthèse des acides biliaires reflète

le statut du transport reverse du cholestérol. Une activité accrue de ce dernier est athéro-protective.

- La détermination du profile lipidique ainsi que la concentration plasmatique des apolipoprotéines sont également en cours.
- L'expression des gènes cibles des miR étudiés manque pour l'instant de notre étude.

# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES



Le but de ma thèse était d'élucider les mécanismes potentiels par lesquels l'hypercholestérolémie maternelle durant la période périnatale programme le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris ApoE -/-, génétiquement prédisposées.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet d'un traitement hypocholestérolémiant pendant la période de gestation ou de gestation et lactation sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte. Nous avons d'abord vérifié l'effet de cet hypocholestérolémiant chez les mères pendant la gestation. Chez ces mères, nous avons mesuré une réduction significative de la concentration du cholestérol des LDL, une perturbation du cycle entero-hépatique des acides biliaires, et une augmentation de la défense anti-oxydative dans le foie.

Nous avons ainsi montré **qu'un traitement périnatal avec la cholestyramine réduit le développement de l'athérosclérose chez la descendance**. La réduction des plaques d'athérome chez la progéniture des mères traitées s'est accompagnée d'une perturbation du métabolisme des acides biliaires. Chez les mâles, une diminution de la concentration des acides biliaires dans la bile a été observée. Alors que chez les femelles, une augmentation des acides biliaires tauro-conjugués dans le plasma a été mesurée. Le contenu hépatique en cholestérol était réduit chez les mâles. Les femelles semblaient être protégées par la réduction des niveaux de triméthylamine-N-oxyde (TMAO). Finalement, nous avons mesuré des variations significatives de l'expression hépatique des miR connus pour avoir un rôle protecteur contre l'athérosclérose, miR-122, miR-223, miR-30c et miR-27. **(Figure 16)**

Comme l'hypercholestérolémie maternelle est associée à un stress oxydant (Napoli et al., 1997), nous avons dans un second temps étudié l'effet d'un traitement avec un antioxydant pendant la gestation ou la gestation et la lactation sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris apoE-/-.

Chez les mères traitées à la vitamine E, nous avons montré une augmentation des défenses antioxydantes mesurée par une augmentation des ratios GSH/GSSG et SAM/SAH. Chez la descendance de mères traitées, nous avons montré **une réduction significative du développement de l'athérosclérose**. La réduction des plaques d'athérome était accompagnée par une diminution du cholestérol hépatique chez les descendants mâles, et une réduction du TMAO plasmatique chez les femelles. Seul le miR-27 montre une variation significative chez

les mâles où son expression est réduite chez les mâles VE-GL. L'expression du miR-30c était significativement réduite chez les deux groupes de femelles (VE-G et VE-GL). **(Figure 17)**

Nous avons également testé l'effet d'un traitement combiné de cholestyramine et de vitamine E durant la gestation. Chez les mères, ce traitement entraîne à la fois une réduction de la concentration des acides biliaires dans la bile et une augmentation de la défense antioxydante (augmentation du ratio SAM/SAH). **Le traitement maternel combiné de cholestyramine et vitamine E pendant la gestation (CTY+VE-G), permet une réduction des plaques d'athérome chez la descendance mâle.** Comparés aux descendants de mères recevant la vitamine E uniquement durant la gestation (VE-G), les mâles CTY+VE développent significativement moins de plaques d'athérome. Ces effets protecteurs du traitement maternel combiné n'étaient pas observés chez la descendance femelle.

**En conclusion, nous avons montré qu'un traitement périnatal avec un hypocholestérolémiant ou un antioxydant protègent les descendants contre le développement de l'athérosclérose, et qu'un traitement combiné durant la gestation, leur confère aux descendants males une protection supplémentaire.**

Cependant, des analyses en cours de réalisation (détermination du profil lipoprotéique, des concentrations plasmatiques d'apolipoprotéines, du stress oxydant hépatique, des expressions de gènes chez les descendants), nous permettront de mieux comprendre le ou les mécanismes derrière les effets de chacun de ces traitements. Ces analyses ont pour but de d'expliquer certains résultats déjà obtenus, comme la variation du contenu hépatique en cholestérol, des concentrations des acides biliaires plasmatiques et biliaires, ainsi que des expressions de microARN hépatiques. A noter que ces variations dépendaient à la fois de la durée du traitement maternel ainsi que du sexe des descendants.

Le traitement maternel avec la cholestyramine et/ou à la vitamine E entraîne plusieurs modifications physiologiques chez la mère. Il est alors probable que la programmation fœtale par un traitement maternel donné soit associée non seulement à son activité principale (diminution de l'hypercholestérolémie avec la cholestyramine, et réduction du stress oxydant avec la vitamine E) mais aussi à la modification d'autres facteurs.

L'hypercholestérolémie maternelle aboutit à un dysfonctionnement endothélial de la veine ombilicale (Leiva et al., 2013, 2015) et à des modifications de l'expression des récepteurs des lipoprotéines et des transporteurs de cholestérol au niveau du placenta (Ethier-Chiasson et al., 2007; R. Zhang et al., 2017). **Afin de mieux comprendre comment les traitements maternels utilisés protègent les descendants contre le développement de l'athérosclérose**, nous avons collectés des placentas de mères traitées ou non pendant la période de gestation, au jour gestationnel 18.5. Des analyses histologiques et moléculaires sont en cours de réalisation. Les foies des fœtus à ce stade ont été collectés. Nous souhaiterons étudier au moins la programmation prénatale du métabolisme hépatique du cholestérol et du statut oxydant. Pour cela, des expressions de gènes impliqués dans ces deux processus seront étudiées et comparées à celles observées dans la descendance adulte (25 semaines d'âge). Cependant, une des limites de notre étude est l'absence de données sur l'effet des traitements maternels sur la composition du lait. Nous nous baserons sur les résultats publiés par d'autres équipes afin de comprendre les différences observées. Pour faire suite à ces travaux, il serait intéressant d'étudier si cet effet protecteur du traitement maternel est transmis au-delà de la génération F1, à la génération F2 par exemple.

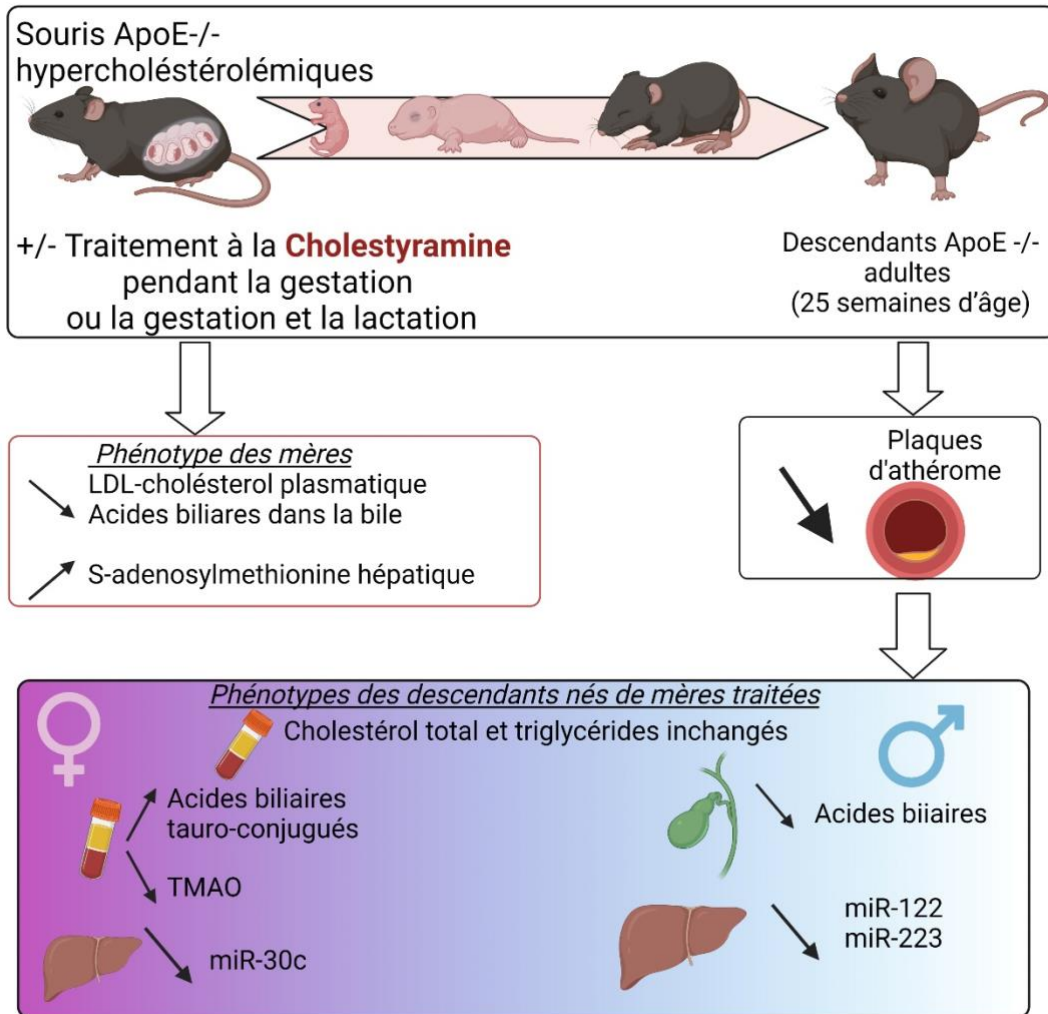


Figure 16. Effet d'un traitement périnatal avec la cholestyramine.

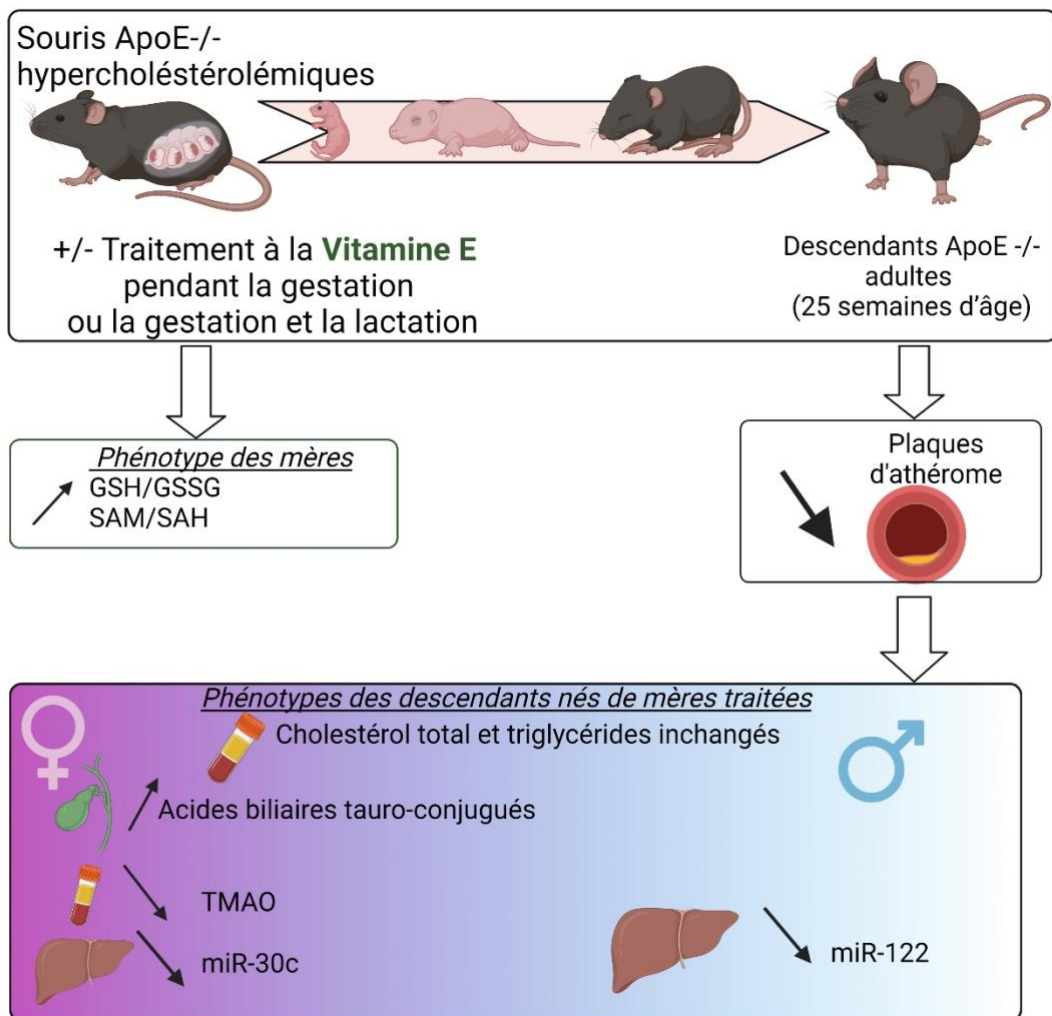


Figure 17. Effet d'une supplémentation périnatale avec la vitamine E.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afonso, M. S., Machado, R. M., Lavrador, M., Quintao, E. C. R., Moore, K., & Lottenberg, A. (2018). Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis. *Nutrients*, *10*(6), 760. <https://doi.org/10.3390/nu10060760>
- Agerholm-Larsen, B., Nordestgaard, B. G., Steffensen, R., Jensen, G., & Tybjærg-Hansen, A. (2000). Elevated HDL Cholesterol Is a Risk Factor for Ischemic Heart Disease in White Women When Caused by a Common Mutation in the Cholesteryl Ester Transfer Protein Gene. *Circulation*, *101*(16), 1907-1912. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.16.1907>
- Aiken, C. E., & Ozanne, S. E. (2013). Sex differences in developmental programming models. *REPRODUCTION*, *145*(1), R1-R13. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0489>
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases : Structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, *357*(3), 593-615. <https://doi.org/10.1042/bj3570593>
- Ali, K., Middleton, M., Puré, E., & Rader, D. J. (2005). Apolipoprotein E Suppresses the Type I Inflammatory Response In Vivo. *Circulation Research*, *97*(9), 922-927. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000187467.67684.43>
- Alique, M., Luna, C., Carracedo, J., & Ramírez, R. (2015). LDL biochemical modifications : A link between atherosclerosis and aging. *Food & Nutrition Research*, *59*(1), 29240. <https://doi.org/10.3402/fnr.v59.29240>
- Allam, A. H., Thompson, R. C., Wann, L. S., Miyamoto, M. I., Nur el-Din, A. el-Halim, el-Maksoud, G. A., Al-Tohamy Soliman, M., Badr, I., el-Rahman Amer, H. A., Sutherland, M. L., Sutherland, J. D., & Thomas, G. S. (2011). Atherosclerosis in Ancient Egyptian Mummies : The Horus Study. *JACC: Cardiovascular Imaging*, *4*(4), 315-327. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2011.02.002>

- Alves-Silva, J. M., Zuzarte, M., Girão, H., & Salgueiro, L. (2021). The Role of Essential Oils and Their Main Compounds in the Management of Cardiovascular Disease Risk Factors. *Molecules*, 26(12), 3506. <https://doi.org/10.3390/molecules26123506>
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350-355. <https://doi.org/10.1038/nature02871>
- Ananthanarayanan, M., Balasubramanian, N., Makishima, M., Mangelsdorf, D. J., & Suchy, F. J. (2001). Human Bile Salt Export Pump Promoter Is Transactivated by the Farnesoid X Receptor/Bile Acid Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 28857-28865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011610200>
- Aranda, J. F., Madrigal-Matute, J., Rotllan, N., & Fernández-Hernando, C. (2013). MicroRNA modulation of lipid metabolism and oxidative stress in cardiometabolic diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 64, 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.014>
- Aseervatham, G. S. B., Sivasudha, T., Jeyadevi, R., & Arul Ananth, D. (2013). Environmental factors and unhealthy lifestyle influence oxidative stress in humans—An overview. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(7), 4356-4369. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1748-0>
- Ast, M., & Frishman, W. H. (1990). Bile Acid Sequestrants. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 30(2), 99-106. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1990.tb03447.x>
- Baardman, M. E., Kerstjens-Frederikse, W. S., Berger, R. M. F., Bakker, M. K., Hofstra, R. M. W., & Plösch, T. (2013). The Role of Maternal-Fetal Cholesterol Transport in Early Fetal Life : Current Insights1. *Biology of Reproduction*, 88(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102442>



- Badimon, L., Casani, L., & Vilahur, G. (2013). Models for the Study of Atherosclerosis and Thrombosis. In *Animal Models for the Study of Human Disease* (p. 221-239). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415894-8.00010-5>
- Badimon, L., & Llorente-Cortés, V. (2004). Atherogenesis. In *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (p. 278-287). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-475570-4/00161-X>
- Ballinger, S. W., Patterson, C., Knight-Lozano, C. A., Burow, D. L., Conklin, C. A., Hu, Z., Reuf, J., Horaist, C., Lebovitz, R., Hunter, G. C., McIntyre, K., & Runge, M. S. (2002). Mitochondrial Integrity and Function in Atherogenesis. *Circulation*, *106*(5), 544-549. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000023921.93743.89>
- Barbieri, S. S., Cavalca, V., Eligini, S., Brambilla, M., Caiani, A., Tremoli, E., & Colli, S. (2004). Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, *37*(2), 156-165. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.020>
- Barker, D. (1997). Fetal undernutrition and disease in later life. *Reviews of Reproduction*, *2*(2), 105-112. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0020105>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs : Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, *116*(2), 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Barter, P. J., Caulfield, M., Eriksson, M., Grundy, S. M., Kastelein, J. J. P., Komajda, M., Lopez-Sendon, J., Mosca, L., Tardif, J.-C., Waters, D. D., Shear, C. L., Revkin, J. H., Buhr, K. A., Fisher, M. R., Tall, A. R., & Brewer, B. (2007). Effects of Torcetrapib in Patients at High Risk for Coronary Events. *New England Journal of Medicine*, *357*(21), 2109-2122. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706628>
- Basaran, A. (2009). Pregnancy-induced Hyperlipoproteinemia : Review of the Literature. *Reproductive Sciences*, *16*(5), 431-437. <https://doi.org/10.1177/1933719108330569>

- Bays, H. E., Neff, D., Tomassini, J. E., & Terhakovec, A. M. (2008). Ezetimibe : Cholesterol lowering and beyond. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 6(4), 447-470. <https://doi.org/10.1586/14779072.6.4.447>
- Bennet, A. M., Di Angelantonio, E., Ye, Z., Wensley, F., Dahlin, A., Ahlbom, A., Keavney, B., Collins, R., Wiman, B., de Faire, U., & Danesh, J. (2007). Association of Apolipoprotein E Genotypes With Lipid Levels and Coronary Risk. *JAMA*, 298(11), 1300. <https://doi.org/10.1001/jama.298.11.1300>
- Berneis, K. K., & Krauss, R. M. (2002). Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *Journal of Lipid Research*, 43(9), 1363-1379. <https://doi.org/10.1194/jlr.R200004-JLR200>
- Bishop-Bailey, D., Walsh, D. T., & Warner, T. D. (2004). Expression and activation of the farnesoid X receptor in the vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10), 3668-3673. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400046101>
- Boveris, A., Cadenas, E., & Stoppani, A. O. (1976). Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *The Biochemical Journal*, 156(2), 435-444. <https://doi.org/10.1042/bj1560435>
- Boyd, E. M., & Wilson, K. M. (1935). THE EXCHANGE OF LIPIDS IN THE UMBILICAL CIRCULATION AT BIRTH. *Journal of Clinical Investigation*, 14(1), 7-15. <https://doi.org/10.1172/JCI100659>
- Brown, T. M., & Bittner, V. (2008). Biomarkers of atherosclerosis : Clinical applications. *Current Cardiology Reports*, 10(6), 497-504. <https://doi.org/10.1007/s11886-008-0078-1>
- Bruce, C., Chouinard, R. A., & Tall, A. R. (1998). PLASMA LIPID TRANSFER PROTEINS, HIGH-DENSITY LIPOPROTEINS, AND REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT. *Annual Review of Nutrition*, 18(1), 297-330. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.18.1.297>

- Buettner, G. R. (1993). The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants : Lipid Peroxidation,  $\alpha$ -Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(2), 535-543. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1074>
- Busso, D., Mascareño, L., Salas, F., Berkowitz, L., Santander, N., Quiroz, A., Amigo, L., Valdés, G., & Rigotti, A. (2014). Early Onset Intrauterine Growth Restriction in a Mouse Model of Gestational Hypercholesterolemia and Atherosclerosis. *BioMed Research International*, 2014, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2014/280497>
- Calara, F., Silvestre, M., Casanada, F., Yuan, N., Napoli, C., & Palinski, W. (2001). Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. *The Journal of Pathology*, 195(2), 257-263. <https://doi.org/10.1002/path.915>
- Camejo, G., Lalaguna, F., Lopez, F., & Starosta, R. (1980). Characterization and properties of a lipoprotein-complexing proteoglycan from human aorta. *Atherosclerosis*, 35(3), 307-320. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(80\)90129-X](https://doi.org/10.1016/0021-9150(80)90129-X)
- Castelli, W. P., Garrison, R. J., Wilson, P. W., Abbott, R. D., Kalousdian, S., & Kannel, W. B. (1986). Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA*, 256(20), 2835-2838.
- Chang, J.-C., Chen, Y.-J., Chen, I.-C., Lin, W.-S., Chen, Y.-M., & Lin, C.-H. (2021). Perinatal Outcomes After Statin Exposure During Pregnancy. *JAMA Network Open*, 4(12), e2141321. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.41321>
- Chatzizisis, Y. S., Coskun, A. U., Jonas, M., Edelman, E. R., Feldman, C. L., & Stone, P. H. (2007). Role of Endothelial Shear Stress in the Natural History of Coronary Atherosclerosis and Vascular Remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(25), 2379-2393. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.02.059>

- Cheung, O., Puri, P., Eicken, C., Contos, M. J., Mirshahi, F., Maher, J. W., Kellum, J. M., Min, H., Luketic, V. A., & Sanyal, A. J. (2008). Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology*, *48*(6), 1810-1820. <https://doi.org/10.1002/hep.22569>
- Chevallier, F. (1964). Transferts et synthèse du cholestérol chez le rat au cours de sa croissance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Lipids and Related Subjects*, *84*(3), 316-339. [https://doi.org/10.1016/0926-6542\(64\)90059-9](https://doi.org/10.1016/0926-6542(64)90059-9)
- Chiang, J. Y. L., & Ferrell, J. M. (2020). Bile acid receptors FXR and TGR5 signaling in fatty liver diseases and therapy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *318*(3), G554-G573. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00223.2019>
- Chiang, J. Y. L., & Vlahcevic, Z. R. (1996). The Regulation of Cholesterol Conversion to Bile Acids. In *Advances in Molecular and Cell Biology* (Vol. 14, p. 269-316). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1569-2558\(08\)60347-1](https://doi.org/10.1016/S1569-2558(08)60347-1)
- Churov, A., Summerhill, V., Grechko, A., Orekhova, V., & Orekhov, A. (2019). MicroRNAs as Potential Biomarkers in Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(22), 5547. <https://doi.org/10.3390/ijms20225547>
- Connor, W. E., & Lin, D. S. (1967). Placental transfer of cholesterol-4-14C into rabbit and guinea pig fetus. *Journal of Lipid Research*, *8*(6), 558-564.
- Cortes, V. (2014). Physiological and pathological implications of cholesterol. *Frontiers in Bioscience*, *19*(3), 416. <https://doi.org/10.2741/4216>
- Coué, M., Croyal, M., Habib, M., Castellano, B., Aguesse, A., Grit, I., Gourdel, M., Billard, H., Lépine, O., Michel, C., & Ouguerram, K. (2021). Perinatal Administration of C-Phycocyanin Protects Against Atherosclerosis in apoE-Deficient Mice by Modulating Cholesterol and Trimethylamine-N-Oxide Metabolisms. *Arteriosclerosis, Thrombosis,*

- and Vascular Biology*, 41(12), e512-e523.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.316848>
- Curtiss, L. K., & Boisvert, W. A. (2000). Apolipoprotein E and atherosclerosis: *Current Opinion in Lipidology*, 11(3), 243-251. <https://doi.org/10.1097/00041433-200006000-00004>
- D'Agostino, R. B., Vasan, R. S., Pencina, M. J., Wolf, P. A., Cobain, M., Massaro, J. M., & Kannel, W. B. (2008). General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care : The Framingham Heart Study. *Circulation*, 117(6), 743-753.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.699579>
- Dalen, J. E., Alpert, J. S., Goldberg, R. J., & Weinstein, R. S. (2014). The Epidemic of the 20th Century : Coronary Heart Disease. *The American Journal of Medicine*, 127(9), 807-812.  
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2014.04.015>
- Dash, S., Xiao, C., Morgantini, C., & Lewis, G. F. (2015). New Insights into the Regulation of Chylomicron Production. *Annual Review of Nutrition*, 35(1), 265-294.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071714-034338>
- Davis, R. A., & Hui, T. Y. (2001). 2000 George Lyman Duff Memorial Lecture : Atherosclerosis Is a Liver Disease of the Heart. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(6), 887-898. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.21.6.887>
- Decano, J. L., Viereck, J. C., McKee, A. C., Hamilton, J. A., Ruiz-Opazo, N., & Herrera, V. L. M. (2009). Early-Life Sodium Exposure Unmasks Susceptibility to Stroke in Hyperlipidemic, Hypertensive Heterozygous Tg25 Rats Transgenic for Human Cholesteryl Ester Transfer Protein. *Circulation*, 119(11), 1501-1509.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.833327>
- del Bas, J. M., Crescenti, A., Arola-Arnal, A., Oms-Oliu, G., Arola, L., & Caimari, A. (2015). Intake of grape procyanidins during gestation and lactation impairs reverse cholesterol

transport and increases atherogenic risk indexes in adult offspring. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(12), 1670-1677.

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.08.015>

de Paula Simino, L. A., de Fante, T., Figueiredo Fontana, M., Oliveira Borges, F., Torsoni, M. A., Milanski, M., Velloso, L. A., & Souza Torsoni, A. (2017). Lipid overload during gestation and lactation can independently alter lipid homeostasis in offspring and promote metabolic impairment after new challenge to high-fat diet. *Nutrition & Metabolism*, 14(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12986-017-0168-4>

de Winther, M. P. J., & Hofker, M. H. (2000). Scavenging new insights into atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 105(8), 1039-1041. <https://doi.org/10.1172/JCI9919>

Dolinoy, D. C., Weidman, J. R., Waterland, R. A., & Jirtle, R. L. (2006). Maternal Genistein Alters Coat Color and Protects *A<sup>y</sup>* Mouse Offspring from Obesity by Modifying the Fetal Epigenome. *Environmental Health Perspectives*, 114(4), 567-572. <https://doi.org/10.1289/ehp.8700>

Dong, L. M., Wilson, C., Wardell, M. R., Simmons, T., Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., & Agard, D. A. (1994). Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 269(35), 22358-22365. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31797-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31797-0)

Dong, Z. M., Chapman, S. M., Brown, A. A., Frenette, P. S., Hynes, R. O., & Wagner, D. D. (1998). The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 102(1), 145-152. <https://doi.org/10.1172/JCI3001>

Dumolt, J. H., Browne, R. W., Patel, M. S., & Rideout, T. C. (2019). Malprogramming of Hepatic Lipid Metabolism due to Excessive Early Cholesterol Exposure in Adult Progeny.

*Molecular Nutrition & Food Research*, 63(2), 1800563.

<https://doi.org/10.1002/mnfr.201800563>

Dumolt, J. H., Ma, M., Mathew, J., Patel, M. S., & Rideout, T. C. (2019a). Gestational hypercholesterolemia alters fetal hepatic lipid metabolism and microRNA expression in Apo-E-deficient mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 317(5), E831-E838. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00138.2019>

Dumolt, J. H., Ma, M., Mathew, J., Patel, M. S., & Rideout, T. C. (2019b). Gestational hypercholesterolemia alters fetal hepatic lipid metabolism and microRNA expression in Apo-E-deficient mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 317(5), E831-E838. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00138.2019>

Edison, R. J., & Muenke, M. (2005). Gestational Exposure to Lovastatin Followed by Cardiac Malformation Misclassified as Holoprosencephaly. *New England Journal of Medicine*, 352(26), 2759-2759. <https://doi.org/10.1056/NEJM200506303522622>

Effects of Long-term Vitamin E Supplementation on Cardiovascular Events and Cancer : A Randomized Controlled Trial. (2005). *JAMA*, 293(11), 1338. <https://doi.org/10.1001/jama.293.11.1338>

Eken, S. M., Jin, H., Chernogubova, E., Li, Y., Simon, N., Sun, C., Korzunowicz, G., Busch, A., Bäcklund, A., Österholm, C., Razuvaev, A., Renné, T., Eckstein, H. H., Pelisek, J., Eriksson, P., González Díez, M., Perisic Matic, L., Schellinger, I. N., Raaz, U., ... Maegdefessel, L. (2017). MicroRNA-210 Enhances Fibrous Cap Stability in Advanced Atherosclerotic Lesions. *Circulation Research*, 120(4), 633-644. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309318>

Elahi, M. M., Cagampang, F. R., Anthony, F. W., Curzen, N., Ohri, S. K., & Hanson, M. A. (2008). Statin Treatment in Hypercholesterolemic Pregnant Mice Reduces Cardiovascular Risk

- Factors in Their Offspring. *Hypertension*, 51(4), 939-944.  
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.100982>
- Emini Veseli, B., Perrotta, P., De Meyer, G. R. A., Roth, L., Van der Donckt, C., Martinet, W., & De Meyer, G. R. Y. (2017). Animal models of atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology*, 816, 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.010>
- Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., Yu, X. X., Pandey, S. K., Pear, M., Watts, L., Booten, S. L., Graham, M., McKay, R., Subramaniam, A., Propp, S., Lollo, B. A., Freier, S., Bennett, C. F., Bhanot, S., & Monia, B. P. (2006). MiR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metabolism*, 3(2), 87-98.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.005>
- Ethier-Chiasson, M., Duchesne, A., Forest, J.-C., Giguère, Y., Masse, A., Mounier, C., & Lafond, J. (2007). Influence of maternal lipid profile on placental protein expression of LDLr and SR-BI. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359(1), 8-14.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.002>
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. (2001). Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 285(19), 2486-2497. <https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>
- Fall, C. H. D., Yajnik, C. S., Rao, S., Davies, A. A., Brown, N., & Farrant, H. J. W. (2003). Micronutrients and Fetal Growth. *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1747S-1756S.  
<https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1747S>
- Feinberg, M. W., & Moore, K. J. (2016). MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), 703-720. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306300>



- Feingold, K. R. (2021). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In *Endotext [Internet]*. MDText.com, Inc. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>
- Finking, G., & Hanke, H. (1997). Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885–1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis*, *135*(1), 1-7. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(97\)00161-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(97)00161-5)
- Flood, C., Gustafsson, M., Pitas, R. E., Arnaboldi, L., Walzem, R. L., & Borén, J. (2004). Molecular Mechanism for Changes in Proteoglycan Binding on Compositional Changes of the Core and the Surface of Low-Density Lipoprotein–Containing Human Apolipoprotein B100. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*(3), 564-570. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000117174.19078.85>
- Forman, B. M., Goode, E., Chen, J., Oro, A. E., Bradley, D. J., Perlmann, T., Noonan, D. J., Burka, L. T., McMorris, T., Lamph, W. W., Evans, R. M., & Weinberger, C. (1995). Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*, *81*(5), 687-693. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90530-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90530-8)
- Fredrickson, D. S. (1971). An International Classification of Hyperlipidemias and Hyperlipoproteinemias. *Annals of Internal Medicine*, *75*(3), 471. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-75-3-471>
- Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, *19*(1), 92-105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Furuhashi, M., Seo, H., Mizutani, S., Narita, O., Tomoda, Y., & Matsui, N. (1989). Expression of Low Density Lipoprotein Receptor Gene in Human Placenta during Pregnancy. *Molecular Endocrinology*, *3*(8), 1252-1256. <https://doi.org/10.1210/mend-3-8-1252>

- Gajzlerska-Majewska, W., Bomba-Opon, D. A., & Wielgos, M. (2018). Is pravastatin a milestone in the prevention and treatment of preeclampsia? *Journal of Perinatal Medicine*, *46*(8), 825-831. <https://doi.org/10.1515/jpm-2017-0109>
- Galli, F., Azzi, A., Birringer, M., Cook-Mills, J. M., Eggersdorfer, M., Frank, J., Cruciani, G., Lorkowski, S., & Özer, N. K. (2017). Vitamin E : Emerging aspects and new directions. *Free Radical Biology and Medicine*, *102*, 16-36. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.017>
- Garg, A., & Lee, J. C.-Y. (2022). Vitamin E : Where Are We Now in Vascular Diseases? *Life*, *12*(2), 310. <https://doi.org/10.3390/life12020310>
- Gerin, I., Clerbaux, L.-A., Haumont, O., Lanthier, N., Das, A. K., Burant, C. F., Leclercq, I. A., MacDougald, O. A., & Bommer, G. T. (2010). Expression of miR-33 from an SREBP2 Intron Inhibits Cholesterol Export and Fatty Acid Oxidation\*. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(44), 33652-33661. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.152090>
- Getz, G. S., & Reardon, C. A. (2006). Diet and Murine Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *26*(2), 242-249. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000201071.49029.17>
- Getz, G. S., & Reardon, C. A. (2009). Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *Journal of Lipid Research*, *50*, S156-S161. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800058-JLR200>
- Getz, G. S., & Reardon, C. A. (2012). Animal Models of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *32*(5), 1104-1115. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.237693>
- Glagov, S., Weisenberg, E., Zarins, C. K., Stankunavicius, R., & Kolettis, G. J. (1987). Compensatory Enlargement of Human Atherosclerotic Coronary Arteries. *New*

*England Journal of Medicine*, 316(22), 1371-1375.

<https://doi.org/10.1056/NEJM198705283162204>

Glueck, C. J. (1986). Pediatric Primary Prevention of Atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*, 314(3), 175-177. <https://doi.org/10.1056/NEJM198601163140309>

Glynn, R. J., Ridker, P. M., Goldhaber, S. Z., Zee, R. Y. L., & Buring, J. E. (2007). Effects of Random Allocation to Vitamin E Supplementation on the Occurrence of Venous Thromboembolism : Report From the Women's Health Study. *Circulation*, 116(13), 1497-1503. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.716407>

Goedeke, L., Vales-Lara, F. M., Fenstermaker, M., Cirera-Salinas, D., Chamorro-Jorganes, A., Ramírez, C. M., Mattison, J. A., de Cabo, R., Suárez, Y., & Fernández-Hernando, C. (2013). A Regulatory Role for MicroRNA 33\* in Controlling Lipid Metabolism Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology*, 33(11), 2339-2352. <https://doi.org/10.1128/MCB.01714-12>

Goharkhay, N., Sbrana, E., Gamble, P. K., Tamayo, E. H., Betancourt, A., Villarreal, K., Hankins, G. D. V., Saade, G. R., & Longo, M. (2007). Characterization of a murine model of fetal programming of atherosclerosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 197(4), 416.e1-416.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.08.002>

Goldberg, A. C., Hopkins, P. N., Toth, P. P., Ballantyne, C. M., Rader, D. J., Robinson, J. G., Daniels, S. R., Gidding, S. S., de Ferranti, S. D., Ito, M. K., McGowan, M. P., Moriarty, P. M., Cromwell, W. C., Ross, J. L., & Ziajka, P. E. (2011). Familial Hypercholesterolemia : Screening, diagnosis and management of pediatric and adult patients. *Journal of Clinical Lipidology*, 5(3), S1-S8. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2011.04.003>

Goodwin, B., Jones, S. A., Price, R. R., Watson, M. A., McKee, D. D., Moore, L. B., Galardi, C., Wilson, J. G., Lewis, M. C., Roth, M. E., Maloney, P. R., Willson, T. M., & Kliewer, S. A.

- (2000). A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 Represses Bile Acid Biosynthesis. *Molecular Cell*, 6(3), 517-526. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00051-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00051-4)
- Gordon, D. J., Knoke, J., Probstfield, J. L., Superko, R., & Tyroler, H. A. (1986). High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease in hypercholesterolemic men : The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *Circulation*, 74(6), 1217-1225. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.74.6.1217>
- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., & Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308), 835-840. <https://doi.org/10.1038/nature09267>
- Handelsman, Y., & Lepor, N. E. (2018). PCSK9 Inhibitors in Lipid Management of Patients With Diabetes Mellitus and High Cardiovascular Risk : A Review. *Journal of the American Heart Association*, 7(13), e008953. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.008953>
- Hanniman, E. A., Lambert, G., McCarthy, T. C., & Sinal, C. J. (2005). Loss of functional farnesoid X receptor increases atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Lipid Research*, 46(12), 2595-2604. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500390-JLR200>
- Hazell, L. J., Arnold, L., Flowers, D., Waeg, G., Malle, E., & Stocker, R. (1996). Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions. *The Journal of Clinical Investigation*, 97(6), 1535-1544. <https://doi.org/10.1172/JCI118576>
- Hennig, B. (1988). Lipid peroxidation and endothelial cell injury : Implications in atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 4(2), 99-106. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(88\)90070-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90070-6)
- Honda, A., Miyazaki, T., Iwamoto, J., Hirayama, T., Morishita, Y., Monma, T., Ueda, H., Mizuno, S., Sugiyama, F., Takahashi, S., & Ikegami, T. (2020). Regulation of bile acid metabolism

- in mouse models with hydrophobic bile acid composition. *Journal of Lipid Research*, 61(1), 54-69. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA119000395>
- Hsu, S., Wang, B., Kota, J., Yu, J., Costinean, S., Kutay, H., Yu, L., Bai, S., La Perle, K., Chivukula, R. R., Mao, H., Wei, M., Clark, K. R., Mendell, J. R., Caligiuri, M. A., Jacob, S. T., Mendell, J. T., & Ghoshal, K. (2012). Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *Journal of Clinical Investigation*, 122(8), 2871-2883. <https://doi.org/10.1172/JCI63539>
- Hulsmans, M., Keyzer, D. D., & Holvoet, P. (2011). MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. *The FASEB Journal*, 25(8), 2515-2527. <https://doi.org/10.1096/fj.11-181149>
- Hunter, S. C., & Cahoon, E. B. (2007). Enhancing Vitamin E in Oilseeds : Unraveling Tocopherol and Tocotrienol Biosynthesis. *Lipids*, 42(2), 97-108. <https://doi.org/10.1007/s11745-007-3028-6>
- Ibrahim, M. A., Asuka, E., & Jialal, I. (2022). Hypercholesterolemia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459188/>
- Ikari, Y., McManus, B. M., Kenyon, J., & Schwartz, S. M. (1999). Neonatal Intima Formation in the Human Coronary Artery. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(9), 2036-2040. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.9.2036>
- Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C. L., McDonald, J. G., Luo, G., Jones, S. A., Goodwin, B., Richardson, J. A., Gerard, R. D., Repa, J. J., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metabolism*, 2(4), 217-225. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.09.001>

- Ishibashi, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Gerard, R. D., Hammer, R. E., & Herz, J. (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *Journal of Clinical Investigation*, *92*(2), 883-893. <https://doi.org/10.1172/JCI116663>
- Ishibashi, S., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Herz, J., & Burns, D. K. (1994). Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *Journal of Clinical Investigation*, *93*(5), 1885-1893. <https://doi.org/10.1172/JCI117179>
- Ismail, N., Wang, Y., Dakhlallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T. D., Tridandapani, S., Paulaitis, M. E., Piper, M. G., & Marsh, C. B. (2013). Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*, *121*(6), 984-995. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374793>
- Iverius, P. H. (1972). The interaction between human plasma lipoproteins and connective tissue glycosaminoglycans. *The Journal of Biological Chemistry*, *247*(8), 2607-2613.
- Jawień, J., Nastalek, P., & Korbut, R. (2004). Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, *55*(3), 503-517.
- Jopling, C. (2012). Liver-specific microRNA-122 : Biogenesis and function. *RNA Biology*, *9*(2), 137-142. <https://doi.org/10.4161/rna.18827>
- Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L.-Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, *31*(7), 671-701. <https://doi.org/10.1007/BF02522884>
- Kamper, M., Mittermayer, F., Cabuk, R., Gelles, K., Ellinger, I., & Hermann, M. (2017). Estrogen-enhanced apical and basolateral secretion of apolipoprotein B-100 by polarized

- trophoblast-derived BeWo cells. *Biochimie*, 138, 116-123.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.05.006>
- Kannel, W. B. (1961). Factors of Risk in the Development of Coronary Heart Disease—Six-Year Follow-up Experience : The Framingham Study. *Annals of Internal Medicine*, 55(1), 33.  
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-55-1-33>
- Karalis, D. G., Hill, A. N., Clifton, S., & Wild, R. A. (2016). The risks of statin use in pregnancy : A systematic review. *Journal of Clinical Lipidology*, 10(5), 1081-1090.  
<https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.07.002>
- Keene, D., Price, C., Shun-Shin, M. J., & Francis, D. P. (2014). Effect on cardiovascular risk of high density lipoprotein targeted drug treatments niacin, fibrates, and CETP inhibitors : Meta-analysis of randomised controlled trials including 117 411 patients. *BMJ*, 349(jul18 2), g4379-g4379. <https://doi.org/10.1136/bmj.g4379>
- Khan, I., Dekou, V., Hanson, M., Poston, L., & Taylor, P. (2004). Predictive Adaptive Responses to Maternal High-Fat Diet Prevent Endothelial Dysfunction but Not Hypertension in Adult Rat Offspring. *Circulation*, 110(9), 1097-1102.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000139843.05436.A0>
- Khera, A. V., Emdin, C. A., Drake, I., Natarajan, P., Bick, A. G., Cook, N. R., Chasman, D. I., Baber, U., Mehran, R., Rader, D. J., Fuster, V., Boerwinkle, E., Melander, O., Orho-Melander, M., Ridker, P. M., & Kathiresan, S. (2016). Genetic Risk, Adherence to a Healthy Lifestyle, and Coronary Disease. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2349-2358. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1605086>
- Knekt, P., Reunanen, A., Jävinen, R., Seppänen, R., Heliövaara, M., & Aromaa, A. (1994). Antioxidant Vitamin Intake and Coronary Mortality in a Longitudinal Population Study.

- American Journal of Epidemiology*, 139(12), 1180-1189.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a116964>
- Knowles, J. W., & Maeda, N. (2000). Genetic Modifiers of Atherosclerosis in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(11), 2336-2345.  
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.11.2336>
- Koeth, R. A., Wang, Z., Levison, B. S., Buffa, J. A., Org, E., Sheehy, B. T., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., Li, L., Smith, J. D., DiDonato, J. A., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., Lewis, J. D., Warriar, M., Brown, J. M., Krauss, R. M., ... Hazen, S. L. (2013). Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine*, 19(5), 576-585. <https://doi.org/10.1038/nm.3145>
- Kontush, A. (2014). HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 103(3), 341-349. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu147>
- Kontush, A. (2020). HDL and Reverse Remnant-Cholesterol Transport (RRT) : Relevance to Cardiovascular Disease. *Trends in Molecular Medicine*, 26(12), 1086-1100.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.07.005>
- Kontush, A., Meyer, S., Finckh, B., Kohlschütter, A., & Beisiegel, U. (1996).  $\alpha$ -Tocopherol as a Reductant for Cu(II) in Human Lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 271(19), 11106-11112. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.19.11106>
- Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M., & Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, 438(7068), 685-689.  
<https://doi.org/10.1038/nature04303>
- Kühn, H., Römisch, I., & Belkner, J. (2005). The role of lipoxygenase-isoforms in atherogenesis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(11), 1014-1029.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200500131>



- Kwan, B. C. H., Kronenberg, F., Beddhu, S., & Cheung, A. K. (2007). Lipoprotein Metabolism and Lipid Management in Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, *18*(4), 1246-1261. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006091006>
- Landthaler, M., Yalcin, A., & Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Current Biology: CB*, *14*(23), 2162-2167. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.11.001>
- Langer, C., Huang, Y., Cullen, P., Wiesenhütter, B., Mahley, R. W., Assmann, G., & von Eckardstein, A. (2000). Endogenous apolipoprotein E modulates cholesterol efflux and cholesteryl ester hydrolysis mediated by high-density lipoprotein-3 and lipid-free apolipoproteins in mouse peritoneal macrophages. *Journal of Molecular Medicine*, *78*(4), 217-227. <https://doi.org/10.1007/s001090000096>
- Leiva, A., de Medina, C. D., Salsoso, R., Sáez, T., San Martín, S., Abarzúa, F., Farías, M., Guzmán-Gutiérrez, E., Pardo, F., & Sobrevia, L. (2013). Maternal Hypercholesterolemia in Pregnancy Associates With Umbilical Vein Endothelial Dysfunction : Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Arginase II. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *33*(10), 2444-2453. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301987>
- Leiva, A., Salsoso, R., Sáez, T., Sanhueza, C., Pardo, F., & Sobrevia, L. (2015). Cross-sectional and longitudinal lipid determination studies in pregnant women reveal an association between increased maternal LDL cholesterol concentrations and reduced human umbilical vein relaxation. *Placenta*, *36*(8), 895-902. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.05.012>
- Levitan, I., Volkov, S., & Subbaiah, P. V. (2010). Oxidized LDL : Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling*, *13*(1), 39-75. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2733>

- Li, J.-J., & Fang, C.-H. (2004). Atheroscleritis is a more rational term for the pathological entity currently known as atherosclerosis. *Medical Hypotheses*, 63(1), 100-102. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.01.029>
- Li, K., Ching, D., Luk, F. S., & Raffai, R. L. (2015). Apolipoprotein E Enhances MicroRNA-146a in Monocytes and Macrophages to Suppress Nuclear Factor- $\kappa$ B–Driven Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation Research*, 117(1). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305844>
- Li, R., Jia, Z., & Trush, M. A. (2016). Defining ROS in Biology and Medicine. *Reactive Oxygen Species (Apex, N.C.)*, 1(1), 9-21. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.803>
- Libby, P., Egan, D., & Skarlatos, S. (1997). Roles of Infectious Agents in Atherosclerosis and Restenosis : An Assessment of the Evidence and Need for Future Research. *Circulation*, 96(11), 4095-4103. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.11.4095>
- Liebler, D. C., Kling, D. S., & Reed, D. J. (1986). Antioxidant protection of phospholipid bilayers by alpha-tocopherol. Control of alpha-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(26), 12114-12119.
- Liguori, A., D'Armiento, F., Palagiano, A., Balestrieri, M., Williams-Ignarro, S., De Nigris, F., Lerman, L., D'Amora, M., Rienzo, M., Fiorito, C., Ignarro, L., Palinski, W., & Napoli, C. (2007). Effect of gestational hypercholesterolaemia on omental vasoreactivity, placental enzyme activity and transplacental passage of normal and oxidised fatty acids. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 114(12), 1547-1556. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2007.01510.x>

- Lim, Y., & Traber, M. G. (2007). Alpha-Tocopherol Transfer Protein (alpha-TTP) : Insights from Alpha-Tocopherol Transfer Protein Knockout Mice. *Nutrition Research and Practice*, 1(4), 247-253. <https://doi.org/10.4162/nrp.2007.1.4.247>
- Linton, M. F., Hasty, A. H., Babaev, V. R., & Fazio, S. (1998). Hepatic apo E expression is required for remnant lipoprotein clearance in the absence of the low density lipoprotein receptor. *Journal of Clinical Investigation*, 101(8), 1726-1736. <https://doi.org/10.1172/JCI2181>
- Madsen, C. M., Varbo, A., & Nordestgaard, B. G. (2017). Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women : Two prospective cohort studies. *European Heart Journal*, 38(32), 2478-2486. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx163>
- Major Lipids, Apolipoproteins, and Risk of Vascular Disease. (2009). *JAMA*, 302(18), 1993. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1619>
- Malle, E., Waeg, G., Schreiber, R., Gröne, E. F., Sattler, W., & Gröne, H.-J. (2000). Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/halide system in human atherosclerotic lesions : Colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins. *European Journal of Biochemistry*, 267(14), 4495-4503. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01498.x>
- Marnett, L. J., Riggins, J. N., & West, J. D. (2003). Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *Journal of Clinical Investigation*, 111(5), 583-593. <https://doi.org/10.1172/JCI200318022>
- Marques, L. R., Diniz, T. A., Antunes, B. M., Rossi, F. E., Caperuto, E. C., Lira, F. S., & Gonçalves, D. C. (2018). Reverse Cholesterol Transport : Molecular Mechanisms and the Non-

- medical Approach to Enhance HDL Cholesterol. *Frontiers in Physiology*, 9, 526.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00526>
- McNally, J. S., Davis, M. E., Giddens, D. P., Saha, A., Hwang, J., Dikalov, S., Jo, H., & Harrison, D. G. (2003). Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 285(6), H2290-H2297.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00515.2003>
- Mendelson, M. M., Lyass, A., O'Donnell, C. J., D'Agostino, R. B., & Levy, D. (2016). Association of Maternal Prepregnancy Dyslipidemia With Adult Offspring Dyslipidemia in Excess of Anthropometric, Lifestyle, and Genetic Factors in the Framingham Heart Study. *JAMA Cardiology*, 1(1), 26. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2015.0304>
- Meydani, M. (2001). Vitamin E and Atherosclerosis : Beyond Prevention of LDL Oxidation. *The Journal of Nutrition*, 131(2), 366S-368S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.2.366S>
- Miyata, M., & Smith, J. D. (1996). Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and  $\beta$ -amyloid peptides. *Nature Genetics*, 14(1), 55-61. <https://doi.org/10.1038/ng0996-55>
- Moussa, Z., M.A. Judeh, Z., & A. Ahmed, S. (2020). Nonenzymatic Exogenous and Endogenous Antioxidants. In K. Das, S. Das, M. Shivanagouda Biradar, V. Bobbarala, & S. Subba Tata (Éds.), *Free Radical Medicine and Biology*. IntechOpen.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.87778>
- Moutinho, C., & Esteller, M. (2017). MicroRNAs and Epigenetics. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 135, p. 189-220). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.06.003>

- Mukai, Y., Sun, Y., & Sato, S. (2013). Azuki bean polyphenols intake during lactation upregulate AMPK in male rat offspring exposed to fetal malnutrition. *Nutrition*, *29*(1), 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.06.005>
- Munné-Bosch, S., & Alegre, L. (2002). The Function of Tocopherols and Tocotrienols in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *21*(1), 31-57. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044179>
- Murphy, W. A., Nedden, D. zur, Gostner, P., Knapp, R., Recheis, W., & Seidler, H. (2003). The Iceman : Discovery and Imaging. *Radiology*, *226*(3), 614-629. <https://doi.org/10.1148/radiol.2263020338>
- Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., & Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*, *14*(1), 133-140. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.14.1.133>
- Nakashima, Y., Raines, E. W., Plump, A. S., Breslow, J. L., & Ross, R. (1998). Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at Atherosclerosis-Prone Sites on the Endothelium in the ApoE-Deficient Mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *18*(5), 842-851. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.18.5.842>
- Napoli, C. (2001). Maternal hypercholesterolemia during pregnancy influences the later development of atherosclerosis : Clinical and pathogenic implications. *European Heart Journal*, *22*(1), 4-9. <https://doi.org/10.1053/euhj.2000.2147>
- Napoli, C., D'Armiento, F. P., Mancini, F. P., Postiglione, A., Witztum, J. L., Palumbo, G., & Palinski, W. (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic

- lesions. *Journal of Clinical Investigation*, 100(11), 2680-2690.  
<https://doi.org/10.1172/JCI119813>
- Napoli, C., de Nigris, F., Welch, J. S., Calara, F. B., Stuart, R. O., Glass, C. K., & Palinski, W. (2002). Maternal Hypercholesterolemia During Pregnancy Promotes Early Atherogenesis in LDL Receptor-Deficient Mice and Alters Aortic Gene Expression Determined by Microarray. *Circulation*, 105(11), 1360-1367.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000013090.96919.FA>
- Napoli, C., Glass, C. K., Witztum, J. L., Deutsch, R., D'Armiento, F. P., & Palinski, W. (1999). Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood : Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *The Lancet*, 354(9186), 1234-1241. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)02131-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)02131-5)
- Napoli, C., Witztum, J. L., Calara, F., de Nigris, F., & Palinski, W. (2000). Maternal Hypercholesterolemia Enhances Atherogenesis in Normocholesterolemic Rabbits, Which Is Inhibited by Antioxidant or Lipid-Lowering Intervention During Pregnancy : An Experimental Model of Atherogenic Mechanisms in Human Fetuses. *Circulation Research*, 87(10), 946-952. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.10.946>
- Napoli, C., Witztum, J. L., de Nigris, F., Palumbo, G., D'Armiento, F. P., & Palinski, W. (1999). Intracranial Arteries of Human Fetuses Are More Resistant to Hypercholesterolemia-Induced Fatty Streak Formation Than Extracranial Arteries. *Circulation*, 99(15), 2003-2010. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.15.2003>
- Nikkilä, E. A., Taskinen, M. R., & Sane, T. (1987). Plasma high-density lipoprotein concentration and subfraction distribution in relation to triglyceride metabolism. *American Heart Journal*, 113(2 Pt 2), 543-548. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(87\)90629-6](https://doi.org/10.1016/0002-8703(87)90629-6)

- O. Apostolov, E., Ok, E., Burns, S., Nawaz, S., Savenka, A., V. Shah, S., & G. Basnakian, A. (2013). Carbamylated-Oxidized LDL : Proatherosclerotic Effects on Endothelial Cells and Macrophages. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 20(12), 878-892. <https://doi.org/10.5551/jat.14035>
- Ogura, M., Makino, H., Kamiya, C., Yoshimatsu, J., Soran, H., Eatough, R., Perrone, G., Harada-Shiba, M., & Stefanutti, C. (2016). Lipoprotein apheresis is essential for managing pregnancies in patients with homozygous familial hypercholesterolemia : Seven case series and discussion. *Atherosclerosis*, 254, 179-183. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.018>
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & Development*, 18(14), 1655-1666. <https://doi.org/10.1101/gad.1210204>
- Pagano, P. J., Ito, Y., Tornheim, K., Gallop, P. M., Tauber, A. I., & Cohen, R. A. (1995). An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 268(6), H2274-H2280. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.268.6.H2274>
- Paigen, B., Morrow, A., Brandon, C., Mitchell, D., & Holmes, P. (1985). Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*, 57(1), 65-73. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(85\)90138-8](https://doi.org/10.1016/0021-9150(85)90138-8)
- Palinski, W. (2009a). Maternal–Fetal Cholesterol Transport in the Placenta : Good, Bad, and Target for Modulation. *Circulation Research*, 104(5), 569-571. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.194191>

- Palinski, W. (2009b). Sodium Exposure Induces Stroke in a Genetically Susceptible Model : New Insights Into Early-Life Factors Modulating Adult Disease. *Circulation*, *119*(11), 1459-1462. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.849554>
- Palinski, W. (2014). Effect of Maternal Cardiovascular Conditions and Risk Factors on Offspring Cardiovascular Disease. *Circulation*, *129*(20), 2066-2077. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001805>
- Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients, Subcommittee on Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, & Institute of Medicine. (2000). *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids* (p. 9810). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/9810>
- Park, Y. M. (2014). CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Experimental & Molecular Medicine*, *46*(6), e99-e99. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.38>
- Piedrahita, J. A., Zhang, S. H., Hagan, J. R., Oliver, P. M., & Maeda, N. (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(10), 4471-4475. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4471>
- Pitkin, R. M., Connor, W. E., & Lin, D. S. (1972). Cholesterol metabolism and placental transfer in the pregnant Rhesus monkey. *The Journal of Clinical Investigation*, *51*(10), 2584-2592. <https://doi.org/10.1172/JCI107075>
- Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M., & Breslow, J. L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in



- apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71(2), 343-353. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90362-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90362-G)
- Poranena, A.-K., Ekblad, U., Uotila, P., & Ahotupa, M. (1996). Lipid peroxidation and antioxidants in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta*, 17(7), 401-405. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(96\)90021-1](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(96)90021-1)
- Proctor & L. Mamo. (1998). Retention of fluorescent-labelled chylomicron remnants within the intima of the arterial wall - evidence that plaque cholesterol may be derived from post-prandial lipoproteins : Arterial retention of fluorescent post-prandial remnants. *European Journal of Clinical Investigation*, 28(6), 497-503. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.1998.00317.x>
- Rajagopalan, S., Kurz, S., Münzel, T., Tarpey, M., Freeman, B. A., Griending, 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. *Journal of Clinical Investigation*, 97(8), 1916-1923. <https://doi.org/10.1172/JCI118623>
- Rayner, K. J., Esau, C. C., Hussain, F. N., McDaniel, A. L., Marshall, S. M., van Gils, J. M., Ray, T. D., Sheedy, F. J., Goedeke, L., Liu, X., Khatsenko, O. G., Kaimal, V., Lees, C. J., Fernandez-Hernando, C., Fisher, E. A., Temel, R. E., & Moore, K. J. (2011). Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature*, 478(7369), 404-407. <https://doi.org/10.1038/nature10486>
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal*, 22(3), 659-661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>

- Reaven, P. D., Khouw, A., Beltz, W. F., Parthasarathy, S., & Witztum, J. L. (1993). Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by beta-carotene. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*, 13(4), 590-600. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.13.4.590>
- Reddick, R. L., Zhang, S. H., & Maeda, N. (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*, 14(1), 141-147. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.14.1.141>
- Resende, A. C., Emiliano, A. F., Cordeiro, V. S. C., de Bem, G. F., de Cavalho, L. C. R. M., de Oliveira, P. R. B., Neto, M. L., Costa, C. A., Boaventura, G. T., & de Moura, R. S. (2013). Grape skin extract protects against programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal high-fat diet during lactation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(12), 2119-2126. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.08.003>
- Rhodin, J. A. G. (1968). Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules, and small collecting veins. *Journal of Ultrastructure Research*, 25(5-6), 452-500. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(68\)80098-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(68)80098-X)
- Rob, C. (1960). Surgical Treatment of Atherosclerosis. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 53(1), 38-40. <https://doi.org/10.1177/003591576005300112>
- Roberg-Larsen, H., Strand, M. F., Krauss, S., & Wilson, S. R. (2014). Metabolites in vertebrate Hedgehog signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(3), 669-674. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.087>
- Rosenblat, M., Coleman, R., & Aviram, M. (2002). Increased macrophage glutathione content reduces cell-mediated oxidation of LDL and atherosclerosis in apolipoprotein E-

- deficient mice. *Atherosclerosis*, 163(1), 17-28. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(01\)00744-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(01)00744-4)
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis—An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*, 340(2), 115-126. <https://doi.org/10.1056/NEJM199901143400207>
- Rumbold, A., Duley, L., Crowther, C. A., & Haslam, R. R. (2008). Antioxidants for preventing pre-eclampsia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004227.pub3>
- Sanllorente, A., Lassale, C., Soria-Florido, M. T., Castañer, O., Fitó, M., & Hernáez, Á. (2021). Modification of High-Density Lipoprotein Functions by Diet and Other Lifestyle Changes : A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Journal of Clinical Medicine*, 10(24), 5897. <https://doi.org/10.3390/jcm10245897>
- Scaldaferri, F., Pizzoferrato, M., Ponziani, F. R., Gasbarrini, G., & Gasbarrini, A. (2013). Use and indications of cholestyramine and bile acid sequestrants. *Internal and Emergency Medicine*, 8(3), 205-210. <https://doi.org/10.1007/s11739-011-0653-0>
- Schaftenaar, F., Frodermann, V., Kuiper, J., & Lutgens, E. (2016). Atherosclerosis : The interplay between lipids and immune cells. *Current Opinion in Lipidology*, 27(3), 209-215. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000302>
- Schwartz, S. M., Galis, Z. S., Rosenfeld, M. E., & Falk, E. (2007). Plaque Rupture in Humans and Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(4), 705-713. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000261709.34878.20>
- Sehayek, E., Shefer, S., Nguyen, L. B., Ono, J. G., Merkel, M., & Breslow, J. L. (2000). Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion : Studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice. *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences*, 97(7), 3433-3437.

<https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3433>

Sesso, H. D. (2008). Vitamins E and C in the Prevention of Cardiovascular Disease in Men : The Physicians' Health Study II Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 300(18), 2123.

<https://doi.org/10.1001/jama.2008.600>

Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P. V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El Rayess, Y., Beyrouthy, M. E., Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., ... Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants : Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*, 11, 694.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>

Shattock, S. G. (1909). A Report upon the Pathological Condition of the Aorta of King Menephtah, Traditionally Regarded as the Pharaoh of the Exodus. *Proceedings of the*

*Royal Society of Medicine*, 2(Pathol\_Sect), 122-127.

<https://doi.org/10.1177/003591570900201110>

Shepherd, J., Packard, C. J., Bicker, S., Lawrie, T. D. V., & Morgan, H. G. (1980). Cholestyramine Promotes Receptor-Mediated Low-Density-Lipoprotein Catabolism. *New England*

*Journal of Medicine*, 302(22), 1219-1222.

<https://doi.org/10.1056/NEJM198005293022202>

Shepherd, J., Packard, C. J., Gemmell Morgan, H., Third, J. L. H. C., Stewart, J. M., & Veitch Lawrie, T. D. (1979). The effects of cholestyramine on high density lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis*, 33(4), 433-444. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(79\)90036-4](https://doi.org/10.1016/0021-9150(79)90036-4)

- Singh, S., de Ronde, M. W. J., Kok, M. G. M., Beijk, M. A., De Winter, R. J., van der Wal, A. C., Sondermeijer, B. M., Meijers, J. C. M., Creemers, E. E., & Pinto-Sietsma, S.-J. (2020). MiR-223-3p and miR-122-5p as circulating biomarkers for plaque instability. *Open Heart*, 7(1), e001223. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2019-001223>
- Soh, J., Iqbal, J., Queiroz, J., Fernandez-Hernando, C., & Hussain, M. M. (2013). MicroRNA-30c reduces hyperlipidemia and atherosclerosis in mice by decreasing lipid synthesis and lipoprotein secretion. *Nature Medicine*, 19(7), 892-900. <https://doi.org/10.1038/nm.3200>
- Stamler, J., Wentworth, D., & Neaton, J. D. (1986). Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA*, 256(20), 2823-2828.
- Stampfer, M. J. (1993). Vitamin E Consumption and the Risk of Coronary Disease in Women: *The Nurse Practitioner*, 18(7), 7. <https://doi.org/10.1097/00006205-199307000-00001>
- Stancu, C., & Sima, A. (2001). Statins : Mechanism of action and effects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 5(4), 378-387. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2001.tb00172.x>
- Sary, H. C. (1989). Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, 9(1 Suppl), I19-I32. MEDLINE.
- Stefulj, J., Panzenboeck, U., Becker, T., Hirschmugl, B., Schweinzer, C., Lang, I., Marsche, G., Sadjak, A., Lang, U., Desoye, G., & Wadsack, C. (2009). Human Endothelial Cells of the Placental Barrier Efficiently Deliver Cholesterol to the Fetal Circulation via ABCA1 and ABCG1. *Circulation Research*, 104(5), 600-608. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.185066>

- Steinberg, D. (2009). The LDL modification hypothesis of atherogenesis : An update. *Journal of Lipid Research*, 50, S376-S381. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800087-JLR200>
- Steinl, D., & Kaufmann, B. (2015). Ultrasound Imaging for Risk Assessment in Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 9749-9769. <https://doi.org/10.3390/ijms16059749>
- Stocker, R., & Keaney, J. F. (2004). Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiological Reviews*, 84(4), 1381-1478. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2003>
- Strong, J. P. (1999). Prevalence and Extent of Atherosclerosis in Adolescents and Young Adults Implications for Prevention From the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study. *JAMA*, 281(8), 727. <https://doi.org/10.1001/jama.281.8.727>
- Strong, J. P., Malcom, G. T., Newman, W. P., & Oalman, M. C. (1992). Early Lesions of Atherosclerosis in Childhood and Youth : Natural History and Risk Factors. *Journal of the American College of Nutrition*, 11(sup1), 51S-54S. <https://doi.org/10.1080/07315724.1992.10737984>
- Tabas, I., Williams, K. J., & Borén, J. (2007). Subendothelial Lipoprotein Retention as the Initiating Process in Atherosclerosis : Update and Therapeutic Implications. *Circulation*, 116(16), 1832-1844. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890>
- Tabet, F., Vickers, K. C., Cuesta Torres, L. F., Wiese, C. B., Shoucri, B. M., Lambert, G., Catherinet, C., Prado-Lourenco, L., Levin, M. G., Thacker, S., Sethupathy, P., Barter, P. J., Remaley, A. T., & Rye, K.-A. (2014). HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nature Communications*, 5(1), 3292. <https://doi.org/10.1038/ncomms4292>

- Takahashi, S., Fukami, T., Masuo, Y., Brocker, C. N., Xie, C., Krausz, K. W., Wolf, C. R., Henderson, C. J., & Gonzalez, F. J. (2016). Cyp2c70 is responsible for the species difference in bile acid metabolism between mice and humans. *Journal of Lipid Research*, *57*(12), 2130-2137. <https://doi.org/10.1194/jlr.M071183>
- Tang, W. H. W., & Hazen, S. L. (2014). The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(10), 4204-4211. <https://doi.org/10.1172/JCI72331>
- Taylor, P. D., Khan, I. Y., Hanson, M. A., & Poston, L. (2004). Impaired EDHF-mediated vasodilatation in adult offspring of rats exposed to a fat-rich diet in pregnancy : EDHF in arteries from offspring of fat-fed dams. *The Journal of Physiology*, *558*(3), 943-951. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.018879>
- The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results : II. The Relationship of Reduction in Incidence of Coronary Heart Disease to Cholesterol Lowering. (1984). *JAMA*, *251*(3), 365. <https://doi.org/10.1001/jama.1984.03340270043026>
- Thomas, S. R., & Stocker, R. (2000). Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: *Free Radical Biology and Medicine*, *28*(12), 1795-1805. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00236-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00236-7)
- Thompson, R. C., Allam, A. H., Lombardi, G. P., Wann, L. S., Sutherland, M. L., Sutherland, J. D., Soliman, M. A.-T., Frohlich, B., Mininberg, D. T., Monge, J. M., Vallodolid, C. M., Cox, S. L., Abd el-Maksoud, G., Badr, I., Miyamoto, M. I., el-Halim Nur el-din, A., Narula, J., Finch, C. E., & Thomas, G. S. (2013). Atherosclerosis across 4000 years of human history : The Horus study of four ancient populations. *The Lancet*, *381*(9873), 1211-1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60598-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60598-X)

- Timmis, A., Townsend, N., Gale, C. P., Torbica, A., Lettino, M., Petersen, S. E., Mossialos, E. A., Maggioni, A. P., Kazakiewicz, D., May, H. T., De Smedt, D., Flather, M., Zuhlke, L., Beltrame, J. F., Huculeci, R., Tavazzi, L., Hindricks, G., Bax, J., Casadei, B., ... Bardinet, I. (2020). European Society of Cardiology : Cardiovascular Disease Statistics 2019. *European Heart Journal*, *41*(1), 12-85. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz859>
- Trauner, M., & Boyer, J. L. (2003). Bile Salt Transporters : Molecular Characterization, Function, and Regulation. *Physiological Reviews*, *83*(2), 633-671. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2002>
- Trauner, M., Claudel, T., Fickert, P., Moustafa, T., & Wagner, M. (2010). Bile Acids as Regulators of Hepatic Lipid and Glucose Metabolism. *Digestive Diseases*, *28*(1), 220-224. <https://doi.org/10.1159/000282091>
- Trenteseaux, C., Gaston, A., Aguesse, A., Poupeau, G., de Coppet, P., Andriantsitohaina, R., Laschet, J., Amarger, V., Krempf, M., Nobecourt-Dupuy, E., & Ouguerram, K. (2017). Perinatal Hypercholesterolemia Exacerbates Atherosclerosis Lesions in Offspring by Altering Metabolism of Trimethylamine-N-Oxide and Bile Acids. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *37*(11), 2053-2063. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309923>
- Upston, J. M., Terentis, A. C., & Stocker, R. (1999). Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins : Implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *13*(9), 977-994. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.9.977>
- van der Graaf, A., Vissers, M. N., Gaudet, D., Brisson, D., Sivapalaratnam, S., Roseboom, T. J., Jansen, A. C. M., Kastelein, J. J. P., & Hutten, B. A. (2010). Dyslipidemia of Mothers With Familial Hypercholesterolemia Deteriorates Lipids in Adult Offspring. *Arteriosclerosis*,



*Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(12), 2673-2677.

<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.209064>

Vardi, M., Levy, N. S., & Levy, A. P. (2013). Vitamin E in the prevention of cardiovascular disease : The importance of proper patient selection. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2307-2314. <https://doi.org/10.1194/jlr.R026641>

Versmissen, J., Botden, I. P. G., Huijgen, R., Oosterveer, D. M., Defesche, J. C., Heil, T. C., Muntz, A., Langendonk, J. G., Schinkel, A. F. L., Kastelein, J. J. P., & Sijbrands, E. J. G. (2011). Maternal inheritance of familial hypercholesterolemia caused by the V408M low-density lipoprotein receptor mutation increases mortality. *Atherosclerosis*, 219(2), 690-693. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.08.039>

Vickers, K. C., Landstreet, S. R., Levin, M. G., Shoucri, B. M., Toth, C. L., Taylor, R. C., Palmisano, B. T., Tabet, F., Cui, H. L., Rye, K.-A., Sethupathy, P., & Remaley, A. T. (2014). MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(40), 14518-14523. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215767111>

Vickers, K. C., Shoucri, B. M., Levin, M. G., Wu, H., Pearson, D. S., Osei-Hwedie, D., Collins, F. S., Remaley, A. T., & Sethupathy, P. (2013). MicroRNA-27b is a regulatory hub in lipid metabolism and is altered in dyslipidemia. *Hepatology*, 57(2), 533-542. <https://doi.org/10.1002/hep.25846>

Virani, S. S., Polsani, V. R., & Nambi, V. (2008). Novel markers of inflammation in atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*, 10(2), 164-170. <https://doi.org/10.1007/s11883-008-0024-0>

Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A., & Schwartz, S. M. (2000). Lessons From Sudden Coronary Death : A Comprehensive Morphological Classification Scheme for

- Atherosclerotic Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(5), 1262-1275. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.5.1262>
- Vitamin E Supplementation and Cardiovascular Events in High-Risk Patients. (2000). *The New England Journal of Medicine*.
- Vourakis, M., Mayer, G., & Rousseau, G. (2021). The Role of Gut Microbiota on Cholesterol Metabolism in Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8074. <https://doi.org/10.3390/ijms22158074>
- Wadsack, C., Hammer, A., Levak-Frank, S., Desoye, G., Kozarsky, K. F., Hirschmugl, B., Sattler, W., & Malle, E. (2003). Selective Cholesteryl Ester Uptake from High Density Lipoprotein by Human First Trimester and Term Villous Trophoblast Cells. *Placenta*, 24(2-3), 131-143. <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0912>
- Wagner, J., Riwanto, M., Besler, C., Knau, A., Fichtlscherer, S., Röxe, T., Zeiher, A. M., Landmesser, U., & Dimmeler, S. (2013). Characterization of Levels and Cellular Transfer of Circulating Lipoprotein-Bound MicroRNAs. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(6), 1392-1400. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300741>
- Wang, Z., Huang, Z., Lu, G., Lin, L., & Ferrari, M. (2009). Hypoxia during pregnancy in rats leads to early morphological changes of atherosclerosis in adult offspring. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 296(5), H1321-H1328. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00440.2008>
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Levison, B. S., DuGar, B., Feldstein, A. E., Britt, E. B., Fu, X., Chung, Y.-M., Wu, Y., Schauer, P., Smith, J. D., Allayee, H., Tang, W. H. W., DiDonato, J. A., Lusis, A. J., & Hazen, S. L. (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, 472(7341), 57-63. <https://doi.org/10.1038/nature09922>

- Watkins, A. J., & Fleming, T. P. (2009). Blastocyst environment and its influence on offspring cardiovascular health : The heart of the matter. *Journal of Anatomy*, 215(1), 52-59. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.01033.x>
- Wen, J., & Friedman, J. R. (2012). MiR-122 regulates hepatic lipid metabolism and tumor suppression. *Journal of Clinical Investigation*, 122(8), 2773-2776. <https://doi.org/10.1172/JCI63966>
- Wentzel, J. J., Corti, R., Fayad, Z. A., Wisdom, P., Macaluso, F., Winkelman, M. O., Fuster, V., & Badimon, J. J. (2005). Does shear stress modulate both plaque progression and regression in the thoracic aorta? *Journal of the American College of Cardiology*, 45(6), 846-854. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.12.026>
- Wild, R., Weedin, E. A., & Wilson, D. (2015). Dyslipidemia in Pregnancy. *Cardiology Clinics*, 33(2), 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2015.01.002>
- Wilson, P. W., Abbott, R. D., & Castelli, W. P. (1988). High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.*, 8(6), 737-741. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.8.6.737>
- Wilson, P. W. F., D'Agostino, R. B., Levy, D., Belanger, A. M., Silbershatz, H., & Kannel, W. B. (1998). Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. *Circulation*, 97(18), 1837-1847. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.18.1837>
- Witteaman, J. C., Grobbee, D. E., Kok, F. J., Hofman, A., & Valkenburg, H. A. (1989). Increased risk of atherosclerosis in women after the menopause. *BMJ*, 298(6674), 642-644. <https://doi.org/10.1136/bmj.298.6674.642>

- Witztum, J. L., & Steinberg, D. (1991). Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 88(6), 1785-1792. <https://doi.org/10.1172/JCI115499>
- Woollett, L. A. (2011). Review : Transport of maternal cholesterol to the fetal circulation. *Placenta*, 32, S218-S221. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.01.011>
- Yalcin, M., Kardesoglu, E., Aparci, M., Isilak, Z., Uz, O., Yiginer, O., Ozmen, N., Cingozbay, B. Y., Uzun, M., & Cebeci, B. S. (2012). Cardiovascular risk scores for coronary atherosclerosis. *Acta Cardiologica*, 67(5), 557-563. <https://doi.org/10.1080/AC.67.5.2174130>
- Yancey, P. G., Yu, H., Linton, M. F., & Fazio, S. (2007). A Pathway-Dependent on ApoE, ApoAI, and ABCA1 Determines Formation of Buoyant High-Density Lipoprotein by Macrophage Foam Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(5), 1123-1131. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.139592>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free Radical Lipid Peroxidation : Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944-5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Zadelaar, S., Kleemann, R., Verschuren, L., de Vries-Van der Weij, J., van der Hoorn, J., Princen, H. M., & Kooistra, T. (2007). Mouse Models for Atherosclerosis and Pharmaceutical Modifiers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(8), 1706-1721. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.142570>
- Zanoni, P., Khetarpal, S. A., Larach, D. B., Hancock-Cerutti, W. F., Millar, J. S., Cuchel, M., DerOhannessian, S., Kontush, A., Surendran, P., Saleheen, D., Trompet, S., Jukema, J. W., De Craen, A., Deloukas, P., Sattar, N., Ford, I., Packard, C., Majumder, A. al S., Alam, D. S., ... Zalloua, P. A. (2016). Rare variant in scavenger receptor BI raises HDL

- cholesterol and increases risk of coronary heart disease. *Science*, 351(6278), 1166-1171. <https://doi.org/10.1126/science.aad3517>
- Zhang, M., Wu, J.-F., Chen, W.-J., Tang, S.-L., Mo, Z.-C., Tang, Y.-Y., Li, Y., Wang, J.-L., Liu, X.-Y., Peng, J., Chen, K., He, P.-P., Lv, Y.-C., Ouyang, X.-P., Yao, F., Tang, D.-P., Cayabyab, F. S., Zhang, D.-W., Zheng, X.-L., ... Tang, C.-K. (2014). MicroRNA-27a/b regulates cellular cholesterol efflux, influx and esterification/hydrolysis in THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*, 234(1), 54-64. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.02.008>
- Zhang, M.-W., Shen, Y.-J., Shi, J., & Yu, J.-G. (2021). MiR-223-3p in Cardiovascular Diseases : A Biomarker and Potential Therapeutic Target. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7, 610561. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.610561>
- Zhang, Q., He, F., Kuruba, R., Gao, X., Wilson, A., Li, J., Billiar, T. R., Pitt, B. R., Xie, W., & Li, S. (2008). FXR-mediated regulation of angiotensin type 2 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*, 77(3), 560-569. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm068>
- Zhang, R., Dong, S., Ma, W., Cai, X., Le, Z., Xiao, R., Zhou, Q., & Yu, H. (2017). Modulation of cholesterol transport by maternal hypercholesterolemia in human full-term placenta. *PLOS ONE*, 12(2), e0171934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171934>
- Zhu, W., Gregory, J. C., Org, E., Buffa, J. A., Gupta, N., Wang, Z., Li, L., Fu, X., Wu, Y., Mehrabian, M., Sartor, R. B., McIntyre, T. M., Silverstein, R. L., Tang, W. H. W., DiDonato, J. A., Brown, J. M., Lusi, A. J., & Hazen, S. L. (2016). Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell*, 165(1), 111-124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.011>



**Titre :** Effet d'un traitement périnatal avec un hypocholestérolémiant (cholestyramine) et/ou un antioxydant (vitamine E) sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris déficientes en apoE

**Mots clés :** hypercholestérolémie génétique, périnatale, athérosclérose, cholestyramine, vitamine E.

**Résumé :** L'hypercholestérolémie est le facteur de risque majeur de l'athérosclérose, et est souvent accompagnée par un stress oxydant important suite à la peroxydation des lipides. Les études épidémiologiques ont montré que l'hypercholestérolémie maternelle durant la grossesse est associée à un risque accru d'athérosclérose chez la descendance. Dans notre laboratoire, l'effet de l'hypercholestérolémie maternelle sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance a été démontrée dans un modèle de souris ApoE déficientes (ApoE<sup>-/-</sup>), génétiquement hypercholestérolémique. L'objectif de ma thèse était d'étudier l'effet d'un traitement maternel avec un hypocholestérolémiant (la cholestyramine) ou un antioxydant (la vitamine E) sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance adulte de souris ApoE<sup>-/-</sup>. Ces deux

traitements maternels, durant la gestation ou la gestation et la lactation, ont permis une réduction significative des plaques d'athérome chez les descendants adultes, sans modification de leur cholestérol plasmatique. Nous avons ensuite étudié les facteurs liés à l'homéostasie du cholestérol chez la descendance comme les acides biliaires ainsi que certains marqueurs de l'athérosclérose et le triméthylamine-N-oxide (TMAO). Nous avons également mesuré l'expression hépatique de quelques microARNs, qui jouent un rôle régulateur dans plusieurs processus athérogènes. Les microARNs sont également de potentiels marqueurs de l'athérosclérose, et sont impliqués dans les mécanismes de programmation fœtale. Les variations observées dans ces facteurs dépendaient du type ainsi que la période de traitement maternel et du sexe des descendants.

**Title:** Effect of perinatal treatment with a cholesterol-lowering drug (cholestyramine) and/or an antioxidant (vitamin E) on the development of atherosclerosis in the adult offspring of apoE-deficient mice.

**Keywords:** genetic hypercholesterolemia, perinatal, atherosclerosis, cholestyramine, vitamin E

**Abstract:** Hypercholesterolemia is the major risk factor for atherosclerosis, and is often accompanied by significant oxidative stress as a result of lipid peroxidation. Epidemiological studies have shown that maternal hypercholesterolemia during pregnancy is associated with an increased risk of atherosclerosis in offspring. In our laboratory, we have studied the impact of maternal hypercholesterolemia on the development of atherosclerosis in offspring using ApoE-deficient (ApoE<sup>-/-</sup>), genetically hypercholesterolemic mouse model. The objective of my thesis was to study the effect of maternal treatment with a cholesterol-lowering drug (cholestyramine) or an antioxidant (vitamin E) on the development of atherosclerosis in the adult offspring of

ApoE<sup>-/-</sup> mice. Both maternal treatments, during gestation or gestation and lactation, resulted in a significant reduction of atherosclerotic plaques in adult offspring, with no change in their plasma cholesterol. We then studied factors related to cholesterol homeostasis in the offspring such as bile acids as well as some markers of atherosclerosis and trimethylamine-N-oxide (TMAO). We also measured the hepatic expression of some microRNAs, which play a regulatory role in several atherogenic processes. MicroRNAs are also potential markers of atherosclerosis and are involved in fetal programming mechanisms. The variations observed in these factors depended on the type and period of maternal treatment and the sex of the offspring