

**Oxydation des acides gras polyinsaturés n-6 au cours de  
la digestion et altération de la fonction vasculaire :  
Stratégie de prévention antioxydante par  
supplémentation en polyphénols de pomme**

Gaetan Bolea

► **To cite this version:**

Gaetan Bolea. Oxydation des acides gras polyinsaturés n-6 au cours de la digestion et altération de la fonction vasculaire: Stratégie de prévention antioxydante par supplémentation en polyphénols de pomme. Autre [q-bio.OT]. Université d'Avignon, 2019. Français. NNT: 2019AVIG0352 . tel-02512134

**HAL Id: tel-02512134**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02512134>**

Submitted on 19 Mar 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## THÈSE

En vue de l'obtention du titre de **Docteur**

Spécialité : Nutrition et Santé

ECOLE DOCTORALE AGROSCIENCES ET SCIENCES 536

Université d'Avignon

**Oxydation des acides gras polyinsaturés n-6 au cours de la digestion et altération de la fonction vasculaire. Stratégie de prévention antioxydante par supplémentation en polyphénols de pomme**

Soutenue le 8 juillet 2019

Par **Gaëtan BOLEA**

Membres du Jury

Mme Françoise GUERAUD, Directrice de Recherche, INRA Toulouse

Rapporteur

Mr. Jean-François LANDRIER, Directeur de Recherche, INRA Aix-Marseille

Rapporteur

Mme Véronique SANTE-LHOUTELLIER, Directrice de Recherche, INRA Clermont-Ferrand Examinatrice

Mr. Grégory MEYER, Maître de Conférences, Université d'Avignon

Co-directeur de thèse

Mme Claire DUFOUR, Chargée de Recherche-HDR, INRA Avignon

Directrice de thèse





## THÈSE

En vue de l'obtention du titre de **Docteur**

Spécialité : Nutrition et Santé

ECOLE DOCTORALE AGROSCIENCES ET SCIENCES 536

Université d'Avignon

**Oxydation des acides gras polyinsaturés n-6 au cours de la digestion et altération de la fonction vasculaire. Stratégie de prévention antioxydante par supplémentation en polyphénols de pomme**

Soutenue le 8 juillet 2019

Par **Gaëtan BOLEA**

Membres du Jury

Mme Françoise GUERAUD, Directrice de Recherche, INRA Toulouse

Rapporteur

Mr. Jean-François LANDRIER, Directeur de Recherche, INRA Aix-Marseille

Rapporteur

Mme Véronique SANTE-LHOUTELLIER, Directrice de Recherche, INRA Clermont-Ferrand Examinatrice

Mr. Grégory MEYER, Maître de Conférences, Université d'Avignon

Co-directeur de thèse

Mme Claire DUFOUR, Chargée de Recherche-HDR, INRA Avignon

Directrice de thèse



# **REMERCIEMENTS**

Au terme de ces trois années de doctorat, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont encadré, accompagné, soutenu dans l'élaboration de ce travail.

Ce travail a été réalisé entre l'UMR 408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) et le Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiologie de l'université d'Avignon. Je remercie en premier lieu la directrice de recherche **Catherine Renard**, le directeur de recherche **Frédéric Carlin**, ainsi que la professeure **Agnès Jullian-Vinet** pour m'avoir accueilli dans vos différents laboratoires. Vous m'avez donné les opportunités de réaliser ce travail de thèse dans des conditions remarquables.

Je souhaite remercier **Claire Dufour** de m'avoir accepté puis encadré durant ces 3 années de thèse. Je la remercie de la confiance qu'elle m'a témoignée durant ces années, pour son aide et ses conseils. Je remercie également **Grégory Meyer** pour sa co-direction de thèse. Merci pour ton encadrement, ton aide et ta disponibilité. Vous m'avez appris énormément de choses et j'espère avoir l'honneur de collaborer à nouveau avec vous dans les années à venir.

Je tiens également à remercier les directeurs de recherche **Françoise Guéraud** et **Jean-François Landrier** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi que la directrice de recherche **Véronique Santé-Lhoutellier** pour avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail.



## *Financements & collaborations*



Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein du laboratoire de Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale (SQPOV) UMR408 de l'Institut National de la Recherche Agronomique, en étroite collaboration avec le Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire (LaPEC) EA 4278 de l'université d'Avignon, ainsi que Laboratoire Hypoxie et Physiopathologies cardiovasculaires et respiratoires (hp<sup>2</sup>) UMR1042 de l'université de Grenoble.



Cette thèse a été financée par la Fondation de l'université d'Avignon et l'étude animale a bénéficié d'une bourse de la SFR Tersys de l'université d'Avignon, obtenue en 2016.



Le système d'imagerie Vevo 3100™ (Fujifilm VisualSonics, Toronto, Canada) de la plateforme 3A a été financé par le Fond de Développement Régional Européen, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, la Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, le Conseil Départemental du Vaucluse et l'agglomération d'Avignon.



---

## LISTE DES PUBLICATIONS

### Article soumis

*Lipid protection by polyphenol-rich apple matrices is modulated by pH and pepsin in in vitro gastric digestion.* **Boléa G**, Ginies C, Vallier MJ, Dufour C. *Food and Function* 2019.

### Articles en préparation

*Apple polyphenols decrease post-prandial oxidative stress in the in vitro digestion of a Western type diet.* **Boléa G**, Ginies C, Dufour C.

*Impairments of endothelial function and atherosclerosis development through n-6 lipid oxidation during digestion. Protective effects of a supplementation with apple polyphenols.* **Boléa G**, Philouze C, Risdon S, Dubois M, Humberclaude A, Geny B, Arnaud C, Dufour C, Meyer G.

---

## LISTE DES COMMUNICATIONS

*Apple polyphenols decrease endothelial dysfunction and atherosclerosis in ApoE mice fed with chronic Western diet.* Poster communication. French congress of Cardiology, Basic and clinical research, Lille, 1-3 avril 2019. **Boléa G**, Philouze C, Risdon S, Dubois M, Humberclaude A, Ginies C, Geny B, Arnaud C, Dufour C, Meyer G.

*Apple polyphenols decrease endothelial dysfunction and atherosclerosis after chronic Western diet in a ApoE mouse model.* Oral communication. 2<sup>nd</sup> Conference on food bioactives & health, Lisbonne, 26-28 septembre 2018. **Boléa G**, Philouze C, Dubois M, Humberclaude A, Ginies C, Arnaud C, Dufour C, Meyer G.

*Les polyphénols de pomme réduisent la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose après un régime chronique de type Western chez les souris ApoE<sup>-/-</sup>.* Oral and poster communication. French congress of Cardiology, Basic and clinical research, Montpellier 4-6 avril 2018. **Boléa G**, Philouze C, Dubois M, Humberclaude A, Ginies C, Arnaud C, Dufour C, Meyer G.

*Lipid oxidation and its inhibition by apple polyphenols in static and dynamic in vitro digestion systems.* Poster communication. 5th International Conference on Food Digestion, Rennes, 4-6 avril 2017. **Boléa G**, Goupy P, Ginies C, Dufour C.

*Apple procyanidins decrease oxidation of dietary lipids in the in vitro gastrointestinal digestion model of a Western meal.* Printemps de la Cardiologie, Nantes, 6-8 avril 2017. **Boléa G**, Ginies C, Meyer G, Dufour C.

*Oxydation des lipides polyinsaturés lors de la digestion et effet sur la fonction endothéliale et l'athérosclérose – Modulation par la consommation de pomme.* Communication orale. Séminaire TerSys Stress oxydant (26 juin 2017, Avignon). **Boléa G**, Philouze C, Dubois M, Humberclaude A, Ginies C, Arnaud C, Dufour C, Meyer G.

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
<b>REVUE DE LITTERATURE</b> .....	7
1. Alimentation et oxydation lipidique.....	8
1.1. Les lipides alimentaires .....	8
1.1.1. Les acides gras .....	9
1.1.2. Les triglycérides .....	11
1.1.3. Les phospholipides .....	12
1.1.4. Le cholestérol .....	13
1.2. Physiologie de la digestion .....	14
1.2.1. Généralité .....	14
1.2.2. Une protéase gastrique : la pepsine .....	19
1.2.2.1. Structure et activité de la pepsine .....	19
1.2.2.2. Mécanisme d'action de la pepsine .....	20
1.2.3. Digestion des lipides .....	21
1.3. Processus d'oxydation lipidique.....	24
1.3.1. Auto-oxydation des lipides.....	25
1.3.2. L'oxydation lipidique amorcée par le fer d'origine alimentaire .....	29
1.3.2.1. Mécanismes de l'oxydation lipidique initiée par le fer héminique et non héminique.....	30
1.3.2.2. Produits d'oxydation lipidique secondaires .....	32
1.3.3. Oxydation et produits d'oxydation du cholestérol .....	34
1.4. Absorption des lipides oxydés .....	34
1.5. Les lipoprotéines.....	36
2. Système vasculaire et oxydation lipidique .....	39
2.1. Système vasculaire .....	39

2.1.1.	Généralité .....	39
2.1.2.	Structure des artères .....	40
2.2.	Vasomotricité artérielle .....	42
2.2.1.	Mécanismes de contraction/relaxation des CML.....	43
2.2.2.	Régulation de la vasomotricité.....	44
2.2.2.1.	Régulation du tonus vasculaire par le système nerveux autonome.....	44
2.2.2.2.	Les influences chimiques locales sur la vasomotricité .....	45
2.2.3.	Le NO.....	46
2.2.3.1.	Mécanismes de synthèse du NO .....	46
2.2.3.2.	Mécanisme vasodilatateur du NO au niveau des CML .....	48
2.2.3.3.	Régulation de la eNOS et de la voie eNOS/GMPc.....	49
2.2.3.4.	Autres effets bénéfiques du NO sur le système cardiovasculaire .....	50
2.3.	Dysfonction endothéliale .....	51
2.3.1.	Stress oxydant .....	51
2.3.2.	Stress oxydant et eNOS .....	54
2.4.	L'athérosclérose.....	56
2.4.1.	Généralité .....	56
2.4.2.	L'initiation de la formation de la plaque d'athérome.....	57
2.4.3.	L'oxydation des lipoprotéines LDL .....	59
2.4.4.	Les types cellulaires impliqués dans le développement de l'athérosclérose..	61
2.4.5.	Développement des plaques d'athérome.....	61
2.4.6.	Effet pro-athérogène des LDLox plasmatiques.....	62
2.4.7.	Effets bénéfiques des HDL .....	65
2.5.	Les conséquences cliniques des plaques d'athérome avancées.....	67
2.6.	Effets au niveau vasculaire des oxystérols et du 4-HNE.....	68
2.6.1.	Effet pro-athérogène des oxystérols .....	68

2.6.2.	Effet pro-athérogène du 4-HNE .....	69
3.	Protection de la fonction vasculaire par les antioxydants alimentaires .....	74
3.1.	Antioxydants alimentaires .....	74
3.2.	Mécanisme d'action et sources alimentaires en vitamines C et E .....	75
3.2.1.	La vitamine C .....	75
3.2.2.	La vitamine E .....	76
3.3.	Les polyphénols .....	78
3.3.1.	Définition et rôles des polyphénols dans la plante .....	78
3.3.2.	Classification et principales sources alimentaires des polyphénols .....	79
3.3.2.1.	Les principaux acides phénoliques .....	79
3.3.2.2.	Les flavonoïdes .....	81
3.3.3.	Prise alimentaire journalière en polyphénols .....	88
3.3.3.1.	Paramètres influençant la teneur en polyphénols des aliments.....	88
3.3.3.2.	Consommation journalière en polyphénol. ....	89
3.4.	Propriétés physico-chimiques des polyphénols .....	91
3.4.1.	Affinité pour les protéines et les polysaccharides .....	91
3.4.2.	Effets antioxydants des polyphénols .....	92
3.4.2.1.	Réduction des ERO.....	92
3.4.2.2.	Chélation des ions métalliques.....	94
3.4.2.3.	Inhibition d'enzymes pro-oxydantes.....	94
3.5.	Digestion et métabolisme des polyphénols .....	95
3.5.1.	Digestion et absorption des polyphénols.....	95
3.5.2.	Biodisponibilité et transport sanguin des métabolites phénoliques .....	98
3.6.	Mécanismes protecteurs de la santé cardiovasculaire .....	99
3.7.	La pomme comme supplément alimentaire riche en polyphénols : un choix pertinent ? .....	102

<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	108
1.1. Produits chimiques et solvants .....	109
1.2. Caractérisation de l'huile de tournesol .....	110
1.2.1. Détermination de la composition en acides gras .....	110
1.2.2. Détermination de la teneur en $\alpha$ -tocophérol .....	111
1.3. Préparation et caractérisation des différentes matrices de pomme.....	112
1.3.1. Préparation de la matrice "purée" .....	112
1.3.2. Préparation de la matrice "extrait phénolique" .....	113
1.3.3. Identification des composés phénoliques de la pomme .....	113
1.3.4. Quantification de la teneur en polyphénols des différentes matrices.....	114
1.3.5. Quantification de la teneur en vitamine C.....	116
1.4. Modèles de digestion <i>in vitro</i> .....	117
1.4.1. Oxydation d'une émulsion dans un modèle <i>in vitro</i> de digestion gastrique	117
1.4.1.1. Préparation de l'émulsion .....	117
1.4.1.2. Préparation de l'initiateur de l'oxydation lipidique .....	118
1.4.1.3. Préparation de la pepsine .....	118
1.4.1.4. Préparation des différentes sources d'antioxydants.....	118
1.4.1.5. Simulation de la digestion gastrique d'une émulsion .....	119
1.4.1.6. Evaluation de l'oxydation lipidique.....	120
1.4.1.7. Evaluation de la concentration en $\alpha$ -tocophérol .....	122
1.4.1.8. Evaluation de la bioaccessibilité des polyphénols natifs .....	122
1.4.1.9. Evaluation de la dégradation de la vitamine C .....	122
1.4.1.10. Effet de la lipolyse sur l'oxydation lipidique.....	123
1.4.2. Oxydation d'une émulsion dans un modèle <i>in vitro</i> de digestion gastro-intestinale.....	124
1.5. Effet du pH, de la pepsine et de l'épicatéchine sur la structure de la méthyoglobine.....	127

1.5.1.	Effet du pH .....	127
1.5.2.	Effet de la pepsine en absence et en présence d'épicatéchine.....	128
1.6.	Mesure de la taille de particule (gouttelette lipidique) dans les modèles de digestion.....	128
1.7.	Analyse statistique .....	129
Expérimentations <i>in vivo</i> .....		130
2.1.	Préparation des différents éléments du régime nutritionnel .....	130
2.2.	Population et régime expérimentaux .....	132
2.3.	Mesure de paramètres physiologiques.....	134
2.3.1.	Evaluation de l'homéostasie du glucose .....	134
2.3.1.1.	Test de tolérance au glucose .....	134
2.3.1.2.	Test de tolérance à l'insuline .....	134
2.3.2.	Mesure de la pression artérielle.....	135
2.3.3.	Evaluation de la taille des plaques d'athérome <i>in vivo</i> par échographie.....	136
2.4.	Anesthésie et prélèvements tissulaires .....	137
2.5.	Evaluation de la dysfonction endothéliale par des tests de vasoréactivité aortique.....	138
2.6.	Mesure du développement des plaques d'athérome par coloration à l'Oil-Red-O.....	140
2.7.	Caractérisation de la plaque d'athérome .....	141
2.8.	Analyses biochimiques .....	143
2.8.1.	Préparation des échantillons et dosage des protéines.....	143
2.8.2.	Western Immunoblotting.....	143
2.9.	Profil lipidique sanguin .....	145
2.10.	Evaluation du stress oxydant par Résonance Paramagnétique Electronique	146
2.11.	Evaluation de l'accumulation du 4-HNE.....	147
2.12.	Analyses statistiques.....	148

<b>ETUDE n°1</b> : La protection des lipides par des matrices de pomme riches en polyphénols est modulée par le pH et la pepsine au cours de la digestion gastrique <i>in vitro</i> .....	151
<b>ETUDE n°2</b> : Les polyphénols de pomme ( <i>Reinette de Flandre</i> ) réduisent l'oxydation lipidique au cours de la digestion gastro-intestinale <i>in vitro</i> d'un repas occidental.....	202
<b>ETUDE n°3</b> : Altérations de la fonction endothéliale et développement de l'athérosclérose induits par l'oxydation lipidique des n-6 durant la digestion. Effets protecteurs d'une supplémentation en polyphénols de pomme.....	231
<b>DISCUSSION</b> .....	271
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	279
<b>ANNEXES</b> .....	284
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	291
<b>RESUME</b> .....	317

# INDEX DES FIGURES

## REVUE DE LITTERATURE

<b>Figure 1</b> : Représentation d'un TG (R1, 2, 3 sont les chaînes d'acides gras). .....	12
<b>Figure 2</b> : Représentation des principaux phospholipides d'origine alimentaire. ....	13
<b>Figure 3</b> : Représentation de la structure du cholestérol. ....	13
<b>Figure 4</b> : Représentation du tube digestif avec les organes annexes. ....	15
<b>Figure 5</b> : Anatomie de l'estomac. ....	17
<b>Figure 6</b> : Structure de la pepsine. ....	20
<b>Figure 7</b> : Mécanisme catalytique de la protéase aspartique. ....	21
<b>Figure 8</b> : Schéma général de l'auto-oxydation des AGPI. ....	26
<b>Figure 9</b> : Formation des produits primaires d'auto-oxydation des AGPI. ....	26
<b>Figure 10</b> : Clivage de Hock des hydroperoxydes. ....	28
<b>Figure 11</b> : Structure de la myoglobine. ....	31
<b>Figure 12</b> : Cycle redox des différentes espèces de myoglobine à pH 5,5. ....	32
<b>Figure 13</b> : Représentation de la réactivité du 4-HNE. ....	33
<b>Figure 14</b> : Métabolisme des lipoprotéines. ....	37
<b>Figure 15</b> : Représentation de l'organisation du système cardiovasculaire. ....	40
<b>Figure 16</b> : Structure de la paroi vasculaire. ....	42
<b>Figure 17</b> : Mécanisme d'activation réversible de la chaîne légère de myosine (Myosine LC <sub>20</sub> ) des CML. ....	44
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique de la synthèse du NO par la eNOS. ....	48
<b>Figure 19</b> : Mécanisme de relaxation des CML induit par le NO. ....	49
<b>Figure 20</b> : Principaux mécanismes de défenses antioxydantes endothéliales. ....	54
<b>Figure 21</b> : Effet des ERO sur la dysfonction de la eNOS. ....	55

<b>Figure 22</b> : Mécanisme d'initiation de l'athérosclérose.....	59
<b>Figure 23</b> : Développement des lésions athéromateuses et formation d'un thrombus.....	62
<b>Figure 24</b> : Transport inverse du cholestérol.....	66
<b>Figure 25</b> : Principales étapes aboutissant au développement de l'athérosclérose ou à d'autres pathologies après ingestion de lipides sensibles à l'oxydation. ....	72
<b>Figure 26</b> : Représentation de la forme réduite et oxydée de la vitamine C. ....	76
<b>Figure 27</b> : Représentation des formules développées des tocophérols et des tocotriénols. ...	77
<b>Figure 28</b> : Structure chimique des différents acides hydroxybenzoïques.....	80
<b>Figure 29</b> : Structure chimique des principaux acides hydroxycinnamiques.....	81
<b>Figure 30</b> : Structure chimique générale des flavonoïdes. ....	82
<b>Figure 31</b> : Structure chimique des principales flavanones. ....	83
<b>Figure 32</b> : Structure des monomères communs de flavanols.....	84
<b>Figure 33</b> : PCs dimères de type B avec une liaison de type C4-C8.....	85
<b>Figure 34</b> : Représentation des structures chimiques principales des flavonols. ....	86
<b>Figure 35</b> : Représentation chimique des principales isoflavones. ....	87
<b>Figure 36</b> : Structure chimique des principaux anthocyanes.....	88
<b>Figure 37</b> : Mécanisme général d'absorption et de métabolisme entérocytaire des composés phénoliques dans l'intestin grêle. ....	97
<b>Figure 38</b> : Biodisponibilité des polyphénols.....	99

## MATERIELS ET METHODES

<b>Figure 39</b> : Rendu graphique d'un enregistrement sur un cycle de la pression artérielle par le système CODA.....	136
<b>Figure 40</b> : Mesure de la plaque d'athérome en échographie. ....	137
<b>Figure 41</b> : Représentation du système de cuve à organe isolé.....	139
<b>Figure 42</b> : Représentation du protocole de vasoréactivité. ....	140

**Figure 43 :** Représentation de la dissection du cœur/aorte avant l'inclusion dans l'O.C.T.. 141

**Figure 44 :** Représentation de la réalisation des coupes histologiques aux niveaux des valves aortiques. .... 141

## **ETUDE 1 (COMPLEMENT)**

**Figure 45 :** Taux résiduel des TG de l'huile de tournesol au cours de la simulation de digestion gastrique en présence de la lipase fongique à pH 5..... 197

**Figure 46 :** Apparition de l'acide linoléique au cours de la simulation de digestion gastrique en présence de la lipase fongique..... 197

**Figure 47 :** Evaluation de l'oxydation lipidique en modèle d'émulsion gastrique à pH 5 en présence ou non de la lipase..... 198

**Figure 48 :** Evaluation de l'oxydation lipidique en modèle d'émulsion gastrique à pH 3 en présence ou non de la lipase..... 200

## **CONCLUSION**

**Figure 49 :** Pathologies vasculaires induites par la consommation chronique d'un régime occidental et protection par la supplémentation en polyphénols de pomme. .... 281

## **ANNEXES**

**Figure 50 :** Effects of Standard vs. High Fat diet (HF+RM) diet on weight gain..... 285

**Figure 51 :** Effects of Standard vs. a High Fat diet (HF+RM) on 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) formation during gastro-intestinal digestion and plasma lipids and lipoproteins..... 286

**Figure 52 :** Effects of Standard vs. a High Fat diet a (HF+RM) on vascular function and potential molecular mechanism involved in endothelial dysfunction..... 288

**Figure 53 :** Development and characterization of atheromatous plaque size induced by the Hight Fat diet (HF+RM) vs. Standard diet..... 289

# INDEX DES TABLEAUX

## REVUE DE LITTERATURE

**Tableau 1** : Principaux acides gras et leurs origines végétale ou animale. .... 10

**Tableau 2** : Classes de polyphénols et consommation journalière ..... 90

## MATERIELS ET METHODES

**Tableau 3** : Concentration en électrolytes des différents fluides simulés utilisés dans le modèle de digestion gastro-intestinale *in vitro* statique. .... 126

**Tableau 4** : Composition et répartition nutritionnelle des différents régimes riches en gras supplémentés ou non en polyphénols. .... 133

## ETUDE 1 (COMPLEMENT)

**Tableau 5** : Molécules identifiées dans les extraits isopropanoliques d'émulsions à base d'huile de tournesol en présence de la lipase fongique (*Aspergillus Niger*, lipase A d'Amano). .... 195

---

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>4-HNE</b> : 4-hydroxy-2-nonéal	<b>iNOS</b> : inductible oxyde nitrique synthétase
<b>AGPI</b> : acide gras polyinsaturé	<b>IPGTT</b> : test de tolérance au glucose par voie orale
<b>Apo</b> : apolipoprotéine	<b>ITT</b> : test de tolérance à l'insuline
<b>BH<sub>2</sub></b> : dihydrobioptéine	<b>IUPAC</b> : union internationale de chimie pure et appliquée
<b>BH<sub>4</sub></b> : tétrahydrobioptéine	<b>kcal</b> : kilo calorie
<b>CaM</b> : calmoduline	<b>LDL</b> : lipoprotéine de basse densité
<b>CD</b> : diènes conjugués	<b>LDLox</b> : lipoprotéine de basse densité oxydée
<b>CEPT</b> : cholesteryl ester transfer protein	<b>LOOH</b> : hydroperoxyde lipidique
<b>CMH</b> : 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tétraméthyl pyrrolidine	<b>MbFe<sup>II</sup></b> : myoglobine
<b>CML</b> : cellule musculaire lisse	<b>MbFe<sup>III</sup></b> : métmyoglobine
<b>COMT</b> : catéchol-O-méthyl transférase	<b>MbFe<sup>IV=O</sup></b> : ferrylmyoglobine
<b>DNPH</b> : 2,4-dinitrophénylhydrazine	<b>MCP-1</b> : monocyte chemotactic protein
<b>eNOS</b> : endothéliale oxyde nitrique synthétase	<b>M-CSF</b> : macrophage-colony stimulating factor
<b>ERO</b> : espèce réactive de l'oxygène	<b>MLCK</b> : kinase des chaînes légères de myosine
<b>GMPc</b> : guanosine monophosphate cyclique	<b>mmLDL</b> : lipoprotéine de basse densité faiblement modifié
<b>GTP</b> : guanosine triphosphate	<b>MMP</b> : métalloprotéinase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> : peroxyde d'hydrogène	<b>m/z</b> : ratio masse sur charge
<b>HDL</b> : lipoprotéine de haute densité	<b>n-3</b> : oméga 3
<b>HF</b> : high fat	<b>n-6</b> : oméga 6
<b>IDL</b> : lipoprotéine de densité intermédiaire	
<b>IL</b> : interleukine	

**NADPH** : nicotinamide adénine  
dinucléotide phosphate

**NF- $\kappa$ B** : facteur nucléaire kappa B

**nNOS** : neuronal oxyde nitrique synthétase

**NO** : monoxyde d'azote

**NOX** : NADPH oxydase

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

**OH<sup>°</sup>** : radical hydroxyle

**OMS** : organisation mondiale de la santé

**ONOO<sup>-</sup>** : peroxynitrite

**PA** : pression artérielle

**PE** : extrait phénolique

**PKG** : protéine kinase G

**RM** : viande rouge

**RO<sup>•</sup>** : radical alcoxyle

**ROO<sup>•</sup>** : radical peroxyde

**RPE** : résonance paramagnétique  
électronique

**RS** : récepteur scavenger

**SGLT** : transporteur sodium glucose

**SO** : huile de tournesol

**SOD** : superoxyde dismutase

**TG** : triglycéride

**TNF- $\alpha$**  : facteur de nécrose tumorale-alpha

**ICAM** : molécule d'adhésion  
intercellulaire

**VCAM** : molécule d'adhésion cellulaire  
vasculaire

**VLDL** : lipoprotéine de très basse densité



# **INTRODUCTION GENERALE**

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause d'incapacité et de décès prématurés dans le monde. Par conséquent, ces pathologies constituent un problème majeur de santé publique. Selon l'OMS, d'ici à 2030 près de 23,6 millions de personnes décèderont de maladies cardiovasculaires par an et selon les projections ces affections resteront la première cause de mortalité devant les cancers. En 2012, ces pathologies étaient responsables de 31,5% des décès prématurés dans le monde (soit 17,1 millions dont environ 150 000 en France). La France compte également 3,5 millions de patients recevant un traitement contre ces maladies. Les maladies cardiovasculaires sont regroupées en différentes catégories : les cardiopathies coronariennes, les maladies cérébro-vasculaires, les artériopathies périphériques, les cardiopathies rhumatismales, les malformations cardiaques congénitales, les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires. Parmi celles-ci, ce sont les pathologies ischémiques (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou embolies pulmonaires), définies comme un déficit entre les apports et les besoins en oxygène et nutriments aux cellules irriguées, qui sont les plus fréquentes. Les pathologies ischémiques sont reconnues comme ayant pour origine une dysfonction endothéliale. L'endothélium, une des pierres angulaires du système cardiovasculaire, est une monocouche cellulaire tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguins et jouant un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. De par son contact avec le sang, il va réagir localement et rapidement à différents stimuli physiques ou chimiques par la libération d'agent vasoconstricteurs ou vasodilatateurs dont le monoxyde d'azote (NO). Le NO est produit au niveau endothélial par une enzyme, la eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) au niveau endothélial, qui est majoritairement responsable de la relaxation endothélium-dépendante des vaisseaux (Forstermann and Munzel, 2006).

Parmi les facteurs de risque induisant l'apparition d'une dysfonction endothéliale, et favorisant le développement de l'athérosclérose, plusieurs catégories ont été identifiées et sont classées en facteurs de risque irréversibles ou en facteurs de risques modifiables selon la World Heart Federation en 2013.

Les facteurs de risque irréversibles ou non modifiables sont :

- le vieillissement (qui est considéré comme le premier facteur de risque cardiovasculaire),
- le genre (le risque de développer une maladie cardiovasculaire est plus important chez l'homme et il augmente chez la femme après la ménopause),
- l'ethnicité,

- l'hérédité ou l'histoire familiale.

Les principaux facteurs de risque modifiables notamment par un changement de régime alimentaire sont :

- l'hypertension (> 140/90 mmHg),
- le tabagisme,
- l'obésité ou surpoids (indice de masse corporelle > 25),
- la sédentarité,
- la consommation excessive d'alcool,
- le diabète (>126 mg de glucose par dL de sang),
- l'hyperlipémie notamment l'hypercholestérolémie (>200 mg/mL).

Chez un individu ou dans une population, l'évaluation de tous ces facteurs de risque donne, après pondération, un score de risque, qui comparé aux données épidémiologiques, indique la probabilité d'incidence de maladies cardiovasculaires (score de risque de Framingham ou SCORE) (Perk et al., 2012).

Le principal facteur de risque modifiable est l'alimentation et plus particulièrement une alimentation de type occidentale. Cette alimentation comprend une part excessive de lipides saturés et insaturés, de viande rouge, de glucides, d'aliments transformés ou raffinés. Cette alimentation présente également la caractéristique d'être pauvre en fruits et légumes frais, céréales et poissons. De plus, le ratio des apports en lipides polyinsaturés oméga 6 et en oméga 3 peut atteindre 20/1 dans ce type d'alimentation, alors que le ratio idéal est de 4/1 à 1/1, indiquant une surconsommation en acides gras oméga 6. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont sensibles aux processus d'oxydation, qui peuvent avoir lieu de manière exogène dans les aliments lors de la conservation ou lors la préparation mais également de manière endogène lors de la digestion. L'oxydation lipidique altère la qualité sensorielle (olfactive et gustative) et nutritionnelle des acides gras en réduisant l'apport alimentaire d'acides gras essentiels. Au niveau gastrique, les conditions physico-chimiques (oxygène, pH) sont favorables à l'initiation de l'oxydation des AGPI par diverses formes de fer alimentaire (fer héminique de la myoglobine du muscle, fer libre) (Kanner and Lapidot, 2001; Lorrain et al., 2010). L'oxydation lipidique peut exacerber les effets délétères d'un régime gras au niveau cardiovasculaire, induits par une alimentation riche en lipides et par la formation de composés néfastes et toxiques pour l'homme (hydroperoxydes, aldéhydes, cétones, etc.). Au niveau moléculaire, les produits d'oxydation (ex : 4-hydroxynonéal ou 4-HNE) semblent être absorbables au niveau de

l'intestin grêle pour être ensuite pris en charge par les chylomicrons puis par les lipoprotéines du plasma (LDL, HDL) avant d'être retrouvés métabolisés dans l'urine sous forme d'adduit avec l'acide mercapturique par exemple, comme cela a été montré pour le rat (Keller et al., 2015). La modification des LDL par interaction avec le 4-HNE, produit d'oxydation cytotoxique et génotoxique spécifique des AGPI oméga-6, conduit aux LDL oxydées (LDLox) qui sont considérés comme des facteurs clés dans le développement de l'athérosclérose. De plus, la dysfonction endothéliale pouvant être induite par le stress oxydant, joue également être un rôle clé dans le développement de l'athérosclérose. En effet, la dysfonction endothéliale va notamment se caractériser par une altération de la voie du NO. En effet, l'endothélium, notamment via la synthèse du NO, a un rôle anti-plaquettaire, anti-thrombotique et limite la prolifération des cellules musculaires lisses. Or, ce sont des mécanismes impliqués dans le phénomène d'athérosclérose.

Les changements dans les comportements alimentaires, notamment avec la démocratisation de la « junkfood » et de la « fast food », l'augmentation de la consommation de plats industriels, peu coûteux mais trop riches en lipides, associés à une trop forte consommation de viande rouge, participent à l'évolution de la prévalence des maladies cardiovasculaires. Une sensibilisation des populations au danger de ce type d'alimentation pourrait limiter leur consommation et ainsi réduire les risques cardiovasculaires associés. Dans l'optique d'une sensibilisation efficace, une meilleure compréhension des mécanismes délétères induits par ces déséquilibres alimentaires semble nécessaire.

Il est possible de réduire la fréquence d'apparition des évènements cliniques et la mortalité prématurée chez les personnes présentant une pathologie cardiovasculaire avancée et chez les personnes dont le risque est majoré par la présence d'un ou de plusieurs facteurs de risque comme notamment l'alimentation. Comme le disait Hippocrate il y a 2500 ans, « *Que ta nourriture soit ton médicament et que ton médicament soit ta nourriture* ». Ainsi, la mise en place d'une stratégie naturelle de prévention, avec un régime alimentaire incorporant des aliments dits antioxydants apparait nécessaire et pourrait prévenir ou ralentir le développement et les manifestations cliniques des pathologies ischémiques.

L'alimentation est source d'antioxydants naturels, tels que les vitamines, les polyphénols et les caroténoïdes. Les polyphénols sont les micro-constituants les plus abondants apportés par les fruits et les légumes. Diverses méta-analyses ont révélé que la consommation de fruits et légumes était associée à un risque réduit de développement de maladies coronariennes et d'AVC (He et al., 2006). Ces méta-analyses ont également montré que la consommation de

cacao ou d'un régime alimentaire riche en flavanols, une des classes majeures de polyphénols, améliorerait la fonction endothéliale en réduisant la pression artérielle par amélioration de la vasomotricité dépendante de l'endothélium de manière chronique ou aiguë (Kay et al., 2012). Les flavanols permettraient également de réduire l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales en état inflammatoire (Andre et al., 2012; Macready et al., 2014). Par ailleurs, l'apport en micro-constituants antioxydants semble protéger les lipides polyinsaturés contre l'oxydation dans le tractus gastro-intestinal (Gobert et al., 2014). Or, les flavanols monomériques (catéchine, épicatechine) et oligomériques (procyanidines, PCs) sont largement présents dans la pomme, qui est le fruit le plus abondamment consommé en France. Par conséquent, démontrer les bénéfices sur la santé cardiovasculaire, d'une supplémentation en fruits riches en molécules antioxydantes, telles que les flavanols, permettrait de favoriser la réintroduction des fruits et légumes au sein de ces régimes alimentaires reconnus comme néfastes.



# **REVUE DE LITTERATURE**

Nous présenterons dans cette revue de littérature une première partie détaillant l'alimentation lipidique et l'initiation de l'oxydation lipidique exogène ou endogène. La deuxième partie présente les conséquences biologiques induites par une alimentation occidentale sur la physiologie cardiovasculaire. Nous décrirons également les mécanismes responsables de la dysfonction endothéliale et de la formation des plaques d'athérome aboutissant au développement de pathologies ischémiques. La troisième partie de la revue de littérature traite de la prévention par une supplémentation alimentaire riche en polyphénols potentiellement protectrice de la fonction vasculaire à long terme.

## 1. Alimentation et oxydation lipidique

### 1.1. Les lipides alimentaires

Les lipides alimentaires font partie des sept constituants de base de notre alimentation avec les glucides, les protéines, les vitamines, les oligo-éléments, les minéraux et l'eau. Ce sont les macronutriments hydrophobes ou amphiphiles les plus énergétiques (1 g représente 9,3 kcal). Ils sont très diversifiés et classés en sept principales catégories selon l'IUPAC :

- Les acides gras
- Les acylglycérols (glycérides dont les triglycérides)
- Les phospholipides
- Les sphingolipides
- Les stérols dont le cholestérol
- Les terpènes
- Les glycolipides

La majeure partie des lipides alimentaires est constituée de triglycérides (Hamilton et al., 1997). Les lipides alimentaires sont apportés à la fois par les produits animaux (poissons, œufs, fromages, charcuteries et viandes), les produits végétaux (graines et fruits oléagineux, huiles) ainsi que certains produits transformés (viennoiseries, barres chocolatées, etc.) qui en contiennent beaucoup. Les recommandations officielles de l'ANSES (Agence Nationale de

Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail) indiquent que les lipides devraient représenter 35 à 40% de l'apport énergétique total au quotidien. Cette fourchette permet d'assurer la couverture des besoins en acides gras essentiels (acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique) et de prendre en compte la prévention de pathologies notamment cardiovasculaires. La limite haute de cette fourchette est dépassée en France pour environ 43% des adultes et 34% des enfants d'après l'ANSES indiquant une alimentation trop riche en lipide.

### 1.1.1. *Les acides gras*

Les acides gras sont des acides organiques à chaîne hydrocarbonée de longueur variable (de 4 à 24 atomes de carbone) comprenant une fonction acide carboxylique (-COOH). D'un point de vue biochimique, on distingue les acides gras saturés ne possédant aucune double liaison carbone-carbone, les acides gras monoinsaturés possédant une seule double liaison et les AGPI possédant plusieurs doubles liaisons. Cependant, les doubles liaisons ne sont que rarement conjuguées et sont séparées par un groupement méthylène (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-). Les acides gras existent généralement dans l'alimentation dans une configuration *cis* (ou *Z*) qui peut évoluer vers une configuration *trans* (ou *E*) après transformation ou oxydation. Dans la nature, plus de 150 acides gras différents ont été identifiés et ils sont caractérisés pour la plupart par un nombre pair d'atomes de carbone dont les plus abondants sont de type C16 et C18 (Tableau 1).

**Tableau 1** : Principaux acides gras et leurs origines végétale ou animale.

Nom systématique	Nom commun	Nombre de carbone	Nombre de doubles liaisons	Poids moléculaire (Da)	Principales sources alimentaires
Dodécanoïque	Laurique	12	0	200,31	Huile de coprah
Tétradécanoïque	Myristique	14	0	228,36	Produits laitiers
Hexadécanoïque	Palmitique	16	0	256,42	Huile de palme
Hexadécènoïque $\Delta^9$ <sup>a</sup>	Palmitoléique	16	1	254,39	Huile de noix de Macadamia
Octadécanoïque	Stéarique	18	0	284,47	Graisses animales
Octadécènoïque $\Delta^9$	Oléique	18	1	282,44	Huile d'olive, huile de pépin de raisin, beurre de karité,
Octadécadiènoïque $\Delta^9-12$	Linoléique (n-6) <sup>b</sup>	18	2	280,43	Huile de tournesol, de lin, de maïs, de soja, etc. phospholipides animaux (jaune d'œuf, cervelle)
Octadécatriènoïque $\Delta^9-12-15$	$\alpha$ -Linoléique (n-3)	18	3	278,41	Huiles de noix, colza, soja
Eicosanoïque	Arachidique	20	0	312,5	Huile d'arachide, de germes de maïs
Eicosanoïque $\Delta^5-8-11-14$	Arachidonique (n-6)	20	4	304,45	Graisses animales
Eicosapentaènoïque	EPA (n-3)	20	5	302,45	Huiles de poissons (foie de morue, hareng, saumon)
Docosanoïque	Béhénique	22	0	340,57	Huile d'arachide
Docosènoïque	Erucique	22	1	338,55	Huile de colza, graines de moutarde
Docosahexaènoïque	DHA (n-3)	22	6	328,49	Huiles de poissons

<sup>a</sup> :  $\Delta$  = position du premier carbone portant la double liaison (à partir de la fonction acide).

<sup>b</sup> : n = position du premier carbone portant la double liaison (à partir de la fin de la chaîne carbonée)

Les acides gras à nombre impair de carbone comme l'acide margarique (C17:0) présentent une teneur inférieure à 0,2% des acides gras totaux dans les huiles végétales (tournesol, olive).

L'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0) sont des acides gras saturés abondants dans les graisses animales. L'acide oléique (C18:1) composant majoritairement l'huile d'olive (55 à 80%) est un acide gras monoinsaturé. L'acide linoléique (C18:2), polyinsaturé à deux double liaisons est, quant à lui, abondant dans l'huile de tournesol ou de soja.

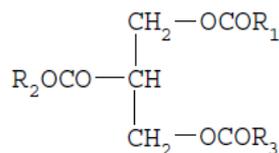
Chez l'homme, certains acides gras indispensables ne sont pas synthétisés ou en quantité insuffisante par l'organisme et ils sont dits « essentiels ». Ils appartiennent aux oméga 3 (n-3) et oméga 6 (n-6, position du premier carbone portant la dernière double liaison avec une numérotation en partant de la fin de la chaîne carbonée). Il existe 2 acides gras essentiels, l'acide linoléique (n-6) et l'acide  $\alpha$ -linoléique (n-3), qui ne sont pas synthétisés par l'homme et donc doivent être obligatoirement apportés par l'alimentation. La synthèse des acides gras à longue chaîne des deux familles (n-3 et n-6) étant peu efficace, il a été défini que l'acide arachidonique (C20:4 n-6), l'EPA (C20:5 n-3), et le DHA (C22:6 n-3) sont des acides gras essentiels.

Les graisses alimentaires contiennent des AGPI n-3 et n-6 qui jouent des rôles importants dans de nombreux processus biologiques humains. De nombreuses études épidémiologiques et cliniques indiquent que la consommation de DHA et d'EPA, même en petite quantité, est bénéfique pour réduire les risques de maladies cardiovasculaires et de cancers (Riediger et al., 2009). Ces AGPI n-3 ont un rôle bénéfique pour la santé mais leur sensibilité à l'oxydation leur confère également un rôle potentiellement délétère.

Les acides laurique, myristique, et palmitique sont des acides gras saturés à longue chaîne qui, en excès, ont un effet pro-athérogène. Les acides gras saturés à courte et moyenne chaînes n'ont pour leur part pas d'effet pro-athérogène.

### *1.1.2. Les triglycérides*

Les triacylglycérols ou triglycérides (TG) sont des lipides neutres formés par un glycérol acylé par trois acides gras (Figure 1). Les TG peuvent être saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés selon les acides gras qu'ils contiennent. Les TG sont les lipides les plus abondants dans l'alimentation et sont les constituants principaux des graisses animales et des huiles végétales. En effet, les huiles végétales sont constituées à 100% de lipides principalement sous forme de TG. Les acides gras peuvent comprendre de 4 à 22 carbones mais les acides gras à 16 et 18 carbones sont les plus courants.



**Figure 1** : Représentation d'un TG (R1, 2, 3 sont les chaînes d'acides gras).

Les TG contenant 3 acides gras identiques sont nommés selon l'acide présent (ex : tristéarine, TG constitué par trois acides stéariques). La plupart des corps gras naturels sont composés d'un mélange complexe de TG de composition variée.

Ils ont un rôle fondamental par leur fonction de réserve énergétique anhydre dans les cellules adipeuses (énergie par les acides gras et de stockage des acides gras grâce au glycérol).

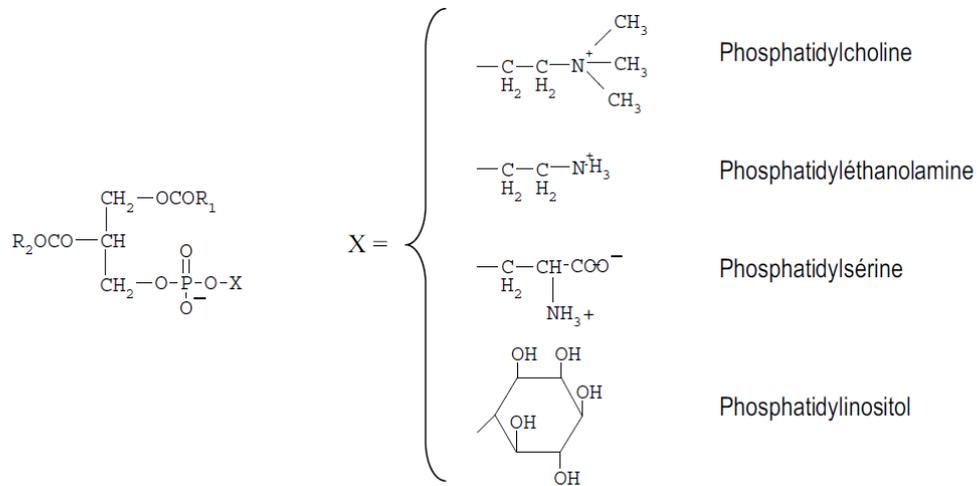
Une matière grasse ne présente pas un point de fusion net mais une zone de fusion. Pour une température donnée, les TG les plus saturés sont sous différentes formes cristallines en suspension dans une phase liquide plus riche en TG insaturés. Il n'y a aucune source de graisses alimentaires complètement saturées ou insaturées et les différentes graisses se caractérisent par la composition relative des chaînes latérales d'acides gras.

L'American Heart Association a défini un taux normal plasmatique de TG, après ingestion de lipides alimentaires, inférieur à 1,5 g/L (1,69 mmol/L) tandis qu'un taux supérieur à 2 g/L (2,25 mmol/L) représente un facteur de risque cardio-vasculaire.

### 1.1.3. Les phospholipides

Les phospholipides sont formés d'un glycérol lié à deux acides gras et à un groupement phosphate. Les phosphosphingolipides, quant à eux, ne possèdent qu'une seule chaîne apolaire. Les phospholipides sont amphiphiles avec une tête polaire (liée au groupement phosphate) et deux chaînes aliphatiques (apolaire). Cette association permet aux phospholipides de s'organiser en bicouche et de constituer les membranes cellulaires. Les acides gras estérifiés au niveau du glycérol peuvent varier mais en général, l'un des deux est saturé. Le groupement phosphate en position sn-3 du glycérol peut être estérifié avec différentes molécules (sérine, éthanolamine, choline, glycérol ou inositol). La phosphatidylcholine (lécithine), la

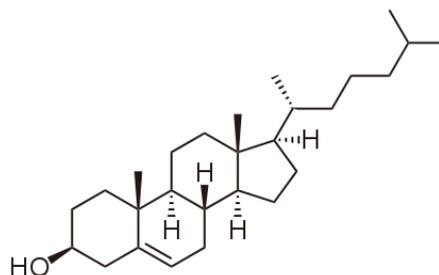
phosphatidyléthanolamine (céphaline), la phosphatidylsérine et la phosphatidylinositol sont les principaux phospholipides d'origine alimentaire (Figure 2).



**Figure 2 :** Représentation des principaux phospholipides d'origine alimentaire.

#### 1.1.4. Le cholestérol

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols jouant un rôle majeur dans de nombreux processus biochimiques. La molécule de cholestérol comprend quatre cycles carbonés notés A, B, C, D ainsi qu'un groupement hydroxyle (OH) sur le carbone 3. Ce groupement constitue la partie hydrophile du cholestérol et peut être estérifié par un acide gras saturé ou insaturé rendant la molécule insoluble dans l'eau (Figure 3).



**Figure 3 :** Représentation de la structure du cholestérol.

Le cholestérol est un composant majeur des membranes cellulaires animales contribuant à leur stabilité en s'intercalant entre les phospholipides et il est également présent dans les lipoprotéines.

Le cholestérol est le précurseur de nombreuses molécules dont, les hormones stéroïdiennes (cortisol, cortisone et aldostérone), les hormones stéroïdiennes sexuelles (progestérone, œstrogènes et testostérone), le cholécalciférol (vitamine D<sub>3</sub>), le facteur nucléaire NF-κB et les sels biliaires. Dans l'alimentation, le cholestérol est exclusivement apporté par les produits animaux. Le cholestérol alimentaire est retrouvé en grande quantité dans les œufs, le beurre, la viande rouge et les abats. Dans les végétaux, les phytostérols, des molécules de la même famille que le cholestérol, sont présentes en faible quantité et ont comme propriété la capacité à limiter l'absorption du cholestérol alimentaire.

L'excès de cholestérol est néfaste pour la santé, il serait à l'origine d'un infarctus sur deux et d'après la Fédération Française de Cardiologie, près de 20% de la population adulte française présenterait une hypercholestérolémie. La synthèse comme l'absorption du cholestérol font l'objet d'une régulation fine permettant d'assurer un niveau stable de cholestérol dans l'organisme.

Chez l'homme, le taux de cholestérol total (taux de cholestérol HDL et LDL ainsi que 1/5<sup>ème</sup> du taux de TG) doit être inférieur à 2 g/L. Le taux de cholestérol LDL ne doit pas dépasser 1,6 g/L. Pour une protection optimale du cœur, le taux de cholestérol HDL doit être supérieur à 0,45 g/L (Fédération Française de Cardiologie).

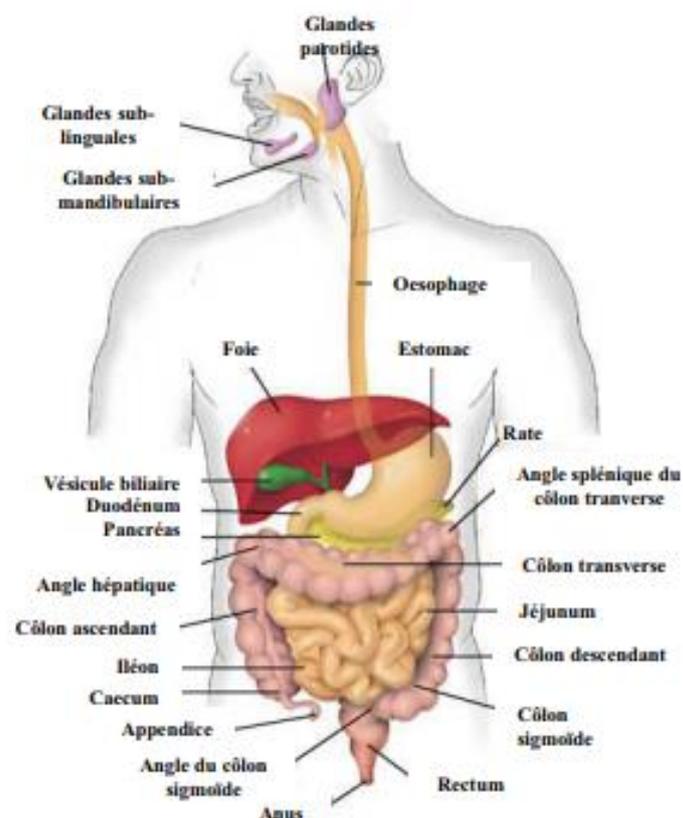
## **1.2. Physiologie de la digestion**

### *1.2.1. Généralité*

La digestion est un processus séquentiel complexe qui commence dès l'ingestion de l'aliment. Elle permet la transformation mécanique et chimique des aliments en nutriments assimilables ou non par l'organisme. La digestion est assurée par le tube digestif d'une longueur de 7 mètres chez l'homme et comprenant : la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléum), le côlon (caecum et appendice, côlon ascendant,

côlon transverse, côlon descendant et sigmoïde, le rectum) et l'anus. Au tube digestif sont associés des organes annexes comme les dents, la langue, les glandes salivaires, le pancréas, le foie et la vésicule biliaire (Figure 4). Une des fonctions principales de l'appareil digestif est de réduire les macromolécules des aliments en composés de tailles plus faibles et plus hydrosolubles permettant leur assimilation. Les protéines sont dégradées en peptides puis en acides aminés par des enzymes protéolytiques (pepsine, cathepsine, trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidase, aminopeptidase et dipeptidase) et les lipides convertis en acides gras par des lipases (linguale, gastrique et pancréatique) et les carbohydrates en oses simples par des glycosidases (amylase, maltase, saccharase, invertase et lactase).

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité de la digestion : l'acidité stomacale, la vidange gastrique, le taux de sécrétion des différentes enzymes digestives, le pH de l'intestin grêle, la durée du transit intestinal et la flore microbienne en sont des exemples. *In vitro*, les systèmes de digestion simulés se sont révélés être des outils adaptés pour comprendre les processus complexes impliqués pendant la digestion (Guerra et al., 2012).

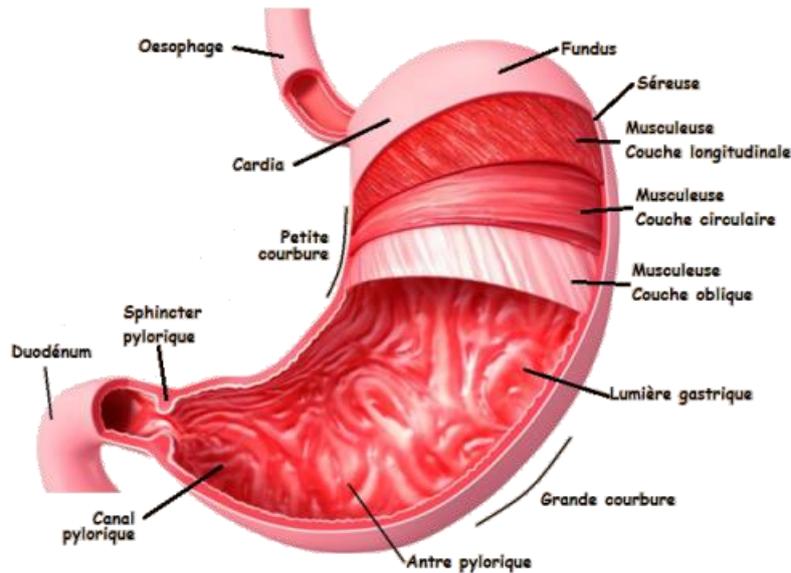


**Figure 4 :** Représentation du tube digestif avec les organes annexes.

Le tube digestif étant ininterrompu de la bouche à l'anus, la lumière est en continuité avec l'environnement extérieur. La paroi comporte 4 couches qui sont de la lumière intestinale vers les couches les plus profondes : une muqueuse, une sous-muqueuse, une musculuse externe et une séreuse.

➤ L'estomac

Chez l'adulte, l'estomac mesure 15 cm de haut et son volume varie de 0,5 litre à jeun jusqu'à 4 litres en période post-prandiale. Il se compose de trois parties distinctes ayant des fonctions physiologiques différentes (Figure 5). Le cardia, qui est la région située en sortie d'œsophage, sécrète du mucus et favorise ainsi l'hydratation du bol alimentaire. Le fundus, qui est la région pointant sous le diaphragme à proximité du cardia, sécrète les sucs gastriques contenant les enzymes digestives et l'acide chlorhydrique alors que l'antrum, situé dans la partie inférieure, génère des forces mécaniques pour mélanger le contenu gastrique et le faire avancer (Lundin et al., 2008; Marciari et al., 2006). Le sphincter pylorique permet le passage vers le duodénum de particules alimentaires de taille millimétrique. Le bol alimentaire comprend les aliments et des sécrétions telles que la salive qui apporte notamment l' $\alpha$ -amylase, les enzymes digestives (pepsine, lipase gastrique), des protéines glycosylées (mucines) et des électrolytes. La mucine forme un réseau de type gel qui protège la paroi gastrique des sécrétions acides et de l'activité protéolytique de la pepsine (Singh and Sarkar, 2011). Les lipides alimentaires sont émulsifiés par péristaltisme dans l'estomac sous forme de gouttelettes de 1 à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre (Armand et al., 1994).



**Figure 5** : Anatomie de l'estomac.

Le pH de l'estomac est autour de 2 en condition de jeûne. Une étude a montré qu'après l'ingestion d'une boisson à base de cacao, le pH gastrique atteint 5,4 après 3 minutes (Rios et al., 2002) avant de décroître linéairement pour atteindre un pH basal de 1,9. Par ailleurs, la consommation d'un repas liquide de 600 mL additionné d'une purée de carottes, ou d'une purée de tomates ou d'épinards hachés, conduit à une augmentation brusque du pH gastrique de 2 à 5,4 – 6,2 suivie d'une diminution progressive pour revenir à 1,8 – 2,9 après 3 heures de digestion (Tyssandier et al., 2003).

Le temps de passage dans l'estomac varie de quelques minutes à quelques heures selon notamment la quantité, l'état physique de l'aliment et l'individu (McClements and Li, 2010). Une régulation rétroactive basée sur les nutriments présents dans l'intestin grêle limite la vidange gastrique à un maximum d'environ 3 kcal/min (Kwiatek et al., 2009). Une autre étude a montré que la vidange gastrique était plus rapide pour les graisses émulsionnées que pour le glucose et les protéines (Goetze et al., 2007). De plus, la présence des fibres alimentaires ralentit la vidange gastrique lors d'un repas complexe (Marciani et al., 2001). La taille maximale des particules alimentaires passant du pylore vers l'intestin grêle est d'1 à 2 mm. Les autres sont dégradées jusqu'à cette taille pour pouvoir passer.

## ➤ L'intestin

A ce niveau, le bol alimentaire ou chyme arrive dans le duodénum qui est le premier segment de l'intestin grêle. Le bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) duodénal permet de neutraliser l'acidité du chyme et d'obtenir un pH optimal pour l'activité des enzymes intestinales (entre 6 et 8). Les glycosidases et les protéases pancréatiques agissent pour dégrader les constituants glucidiques et protéiques de l'aliment. La bile, un mélange complexe de sels biliaires, de cholestérol et de bilirubine, produite par le foie joue un rôle spécifique dans la digestion des lipides via leur intégration à la surface des gouttelettes lipidiques, structures de taille micrométrique à l'interface desquelles se déroule la lipolyse pancréatique. Les sels biliaires sont dans un premier temps à la surface de la gouttelette lipidique (émulsion), leur présence va permettre à la lipase pancréatique et à la colipase de s'ancrer à la surface de la gouttelette pour induire la lipolyse. En parallèle d'autres sels biliaires forment des micelles (micelles simples) qui vont servir d'accepteur des produits de la lipolyse et donc devenir des micelles mixtes.

L'épithélium intestinal est une barrière interactive et dynamique limitant l'accès des bactéries, parasites et virus vers l'hôte. Il est composé d'entérocytes qui ont pour fonction l'absorption des nutriments de manière souvent active et régulée. Les cellules épithéliales intestinales sont renforcées par une couche de glycocalyx et de mucus épais, sécrétés par les cellules caliciformes et contenant de grandes concentrations de peptides anti-microbiens. De plus, des cellules M induisent le passage de macromolécules et de microorganismes de la lumière intestinale vers les cellules immunitaires sous-jacentes. Il est à noter également la présence de cellules neuroendocrines.

L'épithélium est organisé en villosités augmentant la surface de contact entre l'épithélium et la lumière intestinale. Les cryptes de Lieberkühn où sont localisées les cellules souches intestinales assurent le renouvellement des cellules épithéliales intestinales ainsi que les cellules de Paneth, responsables entre autres de la synthèse de défensines (peptides anti-microbiens). Les cellules épithéliales forment une monocouche polarisée reposant sur la lamina propria *via* leur pôle basolatéral et sont étroitement liées par des jonctions serrées.

Le bol alimentaire contenant les résidus non absorbés au niveau de l'intestin grêle se retrouve au niveau du côlon où a lieu l'absorption de l'eau et des électrolytes, la fermentation des polysaccharides et des protéines par le microbiote, la réabsorption des sels biliaires ainsi que la formation, le stockage et l'élimination des fèces (Guerra et al., 2012).

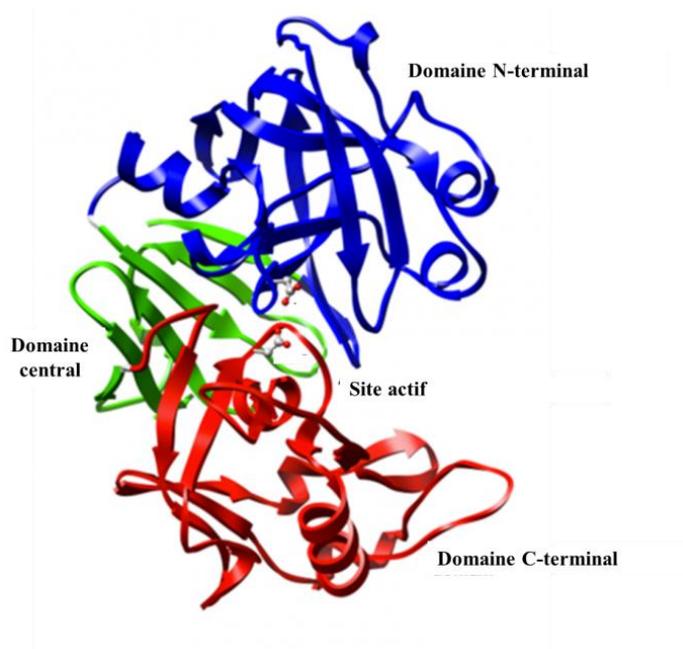
## 1.2.2. Une protéase gastrique : la pepsine

### 1.2.2.1. Structure et activité de la pepsine

La pepsine est la première enzyme du règne animal à avoir été découverte par le physiologiste allemand Theodor Schwann en 1836. La pepsine est une endoprotéase constituée de 327 acides aminés dont 5 tryptophanes en positions 39, 141, 181, 190 et 300. Elle est présente dans le suc gastrique et hydrolyse les liaisons peptidiques engageant des acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine) au niveau de leur fonction amine. Cette spécificité n'est pas toujours observée puisque des coupures au niveau de la leucine ont été mises en évidence. Le pH optimum de la pepsine est situé entre 1,8 et 4,4 (activité minimale à pH 5) et sa température optimale d'activité est située entre 37 et 42 °C. La pepsine est constituée d'un haut pourcentage de résidus acides (43 sur 327) la rendant stable et très active même à pH 1. L'activité de la pepsine dépend de la quantité de substrat protéique présent dans le milieu, plus le ratio enzyme/substrat est élevé, plus l'enzyme est efficace (Wu et al., 2006). La multiplicité des sites de clivage implique que les peptides produits soient généralement compris entre 3 et 30 résidus (Zhang and Smith, 1993).

La pepsine est synthétisée sous forme de pepsinogène (zymogène inactif) par les cellules principales de l'estomac où elle est stockée dans les vésicules enzymatiques d'où elle sera excrétée lors de la digestion. Le pepsinogène contient 44 résidus supplémentaires au niveau du domaine N-terminal de la protéine. La présence du propeptide inhibe l'activité enzymatique en bloquant l'accès aux aspartates catalytiques. L'activation du pepsinogène en pepsine advient par l'action d'une hydrolyse acide par l'acide chlorhydrique présent dans le milieu gastrique (James and Sielecki, 1986).

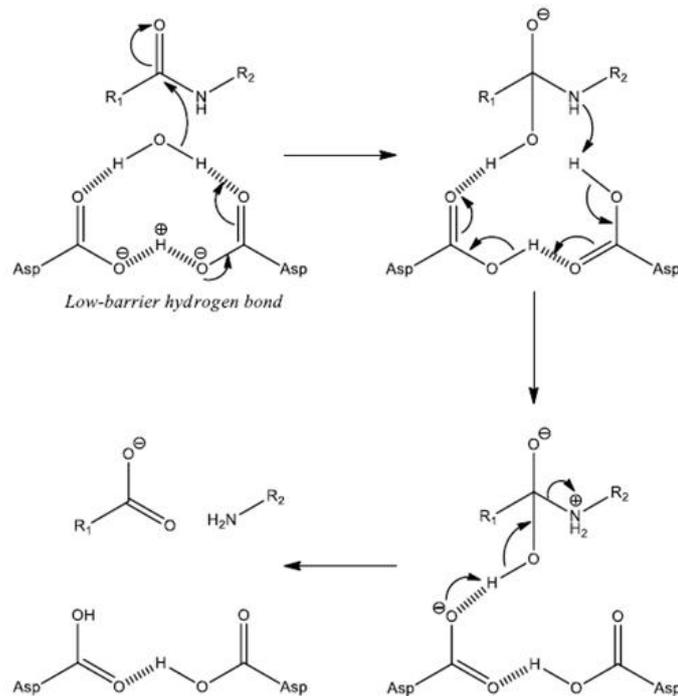
La pepsine présente trois différents domaines, dont un domaine central composé d'un feuillet  $\beta$  antiparallèle à 6 brins, situé derrière le site catalytique. Les deux autres domaines sont respectivement les lobes N-terminal et C-terminal, constitués de 142 et 123 résidus. Ces deux lobes présentent des structures secondaires et tertiaires distinctes. De plus, la pepsine contient un court peptide interdomaine à proximité du feuillet  $\beta$ . La structure secondaire de la pepsine est riche en brins  $\beta$ . La fente du site actif est présente de part et d'autre des deux résidus aspartates catalytiques (Zhang et al., 2012) (Figure 6).



**Figure 6 :** Structure de la pepsine.

#### 1.2.2.2. Mécanisme d'action de la pepsine

Brièvement, le mécanisme d'action de la pepsine repose sur la formation d'une structure cyclique à 10 atomes avec les deux résidus d'aspartates et une molécule d'eau (Northrop, 2001). Le processus catalytique commence lorsque le complexe adopte la bonne conformation. Un proton est soustrait de la molécule d'eau liée formant un ion hydroxyde qui attaque la fonction carbonyle de la liaison peptidique du substrat. Ensuite, un proton est transféré sur l'atome d'azote de la liaison peptidique et le complexe s'ouvre pour libérer les deux parties peptidiques (Figure 7).



**Figure 7** : Mécanisme catalytique de la protéase aspartique (adapté de Northrop, 2001).

### 1.2.3. Digestion des lipides

Quotidiennement, notre alimentation apporte différents lipides représentant 30 à 40% de l'apport énergétique. Un adulte ingère entre 60 et 150 g de TG, 2 à 8 g de phospholipides (principalement des lécithines) et 0,2 à 0,8 g de cholestérol libre ou estérifié (Carey et al., 1983). La biodisponibilité des lipides est rendue possible par des processus complexes impliquant l'émulsification des lipides dans le milieu aqueux du système digestif, l'hydrolyse des lipides par la lipase gastrique ou pancréatique, la solubilisation des produits de la lipolyse dans des micelles mixtes qui permettent leur absorption et leur transport plasmatique vers les cellules par des lipoprotéines (Fave et al., 2004).

L'émulsification des lipides en gouttelettes lipidiques dans le milieu aqueux stomacal est permise par les contractions péristaltiques antrales et la présence de molécules amphiphiles comme les phospholipides, les protéines et les acides gras libres. Les gouttelettes lipidiques présentent alors une distribution monomodale avec la moitié des diamètres compris entre 1 et 10  $\mu\text{m}$  (Carey et al., 1983).

La lipase gastrique a un rôle essentiel dans la digestion des lipides car elle participe à l'hydrolyse d'une partie des triglycérides ingérés et favorise donc le processus d'émulsification, conditionnant l'activité de la lipase pancréatique dans le duodénum. La lipase gastrique est sécrétée directement sous forme active pendant la digestion (Carriere et al., 1993), c'est une protéine globulaire présentant une seule chaîne polypeptidique de 379 résidus. Elle possède également une partie polysaccharidique (12 à 15% de la masse totale), un seul pont disulfure (cystéines 227 et 236) et une triade catalytique classique des hydrolases à sérine (Ser153-His353-Asp324) (Hamosh, 1990). La lipase gastrique humaine présente une stabilité et une activité pour des pH compris entre 2 et 7 avec un optimum entre 4 et 5,4 (Sams et al., 2016). Elle résiste à l'action de la pepsine mais elle est sensible aux protéases pancréatiques (trypsine et chymotrypsine (Hamosh, 1990). La lipase gastrique permet l'hydrolyse de la liaison ester de toutes les positions des TG, avec une stéréospécificité pour la position *sn*-3, en libérant un acide gras (Sams et al., 2016). La contribution de la lipolyse gastrique a été estimée entre 5 à 40% de la lipolyse totale (Armand et al., 1996; Armand et al., 1999; Carriere et al., 1993).

La lipolyse gastrique est à l'origine de trois phénomènes durant la digestion :

1) l'émulsification des lipides par la mise en place d'une interface lipide/eau grâce aux produits tensioactifs (acides gras libres et diglycérides) (Armand et al., 1994) issus de l'hydrolyse des TG.

2) La production d'une source d'énergie en libérant des acides gras hydrophiles, ionisés ou non, à chaînes courtes et moyennes (Carey et al., 1983) absorbés par diffusion passive à travers la muqueuse gastrique (Hamosh et al., 1989) ou duodénale (Mu and Hoy, 2000).

3) Le conditionnement de l'activité ultérieure de la lipase pancréatique. En effet, la taille des globules lipidiques (comprise entre 2 et 20  $\mu\text{m}$  après la phase gastrique), a un effet direct sur l'activité de la lipase pancréatique. Les acides gras libérés dans l'estomac stimulent la sécrétion de la cholécystokinine par la muqueuse duodénale. Cette hormone a pour rôle de réduire la vidange gastrique et d'activer la sécrétion du suc pancréatique (Hamosh, 1990). Les acides gras libérés dans l'estomac diminuent également la phase de latence qui précède l'activation du complexe lipase/colipase pancréatique. Les diglycérides, produits lors de la lipolyse gastrique, sont plus facilement et plus rapidement hydrolysés par la lipase pancréatique.

Elle est inhibée par les acides gras à longue chaîne qu'elle génère, car ils sont sous forme protonée à pH acide, formant alors des protubérances à la surface des gouttelettes lipidiques qui gênent l'activité de l'enzyme (Pafumi et al., 2002). Ce phénomène de lipolyse des acides gras

se produit pour une concentration d'acide gras supérieure à 120  $\mu\text{moles}/\text{m}^2$  d'interface lipidique (Armand et al., 2004). Par ailleurs, les gouttelettes lipidiques de taille inférieure à 1  $\mu\text{m}$  présentent une surface interfaciale plus étendue (20,3  $\text{m}^2/\text{g}$  de lipides) que les gouttelettes de plus grandes tailles (1,4 à 0,7  $\text{m}^2/\text{g}$  de lipides pour diamètres de 10 à 50  $\mu\text{m}$ ) ce qui favoriseraient l'activité de la lipase gastrique *in vivo* (Armand et al., 1996; Fave et al., 2004).

Dans le duodénum, la lipase pancréatique hydrolyse les tri- et les diglycérides des gouttelettes lipidiques en présence de sels biliaires et de colipase. La lipase pancréatique hydrolyse en position sn-1 ou sn-3 entraînant la formation d'acides gras libres et de monoglycérides en position sn-2, qui seront transportés dans le chyle par les micelles mixtes jusqu'à la bordure en brosse des entérocytes pour l'absorption. La colipase est un cofacteur protéique de la lipase pancréatique, issue d'une procolipase activée par la trypsine. La colipase est liée à la lipase pancréatique par l'extrémité C-terminale de la lipase.

Les phospholipides sont hydrolysés dans l'intestin grêle par action de la phospholipase A2 pancréatique qui coupe l'acide gras en position sn-2 libérant un acide gras et un lysophospholipide. La lipase pancréatique peut également être accompagnée de la phospholipase A1 libérant l'acide gras en position sn-1.

Les esters de cholestérol d'origine alimentaire sont, quant à eux, hydrolysés par une autre enzyme pancréatique, la carboxyl ester lipase qui est une lipase dépendante des sels biliaires. Le cholestérol ainsi libéré est absorbable au niveau des entérocytes.

### 1.3. Processus d'oxydation lipidique

L'oxydation lipidique est un phénomène biologique normal lorsqu'elle est sous contrôle enzymatique (ex : cyclo-oxygénase et lipoxygénase). L'oxydation lipidique peut se dérouler au niveau cellulaire de manière régio- et/ou stéréo-sélective pour former des composés de signalisation cellulaire. Deux familles d'enzymes sont principalement responsables de ces processus d'oxydation :

➤ La cyclo-oxygénase qui est une enzyme hémérique catalysant la bis-oxygénation de l'acide arachidonique et de l'EPA en eicosanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes). Les eicosanoïdes sont synthétisés au niveau de la membrane cellulaire et possèdent une grande variété d'actions biologiques comme la régulation de la contraction musculaire lisse et de l'agrégation plaquettaire ou encore la médiation de la réaction inflammatoire.

➤ La lipoxygénase qui est une enzyme à fer non hémérique catalysant l'oxydation des AGPI présentant un motif 1,4-pentadiénique. Cette réaction appliquée à l'acide arachidonique et à l'EPA est une étape clé dans la biosynthèse des leucotriènes.

Il existe par ailleurs un processus d'oxydation non enzymatique, plus connu sous le terme d'auto-oxydation, qui est responsable de nombreux effets délétères au sein des matrices alimentaires comme dans les systèmes biologiques (ex : oxydation par le radical anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ ).

Dans le cadre de l'alimentation, l'oxydation peut avoir deux origines différentes :

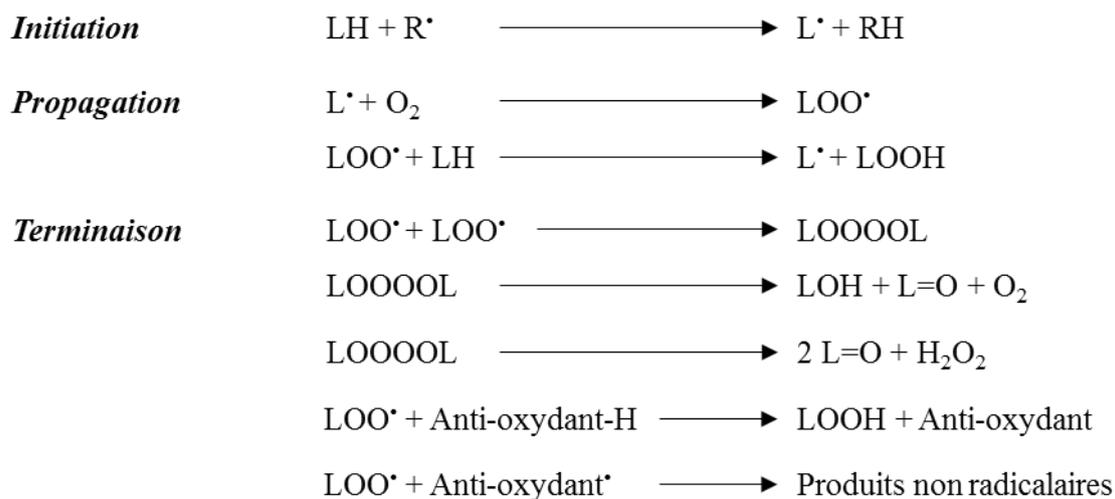
1) une origine exogène au cours des procédés de transformation, du stockage et de la cuisson des aliments riches en lipides polyinsaturés avec une détérioration affectant leur qualité nutritionnelle et sensorielle (rancissement, brunissement, modification de texture, etc.).

2) Une origine endogène en réponse à un stress oxydant d'origine nutritionnelle et causant des dommages aux lipides d'importance biologique (membranes cellulaires, organites, lipoprotéines, etc.). Ces modifications peuvent affecter le bon fonctionnement physiologique et être à l'origine de pathologies neurodégénératives et cardiovasculaires.

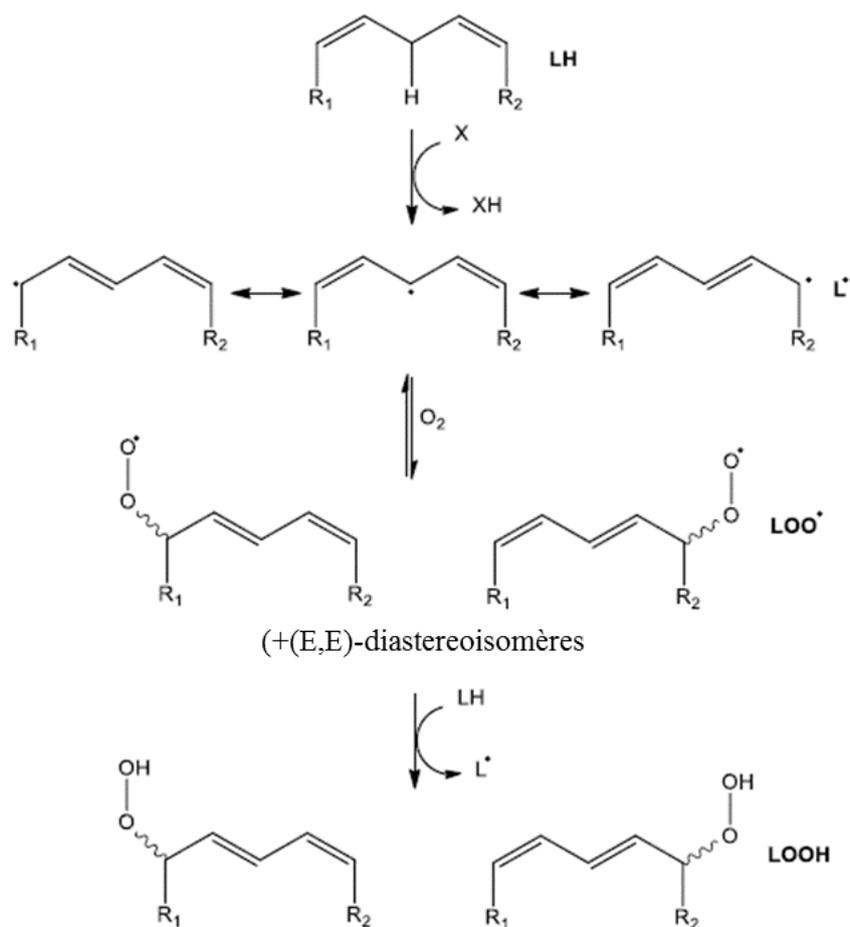
### 1.3.1. Auto-oxydation des lipides

Les AGPI sont les cibles majeures de l'attaque des radicaux libres dans les matrices alimentaires ou dans les systèmes biologiques. Ce phénomène se produit quelle que soit la classe lipidique (TG, phospholipides, acides gras libres, esters de cholestérol, etc.) et l'environnement supramoléculaire (huiles, membranes, émulsions, micelles). Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) peuvent amorcer l'auto-oxydation des AGPI. Les ERO peuvent comprendre des formes partiellement réduites de l'oxygène telles que l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), les radicaux hydroxyles ( $HO^{\cdot}$ ), peroxydes ( $ROO^{\cdot}$ ) et alcoxydes ( $RO^{\cdot}$ ), qui sont des intermédiaires typiques de l'auto-oxydation des AGPI.

L'auto-oxydation des AGPI (LH) constitutifs des lipides est initiée par la soustraction d'un hydrogène bis-allylique formant ainsi un radical stable  $L^{\cdot}$  dans lequel les électrons sont délocalisés sur 5 atomes de carbone (Kubow, 1992). Dans la phase de propagation, une molécule de dioxygène réagit avec le radical  $L^{\cdot}$  pour former un radical peroxyde  $LOO^{\cdot}$  instable. Ce nouveau radical peut soustraire un atome d'hydrogène labile d'une autre chaîne d'AGPI propageant ainsi la réaction radicalaire en chaîne et formant les hydroperoxydes lipidiques ( $LOOH$ ) qui sont les produits primaires de l'oxydation lipidique (Figure 8). Les hydroperoxydes lipidiques sont sous la forme de divers régioisomères résultant de l'addition de l'oxygène sur les carbones 1 et 5 du motif pentadiényle (Figure 9). Chaque régioisomère peut exister à travers deux diastéréoisomères après rotation de la double liaison en alpha de la liaison C-O ou des 2 doubles liaisons. La phase de propagation est limitée par la disponibilité de ces lipides. Dans l'auto-oxydation à 60 °C de monocouches d'acide linoléique, il a été estimé que chaque radical  $L^{\cdot}$  formé donnait lieu à 8 à 14 cycles de propagation (Pryor, 1982) contrairement à l'oxydation enzymatique où le radical  $LOO^{\cdot}$  séquestré dans le site catalytique subit la réduction mono-électronique pour produire un seul  $LOOH$ .



**Figure 8** : Schéma général de l'auto-oxydation des AGPI.

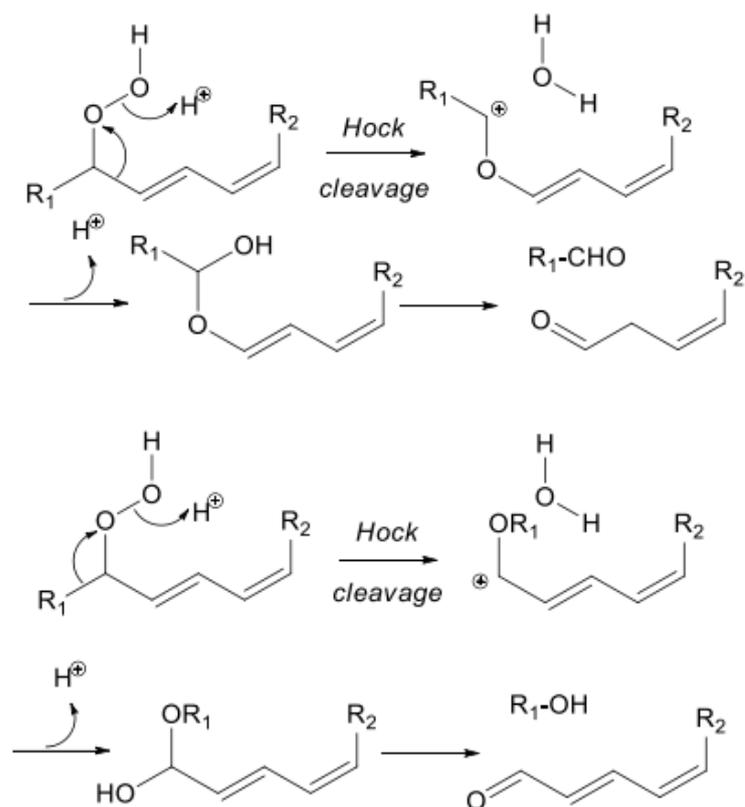


**Figure 9** : Formation des produits primaires d'auto-oxydation des AGPI.

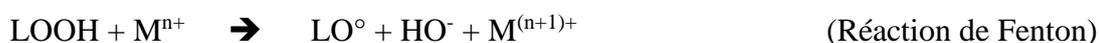
La dernière phase ou terminaison est caractérisée soit par une combinaison de deux radicaux  $\text{LOO}^\bullet$  pour former des composés non-radicalaires de type alcools (LOH) ou cétones ( $\text{L}=\text{O}$ ), soit par le transfert d'un électron ou d'un atome H à partir d'un antioxydant lipophile sur le  $\text{LOO}^\bullet$  pour former un LOOH (Figure 8).

Les AGPI possédant plus de deux doubles liaisons  $\text{C}=\text{C}$  entraînent la formation de produits plus complexes par la cyclisation rapide des radicaux peroxydes et la fermeture de cycle à 5 carbones (Jahn et al., 2008). L'acide  $\alpha$ -linoléique, l'EPA et le DHA sont respectivement à l'origine des phyprostanes, des isoprostanes et des neuroprostanes, qui ont été identifiés dans divers fluides biologiques (urine, plasma, fluide cérébrospinal) et tissus (muscle, foie) (Dupuy et al., 2016).

La formation des produits primaires de l'auto-oxydation est suivie par un ensemble complexe de réactions chimiques conduisant aux produits d'oxydation secondaires. Les hydroperoxydes lipidiques peuvent être clivés thermiquement comme par exemple lors du clivage de Hock en condition acide (Figure 10), ou en présence d'ions métalliques de transition (réaction de Fenton) pour former des radicaux alcoxydes  $\text{LO}^\bullet$ .



**Figure 10** : Clivage de Hock des hydroperoxydes (Asprogenidi, 2015).



De plus, des radicaux carbonés peuvent apparaître suite à l'addition de  $\text{LO}^\bullet$  sur des doubles liaisons  $\text{C}=\text{C}$ , appartenant plus particulièrement aux diènes conjugués. Enfin, les radicaux hydroperoxydes peuvent subir une scission au niveau d'une liaison  $\text{C}-\text{C}$  de chaque côté du radical pour former des radicaux  $\text{C}$ -centrés, source ultérieure de composés secondaires comme des alcools, des aldéhydes, des époxydes, des alcanes, des alcènes et des acides carboxyliques (Frankel, 1984).

Parmi les aldéhydes, on distingue les aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés, des composés de 3 à 9 carbones issus de la fragmentation des hydroperoxydes lipidiques pour leur caractère électrophile (Cheng and Li, 2007). Ils comprennent notamment le 4-HNE issu spécifiquement de l'oxydation de l'acide linoléique.

Pour finir, l'auto-oxydation lipidique peut impacter les protéines voisines dans les membranes, les lipoprotéines et les émulsions par deux mécanismes (Dangles, 2012) :

1) le caractère électrophile de certains produits d'oxydation lipidique comme les époxydes et les aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés permet des réactions de couplage covalent avec des résidus de protéines nucléophiles comme la lysine, l'histidine et la cystéine.

2) Le caractère fortement oxydant des radicaux peroxydes lipidiques permet d'oxyder des résidus protéiques (methionine, cystéine, tryptophane, tyrosine et lysine).

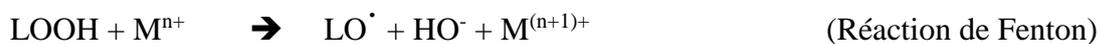
### 1.3.2. *L'oxydation lipidique amorcée par le fer d'origine alimentaire*

*In vivo*, l'estomac a été qualifié de bioréacteur par Kanner et Lapidot (Kanner and Lapidot, 2001) où toutes les conditions sont réunies pour favoriser l'oxydation des lipides alimentaires. Le pH est faiblement acide, l'oxygène est présent, et diverses formes de fer pro-oxydantes sont apportées par l'alimentation : comme les ions fer ( $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ) par les aliments d'origine végétale et le fer héminique par les produits animaux. Un stress oxydant d'origine postprandial peut résulter de l'apport excessif d'énergie (lipides saturés et sucres simples) mais aussi de la réaction dans le tractus gastro-intestinal entre des lipides polyinsaturés et les diverses formes de fer (héminique vs. non-héminique). Une étude pionnière a montré *in vitro* que la co-incubation de viande rouge homogénéisée et d'acide linoléique dans un fluide gastrique simulé générait la formation d'hydroperoxydes lipidiques et de malondialdéhyde (Lapidot et al., 2005). L'hypothèse d'un stress post-prandial a ensuite été étayée *in vitro* par des travaux de l'équipe Micronutriments de l'INRA SQPOV (Avignon). L'état physique des lipides au cours de la digestion gastrique y était simulé par des émulsions d'huile de tournesol dans de l'eau et le stress oxydant y était apporté par la métmyoglobine, principale forme de fer héminique de la viande rouge, ou du fer libre  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Il a ainsi été montré que des diènes conjugués lipidiques, des aldéhydes et des alcools à courtes chaînes étaient produits simultanément (Lorrain et al., 2010). Enfin, il a été montré *in vivo*, chez le mini-porc, qu'un repas de type occidental à base d'huile de tournesol et de bœuf haché conduisait à la formation de diènes conjugués lipidiques, de malondialdéhyde et de 4-HNE au cours de la digestion gastrique (Delosiere et al., 2016; Gobert et al., 2014).

### 1.3.2.1. Mécanismes de l'oxydation lipidique initiée par le fer héminique et non héminique

Les métaux de transition, comme le fer, le cobalt et le cuivre, présents dans notre organisme et dans l'alimentation, existent dans des états multivalents. L'activité catalytique des ions métalliques est très dépendante de leur état de complexation. Ils sont pro-oxydants en raison de leur capacité à décomposer les hydroperoxydes en radicaux libres (Lorrain et al., 2010; McClements and Decker, 2000).

Réaction rapide pour le fer ( $k = 1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) (Oueslati et al., 2018)



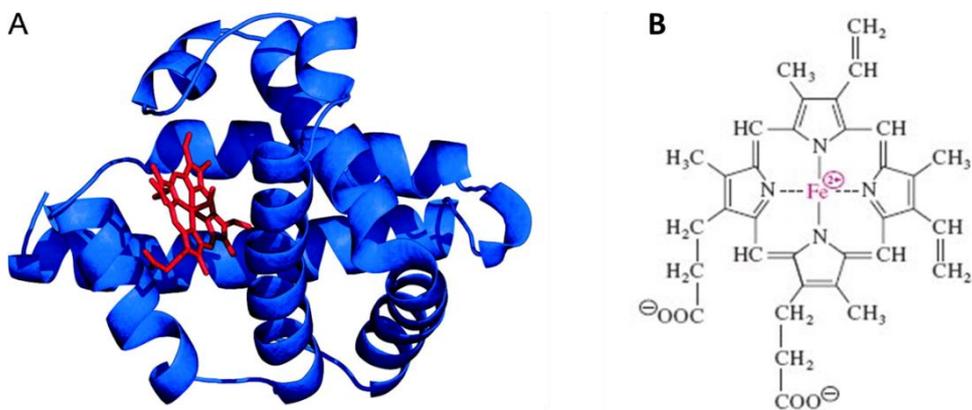
Réaction lente pour le fer ( $k = 35 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) (Bechaux et al., 2018)



Bien que les ions cuivre, cobalt, manganèse soient efficaces sur les acides gras purs ou en émulsion, les ions fer sont connus comme étant les plus efficaces au cours de la digestion sur les lipides alimentaires. La viande rouge est riche en fer héminique provenant des protéines globulaires, l'hémoglobine et la myoglobine, qui sont responsables du transport du dioxygène dans les globules rouges et les cellules musculaires respectivement, ainsi qu'en fer non héminique avec la ferritine (protéine de fer ferrique). Parmi les viandes rouges, le bœuf est une des sources les plus riches en fer avec une quantité totale comprise entre 20 et 29  $\mu\text{g/g}$  de viande dont plus de 80% est sous forme héminique (Lombardi-Boccia et al., 2002). Une quantité faible de fer libre peut être libérée (à partir de la partie protéique) après cuisson ou stockage. Les fruits, les légumes et les céréales sont les principales sources alimentaires de fer libre. Lors d'un repas standard et en prenant en compte un volume stomacal d'un litre, la concentration totale de fer héminique et de fer libre peut dépasser 35  $\mu\text{M}$  (Lorrain et al., 2012).

La myoglobine est une hémoprotéine monomérique intracellulaire des cellules musculaires de 154 résidus. Elle contient une protoporphyrine IX complexée avec un cation de fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) hexavalent formant quatre liaisons avec les 4 atomes d'azote de l'hème, une cinquième liaison avec un atome d'azote de la chaîne latérale d'un résidu histidine de l'hélice F et une

sixième liaison restant vacante pour recevoir l'oxygène (histidine distale). La partie protéique (ou globine) comprend huit régions où la chaîne peptidique adopte une structure en hélice  $\alpha$  notées A, B, C, D, E, F, G, H et qui représentent 75% des acides aminés de la protéine. Le groupement hème prosthétique est situé entre l'hélice E et F et le fer est lié à l'histidine F8 (histidine proximale). Lors de la cuisson ou en condition post-mortem, la viande prend une teinte brune provenant de l'oxydation de sa myoglobine ( $\text{MbFe}^{\text{II}}$ ), en métmyoglobine ( $\text{MbFe}^{\text{III}}$ ) dans laquelle le cation fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) passe à l'état d'oxydation 3 ( $\text{Fe}^{3+}$ , fer ferrique) (Figure 11).

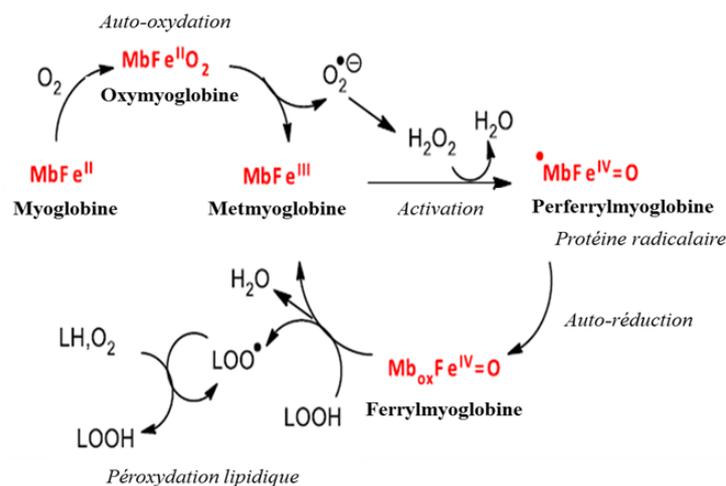


**Figure 11** : Structure de la myoglobine.

A : structure de la myoglobine, en bleu : la globine (hélices), en rouge : groupement hémique; B : structure chimique de la protoporphyrine IX- $\text{Fe}^{\text{II}}$ .

Durant l'auto-oxydation post-mortem de la myoglobine, du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) est produit. Le  $\text{H}_2\text{O}_2$  active la métmyoglobine en perferrylmyoglobine radicalaire très instable ( $\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) qui est rapidement converti en ferrylmyoglobine ( $\text{Mb}_{\text{ox}}\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ). La décomposition des traces d'hydroperoxydes ( $\text{LOOH}$ ), inhérentes aux lipides polyinsaturés, par la ferrylmyoglobine, conduit à la formation à l'intérieur des gouttelettes lipidiques des radicaux peroxydes lipidiques  $\text{LOO}^{\bullet}$  initiant ainsi le mécanisme de réaction en chaîne radicalaire détaillé précédemment (Figure 12).





**Figure 12 :** Cycle redox des différentes espèces de myoglobine à pH 5,5 (adapté de Baron and Andersen, 2002).

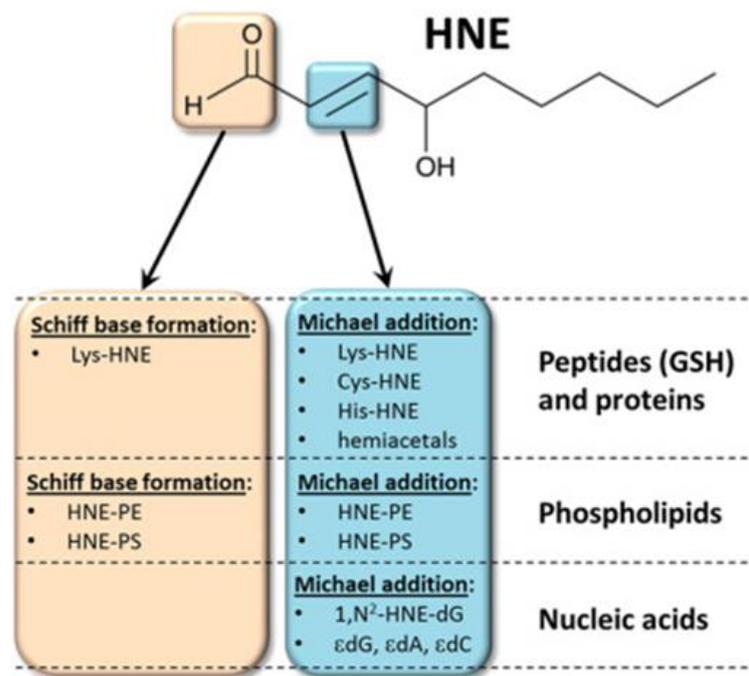
Enfin, la charge des émulsifiants est un des principaux facteurs influençant l'intensité de l'oxydation en régissant les forces d'attraction ou de répulsion des ions métalliques. La taille des gouttelettes lipidiques, le pH ou la présence de protéines, de phospholipides et d'antioxydants dans la phase aqueuse peuvent également influencer l'oxydation lipidique (Asprogenidi, 2015). Les gouttelettes lipidiques de petites tailles sont plus rapidement oxydées du fait d'une surface interfaciale plus importante (Jacobsen et al., 2000).

### 1.3.2.2. Produits d'oxydation lipidique secondaires

Des centaines de produits de dégradation, qui peuvent être volatils ou non volatils, ont été identifiés dans les huiles végétales culinaires et notamment dans l'huile de tournesol (Goicoechea and Guillen, 2010). La grande majorité de ces produits sont des aldéhydes issus de la coupure des hydroperoxydes en petits fragments de 3 à 9 carbones. Parmi les 2-alcénals, le 4-HNE est l'aldéhyde le plus couramment généré durant l'oxydation lipidique. Le 4-HNE est un produit d'oxydation secondaire spécifique de l'oxydation des AGPI n-6 (acides linoléique et arachidonique) et il contribue aux effets délétères de l'oxydation lipidique notamment au niveau cardiovasculaire. L'oxydation des AGPI n-3 génère, quant à elle, un composé proche du 4-HNE, le 4-hydroxy-2-hexéanal. D'autres aldéhydes, très réactifs, sont également formés par l'oxydation de l'acide linoléique et de l'acide arachidonique comme l'hexanal, le glyoxal et le

malondialdéhyde dont la concentration peut atteindre 300  $\mu\text{M}$  dans la viande et le poisson (Kanner, 2007).

Le 4-HNE est un hydroxyalkenal  $\alpha,\beta$ -insaturé électrophile possédant deux sites hautement réactifs pour des groupes nucléophiles appartenant à différents composés comme les protéines, les phospholipides et les bases nucléiques (Figure 13). La réactivité est due à la présence de trois groupes fonctionnels réactifs : un groupe carbonyle C1, la double liaison entre C2 et C3 et le groupe hydroxyle en C4. Les carbones 1 et 3 sont électrophiles et le C1 est aussi un centre redox. Le groupe aldéhyde en C1 réagit en formant une base de Schiff. La double liaison activée C2=C3 permet une addition dite de Michael sur le C3 pour les groupes amino libres de la lysine, pour l'imidazole de l'histidine et le groupe thiol de la cystéine (Owens et al., 2004; Uchida and Stadtman, 1992). Les bases de Schiff sont formées plus lentement et leur réversibilité suggère que les adduits les plus stables résultent de l'addition de Michael (Schaur, 2003).



**Figure 13 :** Représentation de la réactivité du 4-HNE (Luczaj et al., 2017).

### 1.3.3. Oxydation et produits d'oxydation du cholestérol

L'oxydation du cholestérol alimentaire est possible du fait de la présence d'une double liaison sur le carbone 5 du cycle B, de manière exogène ou endogène (ERO, oxydation enzymatique, photosensibilité), en formant de nombreux produits d'oxydation appelés oxystérols.

Des oxystérols ont été retrouvés en concentration élevées dans le plasma et dans les plaques d'athérome des patients hypercholestérolémiques (Lemaire et al., 1998). Les premiers produits oxystérols sont des hydroperoxydes (LOOH) principalement en position 5 et 7 qui génèrent par réduction/oxydation le 7 $\alpha$ -hydroxycholestérol, le 7 $\beta$ -hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol. La formation des dérivés époxydés (5,6 $\alpha$ -époxycholestérol, 5,6 $\beta$ -époxycholestérol) est induite par réaction entre un radical hydroperoxyde et un cholestérol. Les oxystérols, présentant une chaîne latérale, ont généralement une origine enzymatique à l'exception du 25-hydroxycholestérol et du 7 $\alpha$ -hydroxycholestérol qui peuvent être induit par les 2 voies (enzymatique ou non enzymatique). Parmi les oxystérols, le 7-cétocholestérol est souvent utilisé comme marqueur de l'oxydation du cholestérol dans les modèles alimentaires et *in vivo* car il est produit facilement et en quantité importante (supérieur à 30% du total). Il est l'oxystérol le plus abondant dans les LDLox (Gargiulo et al., 2017).

### 1.4. Absorption des lipides oxydés

Les lipides alimentaires oxydés sont absorbés par l'intestin grêle au niveau des entérocytes puis incorporés dans les chylomicrons, contribuant potentiellement au développement de la dysfonction endothéliale et de l'athérosclérose (Staprans et al., 1994).

L'acidité à la surface de la bordure en brosse des entérocytes induite par les échangeurs Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> diminue la solubilité des micelles. Les acides gras protonés sont dissociés des micelles pour permettre leur passage à travers les microvillosités de l'entérocyte. Les acides gras peuvent être absorbés de manière passive ou active. Les acides gras non chargés traversent rapidement la membrane des entérocytes par un mouvement de « flip-flop » passif. Cependant, le mécanisme de « flip-flop » semble insuffisant pour assurer les besoins métaboliques cellulaires. Il existe des transporteurs membranaires entérocytaires des produits lipidiques comme le Fatty

Acid Transporteur Protein (Sfeir et al., 1997) et le Fatty Acid Transporter (Chen et al., 2001). Le cholestérol est absorbé de manière active par les récepteurs NPC1-L1 (*Niemann Pick C1 like 1*) et SR-B1 (*Scavenger Receptor Class B Type 1*) (Haikal et al., 2008).

Les produits lipolytiques sont alors transportés jusqu'à la membrane du réticulum endoplasmique pour y être de nouveau estérifiés et former des TG, des phospholipides et du cholestérol estérifié. L'estérification des monoglycérides se fait par l'action de la monoacylglycérol acyltransférase formant des diglycérides qui subissent à leur tour une acylation pour former des TG par la diacylglycérol acyltransférase (Buhman et al., 2002). Une deuxième voie d'estérification peut avoir lieu par l'acylation du 3-glycéro-phosphate par la glycérophosphate acyltransférase pour former l'acide phosphatidique. Ce dernier est hydrolysé en diacylglycérides en présence de la phosphatidate phosphohydrolase puis converti en TG. Cette deuxième voie n'est active qu'en cas de jeûne. Les lysophospholipides sont réacylés en phospholipides par la lysophospholipide acyltransférase (Levy, 2000). Cependant, une partie des lysophospholipides peut être hydrolysée pour former du glycérol-3-phosphorylcholine. L'acide gras libéré peut être utilisé pour l'estérification des TG et le glycérol-3-phosphorylcholine transporté au foie pour utilisation (Mackay et al., 1997). Le cholestérol est estérifié à partir de cholestérol libre et de l'acétyl CoA (Buhman et al., 2000). Approximativement, 75% du cholestérol alimentaire absorbé est sous forme estérifié dans les chylomicrons (Dawson and Rudel, 1999).

Les chylomicrons sont exclusivement sécrétés par les entérocytes et sont les principaux véhicules des graisses alimentaires et des vitamines liposolubles vers le foie (Thomson et al., 1986). Ils sont constitués de TG (85-88%), de phospholipides (~ 8%) et de cholestérol (~5%) qui sont associés à des apolipoprotéines : l'ApoB-48, l'ApoA-I, l'ApoA-IV et l'ApoC-III. Sous l'action de la microsomal transfer protein (MTP), les différents lipides sont assemblés avec l'ApoB48 qui constitue la protéine structurale des chylomicrons indispensable à son assemblage et à son exocytose au pôle basolatéral des entérocytes (Levy et al., 1987).

Une administration orale de 4-HNE radiomarqué au <sup>3</sup>H induit, après 24 heures, une distribution de la radioactivité où 48% de la dose était retrouvée au niveau urinaire (répartis en 22 métabolites), 15% dans les fèces, 3% dans le contenu intestinal et 2% au niveau du foie ainsi que des traces dans les reins, cerveau et cœur (Keller et al., 2015). Cette étude a permis de démontrer qu'une partie du 4-HNE produit pendant la digestion était absorbé par la barrière intestinale et pouvait être retrouvé dans les tissus même si la plus grande part semble être excrétée.

Une autre étude a montré que l'ingestion d'acide linoléique oxydé (marqué au carbone 14) a induit son utilisation par le foie pour la synthèse des TG et des phospholipides. Les lipides alimentaires oxydés peuvent donc être absorbés et affecter le niveau d'oxydation des lipoprotéines plasmatiques (Staprans et al., 1996).

L'absorption à travers la barrière intestinale des oxystérols diffère selon les produits d'oxydation du cholestérol. L'absorption du cholestérol non oxydé par le récepteur NPC1-L1 est plus efficace que celle du cholestérol oxydé. En effet, la présence des groupements hydroxyle, céto et époxy inhiberait l'étape de désestérification dans l'intestin grêle, étape clé dans l'absorption des stérols. Il a été montré qu'après l'ingestion d'un repas riche en oxystérols, les taux de chylomicron, de VLDL, de LDL et de HDL de 5 volontaires (Linseisen and Wolfram, 1998) étaient augmentés 6 h après l'ingestion avec un maximum à 8 h confirmant l'absorption des stérols oxydés avec une sélectivité plus élevée pour le 7 $\beta$ -hydroxycholestérol que pour le  $\alpha$ -époxycholestérol et 7-cétocholestérol (Vine et al., 1997).

### **1.5. Les lipoprotéines**

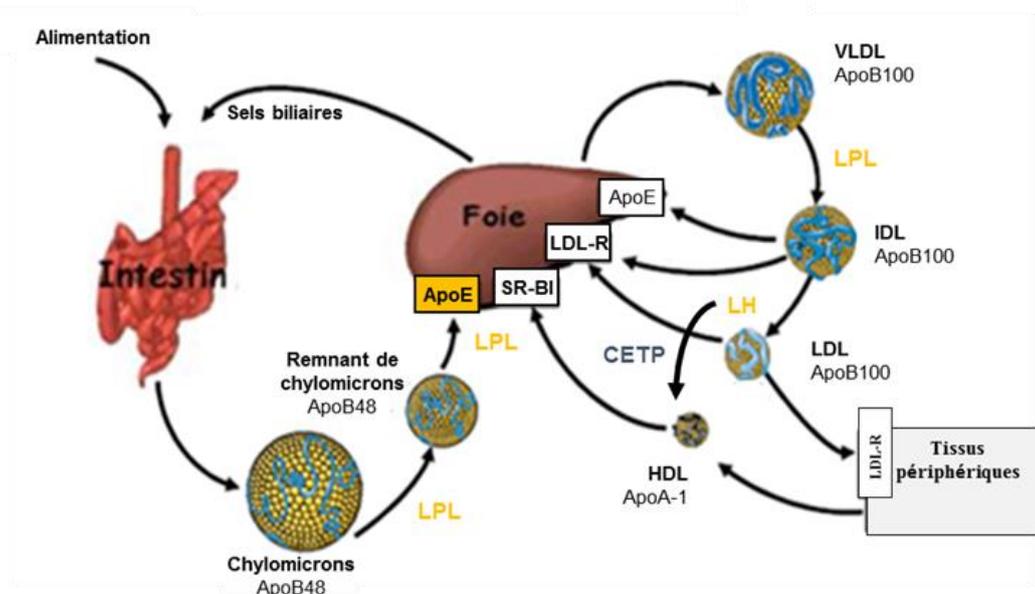
Les lipoprotéines sont des particules sphériques impliquées dans le transport du cholestérol et des TG après absorption intestinale des lipides alimentaires. Elles sont constituées d'un cœur hydrophobe contenant des TG, des esters de cholestérol et d'une couche superficielle amphiphile composée de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines nécessaires à la stabilité des lipoprotéines et permettant la solubilité des lipides en milieux aqueux (plasma, lymphe, liquide interstitiel).

Les lipoprotéines peuvent être classées selon leur densité et les apolipoprotéines qui les composent. Dans un ordre croissant de densité et décroissant en taille, on trouve les chylomicrons, les VLDL (*Very Low density Lipoprotein*), les IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*), les LDL (*Low Density Lipoprotein*) qui sont composées d'apolipoprotéines B (Apo B48 et ApoB100) et les HDL (*High Density Lipoprotein*, pré-HDL, HDL2 et HDL3) qui présentent l'apolipoprotéine A. Les chylomicrons et VLDL sont composés en majorité des triglycérides alors que les LDL et HDL comprennent essentiellement des esters de cholestérol.

L'absorption des lipides alimentaires conduit à la sécrétion par les entérocytes des chylomicrons, riches en TG qui seront transportés aux tissus périphériques et hydrolysés en

acides gras par la lipoprotéine lipase (LPL) endothéliale des capillaires afin de fournir un substrat énergétique aux cellules. Les remnants de chylomicrons, résultant de l'action de la LPL sur les chylomicrons, vont alors être captés par le foie par l'intermédiaire des récepteurs à l'ApoE. Les lipides néosynthétisés par le foie sont sécrétés dans le sang sous forme de VLDL riches en ApoB100, qui sont à leur tour hydrolysées au niveau des tissus périphériques et restructurées en IDL, HDL et LDL. Le récepteur à LDL (LDL-R) reconnaît les lipoprotéines porteuses de l'ApoB100 (IDL, LDL) (Goldstein and Brown, 1974) ou de l'ApoE (VLDL) (Innerarity and Mahley, 1978) et participe à leur internalisation par endocytose. Les HDL peuvent également être produites directement par le foie. La LCAT (*Lécithine-Cholestérol Acyltransférase*) présente dans le sang permet l'estérification du cholestérol et son transfert vers le cœur hydrophobe des HDL. Le cholestérol libre en excès dans les tissus périphériques peut alors être capté par les HDL puis être ramené au foie par interaction avec les scavenger receptors SR-B1 pour être excrété dans la bile (Gautier, 2010; Rader and Daugherty, 2008). Les HDL peuvent également récupérer le cholestérol des lipoprotéines à ApoB100 (VLDL, IDL, LDL) via une protéine de transfert CETP (*Cholesterylester Transfer Protein*) (Rader and Daugherty, 2008) (Figure 14).

Chez l'homme, les valeurs normales sont de 180 mg/dL de cholestérol total, 45 mg/dL de cholestérol-HDL, 115 mg/dL de cholestérol-LDL.



**Figure 14 :** Métabolisme des lipoprotéines.

LPL : lipoprotéine lipase; LH : lipase hépatique; CETP : Cholesteryl Ester Transfer Protein; SR B1 : Scavenger Receptor B1; LDL-R : LDL receptor.

➤ Et pour les lipides oxydés ?

Après l'absorption intestinale, les produits d'oxydation lipidique (oxystérols et 4-HNE notamment) se retrouvent au niveau plasmatique. Les LDL faiblement oxydées ou mmLDL (*minimally modified LDL*) présentent un taux faible de produit d'oxydation lipidique et une altération mineure de l'ApoB100 n'empêchant pas sa reconnaissance par le récepteur ApoB100/E (Negre-Salvayre et al., 1990). L'augmentation de l'oxydation des LDL modifie l'ApoB100 par fixation du 4-HNE ou d'autres aldéhydes sur un résidu lysine et contribue à l'athérogénicité des LDLox.

La toxicité des produits issus de l'oxydation lipidique serait due aux aldéhydes, dont le 4-HNE, produits lors de la dégradation des hydroperoxydes gastriques et des oxystérols. Après un repas riche en graisse, la fraction des mmLDL pauvre en vitamine E est plus élevée et donc plus sensible à une oxydation ultérieure. De plus, les régimes riches en AGPI ou en cholestérol accélèrent le développement de l'athérosclérose au niveau de l'aorte (Staprans et al., 2005). Cela indique un lien possible entre le risque de développer une maladie dégénérative telle que les maladies cardiovasculaires et l'oxydation des lipides alimentaires dans le tractus gastro-intestinal (Kanner, 2007).

Comprendre les mécanismes, au niveau vasculaire, de l'aggravation du développement de la dysfonction endothéliale et des plaques d'athérome induite par l'oxydation lipidique au niveau gastrique apparaît nécessaire pour la mise en place ultérieure de stratégies de prévention.

*A retenir*

- **L'estomac est un bioréacteur dans lequel a lieu l'oxydation lipidique endogène initiée par le fer héminique alimentaire.**
- **L'oxydation lipidique endogène entraîne la formation d'oxystérols et de 4-HNE spécifique des AGPI n-6.**
- **Les lipides oxydés sont absorbables par les entérocytes faisant le lien entre l'oxydation endogène et l'apparition de pathologies cardiovasculaires.**

## 2. Système vasculaire et oxydation lipidique

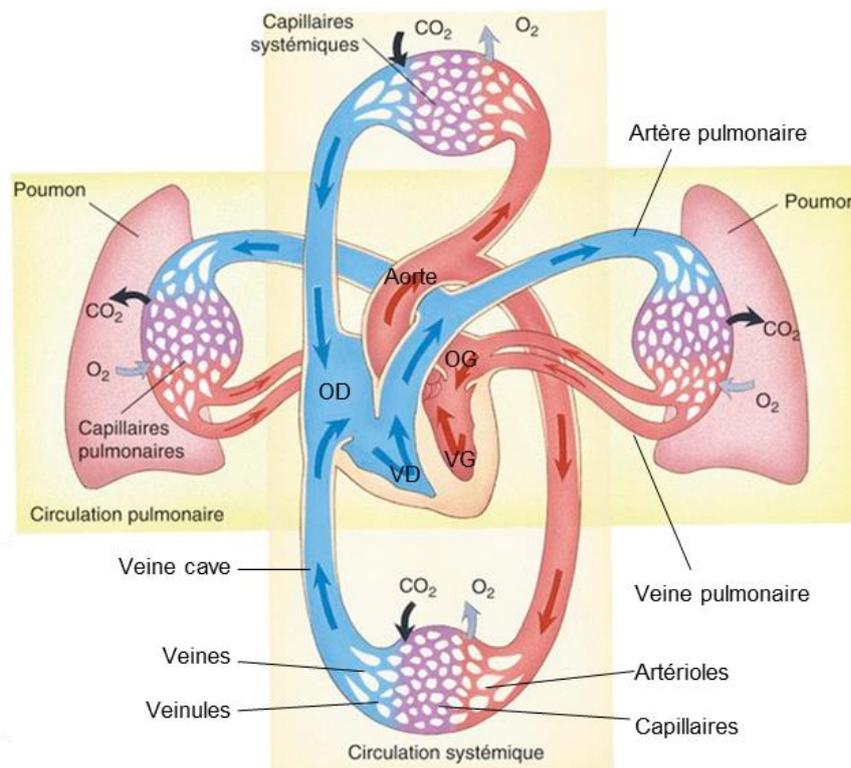
### 2.1. Système vasculaire

#### 2.1.1. Généralité

Le système cardiovasculaire, comprenant le cœur et les vaisseaux, a pour rôle de distribuer aux organes l'oxygène et les nutriments indispensables à leur bon fonctionnement tout en éliminant ou en recyclant les déchets. Il permet également la transmission d'informations (transport d'hormones), la régulation thermique et intervient dans la défense immunitaire (transport des anticorps et des cellules immunitaires).

Il existe différentes catégories de vaisseaux dont les caractéristiques sont en relation avec la fonction qu'ils exercent dans la vascularisation : l'aorte et ses principales ramifications qui sont des artères élastiques de conduit (diamètre 1 à 2,5 cm) qui transforment le débit sanguin pulsé en débit vasculaire continu. Elles sont composées de cellules musculaires lisses (CML) et de fibres de collagène et d'élastine (25%) formant le feuillet musculo-élastique permettant de réguler le flux sanguin et de supporter de grande variation de pression. Le réseau de collagène leur confère une grande flexibilité jouant un rôle majeur dans l'intégrité et la résistance vasculaire. En se ramifiant ces artères donnent naissance aux artères de résistance (artères intramusculaires et artérioles). Ces artères composées principalement de CML, de collagène et peu de fibres élastiques, possèdent une meilleure capacité de vasomotricité et une plus grande rigidité. Les artérioles permettent de réguler le flux sanguin en fonction des besoins tissulaires. Les capillaires sont eux, en contact étroit avec les cellules grâce à leur fine paroi permettant les échanges entre le sang et le liquide interstitiel fournissant oxygène et nutriments aux cellules et récupérant les déchets métaboliques. Le système veineux assure le retour du sang au cœur droit notamment grâce à des valves anti-reflux après échanges avec l'ensemble des organes et tissus de l'organisme. Il se compose de veinules post-capillaires (8-100  $\mu\text{m}$  de diamètre) constituées uniquement d'une couche de cellule endothéliale poreuse. Le diamètre et l'épaisseur de la paroi vasculaire augmentent pour aboutir aux veines constituées comme les artères de trois tuniques distinctes. Elles sont constituées principalement de faisceaux longitudinaux de collagène et d'un réseau de fibres élastiques. La paroi des veines plus fines et la lumière plus importante

(jusqu'à 3 cm de diamètre) que les artères correspondantes induisent une faible résistance à l'écoulement sanguin. De plus, la contraction des muscles striés à proximité des veines aide le sang à remonter vers le cœur droit (Figure 15). L'ensemble de ces adaptations structurales veineuses assure le bon retour sanguin au cœur droit. Pour finir, les veines forment un réservoir sanguin en stockant près de 65% du volume total.



**Figure 15** : Représentation de l'organisation du système cardiovasculaire.

OD : oreillette droite; VD : ventricule droit; OG : oreillette gauche; VG : ventricule gauche

### 2.1.2. Structure des artères

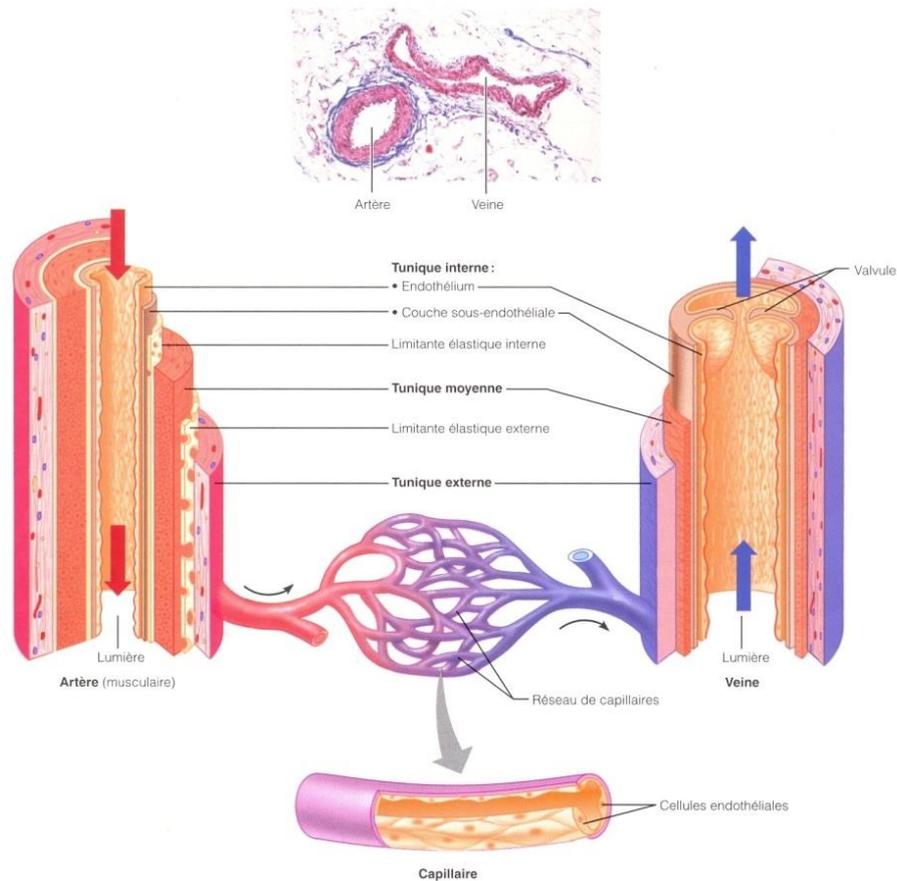
La paroi interne des artères est constituée de trois tuniques distinctes : l'intima comprenant l'endothélium (tunique interne), la media (tunique intermédiaire) et l'adventice (tunique externe) (Figure 16).

**L'intima** est constituée de l'endothélium qui est une monocouche cellulaire plate, simple, squameuse et polarisée. L'endothélium tapisse l'intérieur des vaisseaux sanguins et sa face apicale est directement en contact avec le sang ce qui lui permet de capter les différents stimuli

mécaniques et chimiques sanguins et d'y répondre pour maintenir une homéostasie vasculaire. L'endothélium joue également un rôle majeur dans la vasomotricité artérielle en répondant aux priorités de perfusion sanguine et à la régulation de la pression artérielle. Il intervient également dans l'intégrité vasculaire, qui en cas de dysfonction endothéliale favorise l'apparition de pathologies cardiovasculaires. Cette monocouche cellulaire repose sur une lame basale lui conférant une résistance mécanique grâce à la présence de fibre de collagène. Enfin, une limitante interne, composée de tissu conjonctif fibro-élastique, sépare l'intima de la média.

**La média** est principalement constituée d'anneaux de myocytes (CML), de fibres d'élastine et de fibrilline formant le feuillet musculo-élastique. Le collagène présent est principalement de type I et III. Les CML sont mononuclées et fusiformes s'assemblant en couches séparées par l'endomysium (tissu conjonctif lâche) qu'elles secrètent et qui est perméable aux fibres nerveuses motrices et aux capillaires. La présence de récepteurs chimiques sur les myocytes, qui répondent aux stimuli sécrétés localement par l'endothélium ou par l'innervation de fibres nerveuses sympathiques, confère à cette tunique intermédiaire des propriétés vasomotrices. La vasoconstriction ou vasodilatation locale par les CML permet ainsi de répondre aux besoins tissulaires.

**L'adventice** est une enveloppe protectrice conjonctive lâche assurant l'intégrité vasculaire. Elle est composée principalement de fibres de collagène entrelacées de façon à les rendre plus résistantes, de fibroblastes et de fibres d'élastine. Ce tissu contient les fibres nerveuses, les vaisseaux lymphatiques et les capillaires sanguins irrigant la paroi vasculaire (vasa vasorum).



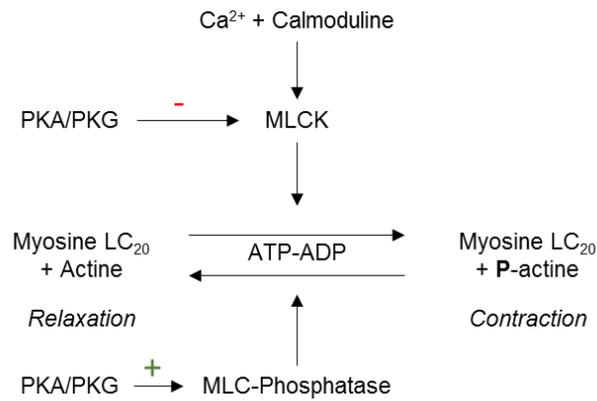
**Figure 16 :** Structure de la paroi vasculaire.

## 2.2. Vasomotricité artérielle

La vasomotricité artérielle est une fonction majeure du système artériel permettant de maintenir la pression artérielle (PA) stable et de réguler l'apport sanguin des différents tissus en fonction des besoins physiologiques en condition de repos, de stress physiologique ou pathologique. La PA est dépendante du débit cardiaque ( $Q_c$ ) et des résistances vasculaires périphériques (RPV) par la formule :  $PA = Q_c * RPV$ . De plus, les RVP sont dépendantes du calibre des artères et de la viscosité du sang :  $RPV = \frac{8\eta l}{\pi r^4}$  (où  $l$  = longueur du vaisseau,  $r$  = rayon du vaisseau,  $\eta$  : la viscosité du sang) indiquant que cette fonction vasculaire est dépendante du diamètre de la lumière artérielle.

### 2.2.1. Mécanismes de contraction/relaxation des CML

Les CML contiennent des myofilaments d'actine et de myosine entrecroisés sur l'axe longitudinal de manière hélicoïdale permettant leur contraction sans posséder de structure sarcomérique contrairement aux cellules musculaires striées. Les jonctions avec les cellules adjacentes permettent le synchronisme et la transmission des forces de contractions tandis que les jonctions ouvertes permettent la propagation des potentiels électriques. Les invaginations du sarcolème renferment de fortes concentrations de calcium extracellulaire. L'ouverture de canaux calciques voltage dépendants au niveau de ces « caveolae » induit l'entrée et l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, qui est responsable, avec le relargage de calcium par le réticulum endoplasmique, de la contraction des CML. La forte concentration de calcium intracellulaire active la calmoduline (CaM) en formant le complexe calcium-CaM qui active à son tour une kinase, la MLCK (*Myosine Light Chain Kinase*). Ensuite, cette MLCK active les ATPases sur les chaînes légères de myosines entraînant un changement de conformation par pivotement des têtes de myosine qui permet le glissement sur les filaments d'actine et donc une contraction par raccourcissement des CML. A l'inverse, pour la relaxation des CML, la diminution de la concentration intracellulaire de calcium se fait par transport actif dans le réticulum endoplasmique ou dans le liquide extracellulaire. Un mécanisme réversible de déphosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC<sub>20</sub>) par des phosphatases spécifiques (MLC-phosphatases activées par des protéines kinases A et G) est nécessaire pour réduire l'activité ATPase de la myosine (Figure 17).



**Figure 17 :** Mécanisme d'activation réversible de la chaîne légère de myosine (Myosine LC<sub>20</sub>) des CML.

PKA : protéine kinase A; PKG : protéine kinase G; ATP : adénosine tri-phosphate; ADP : adénosine di-phosphate; MLC : chaîne légère de myosine; MLCK : kinase des chaînes légères de myosine.

### 2.2.2. Régulation de la vasomotricité

Le maintien de l'homéostasie est principalement assuré par la vasomotricité des artérioles qui permet de répondre aux besoins physiologiques de l'organisme. Cette vasomotricité est régulée finement par une action synergique de différents éléments du système nerveux autonome sympathique et de manière locale par des facteurs chimiques.

#### 2.2.2.1. Régulation du tonus vasculaire par le système nerveux autonome

**Le centre vasomoteur** localisé dans le bulbe rachidien est composé de neurones sympathiques innervant directement les CML des artérioles par des neurofibres vasomotrices. Les neurofibres libèrent principalement de la noradrénaline induisant une vasoconstriction. Une activation du système nerveux sympathique entraîne une augmentation de la PA et à l'inverse l'inactivation induit une diminution de PA par relâchement des CML. L'activité de ce centre vasomoteur est notamment régulée par les informations transmises par les baro- et chimio-récepteurs.

**Les baro- et chimio-recepteurs** sont situés au niveau de l'aorte, des sinus carotidiens, des grosses artères du cou et du thorax. L'augmentation de la PA induit un étirement des barorécepteurs (présents dans la paroi) qui inhibent le centre vasomoteur entraînant un relâchement des CML et donc une diminution de la PA. Quant aux chimiorécepteurs, ils sont sensibles à l'hypoxémie, aux diminutions du pH sanguin ou à une forte concentration de dioxyde de carbone induisant une vasoconstriction par le centre vasomoteur facilitant l'oxygénation sanguine.

**Les centres cérébraux spinaux supérieurs** : l'hypothalamus peut stimuler l'activité du centre bulbaire rachidien en condition de stress psychologique ou environnemental (exercice physique ou température) augmentant la PA.

**Les neurofibres vasomotrices** innervant les CML induisent une réponse contractile/relaxante en fonction de la proportion des récepteurs adrénergiques. Cette distribution permet notamment d'irriguer des tissus en fonction des besoins.

#### 2.2.2.2. Les influences chimiques locales sur la vasomotricité

##### ➤ Les hormones

Les hormones transportées par le sang sont capables d'influencer la vasomotricité en stimulant les mécanismes rénaux, le centre vasomoteur ou directement les CML.

- **Les hormones de la médulla surrénale** : parmi ces hormones, l'adrénaline et la noradrénaline libérées dans le sang par la médulla surrénale en condition de stress physique ou mental provoquent une vasoconstriction généralisée à l'exception des artères irrigants le cœur et les muscles squelettiques favorisant la fuite en cas de danger.

- **L'angiotensine II** est une puissante hormone hypertensive dérivée de l'angiotensinogène produit par le foie. Quand la PA diminue, la perfusion rénale aussi, ce qui induit la synthèse de rénine. Celle-ci est impliquée dans la transformation de l'angiotensinogène en angiotensine II. L'angiotensine II stimule la vasoconstriction, l'activité sympathique et la sécrétion d'hormones anti-diurétiques (aldostérone, vasopressine ou ADH) favorisant la réabsorption de sodium au niveau des tubules rénaux ce qui augmente le volume sanguin.

## ➤ Les facteurs endothéliaux

La principale fonction de l'endothélium est de maintenir l'homéostasie vasculaire en régulant notamment le tonus vasculaire. Il va produire et sécréter différents agents vasoactifs capables d'agir au niveau des CML soit en se fixant sur des récepteurs membranaires soit en diffusant directement à travers la bicouche lipidique. Selon les besoins, l'endothélium est susceptible de synthétiser des molécules vasoconstrictrices comme l'endothéline-1, la thromboxane A2, les dérivés de certaines prostaglandines (PGH2) et des agents vasodilatateurs comme la prostacycline, les facteurs hyperpolarisants regroupés sous le nom d'EDHF (*Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor*) et surtout le NO.

### 2.2.3. Le NO

Furchgott et Zawadzki découvrent en 1980 une molécule synthétisée par l'endothélium induisant une relaxation des CML qu'ils nomment l'EDRF (Furchgott and Zawadzki, 1980). En 1987, Ignarro (Ignarro et al., 1987) démontre qu'il s'agit en fait du NO. Le NO a un rôle pléthorique en biologie et une fonction cruciale dans l'homéostasie cardiovasculaire. Il est majoritairement responsable des capacités vasodilatatrices de l'endothélium mais également de son action anti-adhésive et d'anti-agrégant plaquettaire. Cependant, il peut aussi être impliqué dans des régulations nitro-oxydatives en conditions pathologiques notamment.

#### 2.2.3.1. Mécanismes de synthèse du NO

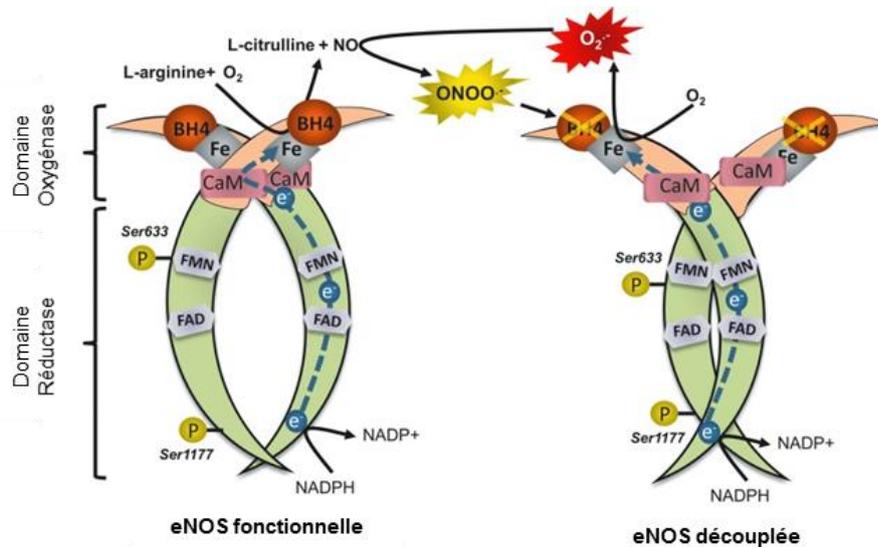
Le NO est synthétisé par des oxyde nitrite synthétases (NOS) dont il existe 3 isoformes : nNOS (NOS1), iNOS (NOS2) et eNOS (NOS3). L'activité des NOSs constitutives (nNOS et eNOS) est hautement régulée par des modifications post-traductionnelles, des phosphorylations, des acétylations, des interactions protéine-protéine, des s-nitrosylations et des s-glutathionylations.

L'isoforme inductible (iNOS) est principalement exprimée en condition pro-inflammatoire et/ou de stress oxydant (Pautz et al., 2010) et très peu exprimée en condition physiologique.

Contrairement aux deux autres isoformes, elle produit du NO indépendamment de la concentration calcique cytosolique sur de longues périodes engendrant des concentrations de NO cent fois plus importantes que les autres isoformes (10 nM et 1µM pour la iNOS). Ce phénomène entraîne des troubles endothéliaux en altérant à la fois la voie de vasodilatation et celle de la vasoconstriction (Li et al., 2014).

La nNOS est présente dans les fibres nerveuses périphériques et au niveau vasculaire (Schwarz et al., 1999) où elle joue un rôle dans le tonus basal sans pour autant être sensible à l'acétylcholine ou au stress pariétal « *shear stress* » (Seddon et al., 2008). La eNOS est principalement exprimée au niveau des cellules endothéliales (vasculaires et cardiaques) mais aussi dans de nombreux autres types cellulaires (Balligand et al., 1995; Kleinbongard et al., 2006; Palmer et al., 1988; Petroff et al., 2001; Wallerath et al., 1997). La eNOS est l'isoforme classiquement rapportée comme très majoritairement impliqué dans la vasomotricité.

La eNOS est une oxydoréductase sous forme d'homodimère, composée d'un domaine N-terminal oxygénase qui présente les sites de liaison au substrat, la L-arginine, au cofacteur BH<sub>4</sub> (tétrahydrobioptérine) et au groupement fer héminique et un domaine C-terminal réductase avec les sites de liaison aux donneurs d'électrons NADPH, FAD et FMD. Les deux domaines sont réunis par une séquence d'acides aminés qui contient le site de liaison du complexe calcium-CaM. La fixation de la CaM inhibe la eNOS. Cependant, le complexe calcium-CaM active la eNOS. Ce complexe améliore le pouvoir réducteur de l'enzyme en contrôlant le transfert d'électron depuis le domaine réductase. Une augmentation aigüe de la concentration calcique intracellulaire est nécessaire pour que le complexe se lie à la eNOS et l'active. Quand les NOSs sont activées, la flavine du domaine réductase transfère l'électron depuis le donneur vers l'autre monomère en permettant à l'oxygène de se lier à l'hème de l'enzyme pour réduire le fer héminique Fe<sup>2+</sup> induisant la conversion de la L-arginine en HO-L-arginine puis en NO et L-citruline (Alderton et al., 2001). Le BH<sub>4</sub> à l'interface des deux monomères est requis pour la stabilisation de la eNOS sous forme de dimère et à l'activité catalytique (eNOS couplée). Cependant, si l'électron est transféré directement sur l'oxygène en absence de BH<sub>4</sub> et donc de fixation du substrat L-arginine, l'enzyme produit de l'anion superoxyde à la place du NO (eNOS découplée). Il en résulte une diminution de la biodisponibilité du NO et une augmentation de la production de stress oxydant sous forme d'anion superoxyde et de peroxyde nitrite (combinaison de l'anion superoxyde et du NO) responsable de dommages cellulaires (Figure 18).

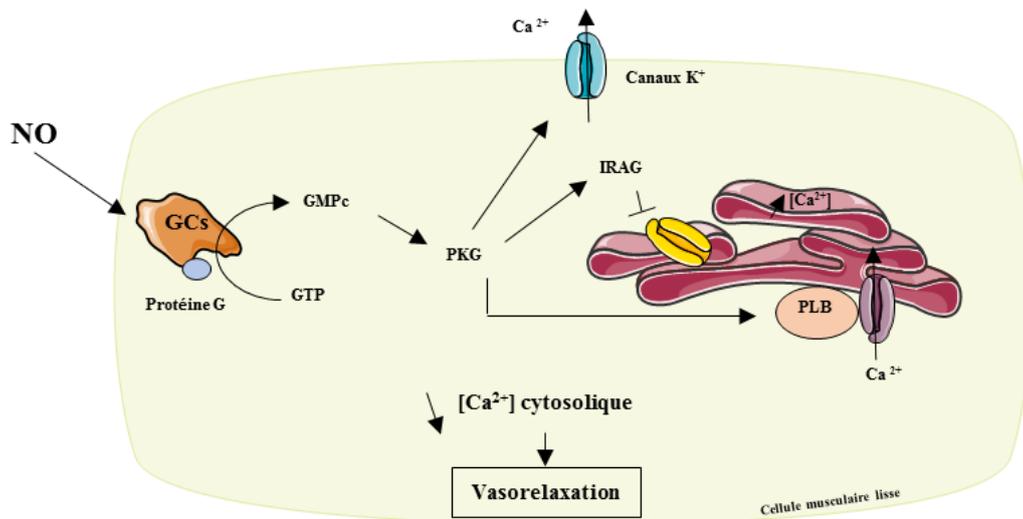


**Figure 18** : Représentation schématique de la synthèse du NO par la eNOS (adaptée Margaritis et al., 2014).

FMN : flavine mono-nucléotide; FAD : Flavine adénine dinucléotide; CaM : calmoduline; BH<sub>4</sub> : tétrahydrobioptérine; O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : anion superoxyde; ONOO<sup>-</sup> : peroxynitrite.

### 2.2.3.2. Mécanisme vasodilatateur du NO au niveau des CML

Le NO produit par la eNOS au niveau vasculaire diffuse à travers la bicouche lipidique jusqu'aux CML. Il active à ce niveau la guanylate cyclase responsable de la formation de GMPc (*Guanosine Monophosphate cyclique*) (Ignarro et al., 1999). Le GMPc active à son tour une protéine kinase G (PKG) qui est à l'origine de différentes actions synergiques et complémentaires, aboutissant à une diminution de la concentration calcique intracellulaire. La PKG agit au niveau de la pompe calcique SERCA (*Sarco Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) par phosphorylation de son site inhibiteur, le phospholomban (Cornwell et al., 1991). La fermeture des canaux membranaires du réticulum endoplasmique empêche l'afflux trop important de calcium dans le cytosol (Schlossmann et al., 2000). De plus, la PKG inhibe l'action de l'IP3 (*Inositol Triphosphate*) par phosphorylation de l'IRAG (*Ip3-Receptor Associated cGMP Kinase Substrat*). Ces deux mécanismes concentrent le calcium intracellulaire dans le réticulum endoplasmique. Par ailleurs, la PKG active également des canaux potassiques calcium dépendants sur le sarcolème entraînant la diminution du calcium intracellulaire (Bolotina et al., 1994). Cette baisse entraîne un relâchement des CML et réduit la formation du complexe calcium-CaM inhibant la vasoconstriction (Horowitz et al., 1996) (Figure 19).



**Figure 19 :** Mécanisme de relaxation des CML induit par le NO.

### 2.2.3.3. Régulation de la eNOS et de la voie eNOS/GMPc.

Il existe un mécanisme complexe de régulation de la eNOS impliquant différentes sous unités peptidiques activatrices ou inhibitrices et dépendant ou non de la concentration calcique intracellulaire.

Il existe une séquence peptidique auto-inhibitrice localisée à proximité du site de fixation de la CaM sur la eNOS qui empêche le flux d'électron au niveau de l'homodimère. Cette séquence peut être inhibée par phosphorylation de la serine 1177 facilitant le transfert d'électron et augmentant de 2 à 3 fois la production de NO. A l'inverse, la phosphorylation de la thréonine 495 de la eNOS inhibe la fixation du complexe calcium-CaM (Forstermann and Sessa, 2012). Le site de fixation de la CaM est commun à la calveoline-1. La partie C-terminale des cavéoline-1 fixée sur la eNOS permet de rattacher la protéine aux invaginations de la membrane plasmique appelées « caveolae ». Les enzymes fixées sont inactives mais peuvent être réquisitionnées en réponse à des stimuli.

Le « *shear stress* » par l'intermédiaire des mécanorécepteurs de la membrane plasmique induit, lors d'un exercice physique, la production de NO par phosphorylation de la serine 1177 via la voie PI3/Akt. La fixation de l'insuline sur son récepteur tyrosine kinase permet l'activation de deux voies : par la phosphorylation d'IRS<sub>1</sub> (*Insulin Receptor Substrate 1*)

induisant la production de NO et par la voie PI3/Akt (Kobayashi et al., 2005). La fixation sur la membrane plasmique endothéliale de l'acétylcholine permet, quant à elle, la formation d'inositol triphosphate ouvrant les canaux calciques du réticulum endoplasmique. L'augmentation de calcium intracellulaire favorise la formation du complexe calcium-CaM et augmente ainsi la production de NO.

#### 2.2.3.4. Autres effets bénéfiques du NO sur le système cardiovasculaire

Le NO peut également se fixer sur des résidus cystéines de protéines des cellules endothéliales pour former un groupement nitrosothiol. La s-nitrosylation est un mécanisme post-traductionnel entraînant une modification réversible des protéines. Elle constitue ainsi une action directe du NO sur les propriétés des protéines. Le NO peut notamment agir sur la eNOS (Ravi et al., 2004) pour une régulation négative de sa propre production. Il peut aussi inhiber la phosphodiesterase 5 (Murray et al., 2008) augmentant ainsi la quantité de GMPc améliorant la vasodilatation. La réversibilité est liée à l'activité dénitrosylante de certaines enzymes comme la nitrosothiol réductase régulant la quantité de glutathion nitrosylé et donc indirectement de la nitrosylation des protéines à proximité.

Le NO intervient au niveau cardiovasculaire en participant aux effets anti-adhésif cellulaire, anti-agrégant plaquettaire et antioxydant. En effet, une hyperactivité plaquettaire associée à un phénomène de thrombose conduit à l'installation de l'athérosclérose. Le rôle régulateur du NO est essentiel pour maintenir la fluidité du sang. De manière similaire à son action au niveau des CML, le NO entraîne une diminution de la concentration calcique intracellulaire plaquettaire via une voie guanylate cyclase/GMPc/PKG inactivant le processus d'agrégation plaquettaire (Benjamin et al., 1991).

L'adhésion leucocytaire aux cellules endothéliales est une étape majeure dans l'apparition de l'athérosclérose par la présence de VCAM/ICAM (Ross, 1999). Le NO est capable de limiter la production de VCAM en inhibant la voie NF- $\kappa$ B et réduisant ainsi l'adhésion leucocytaire (Niu et al., 1994).

### 2.3. Dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est définie comme un déséquilibre entre les substrats vasodilatateurs et vasoconstricteurs produits et sécrétés par l'endothélium.

La fonction endothéliale est très sensible aux différentes modifications métaboliques transitoires ou chroniques, comme le stress oxydant ou l'inflammation, de par son interaction directe avec le compartiment sanguin acheminant les différents agents délétères sécrétés ou absorbés par l'organisme. La dysfonction endothéliale est un marqueur précoce de l'apparition de pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension et elle est également un facteur clé du développement de pathologies ischémiques comme l'athérosclérose (Bonetti et al., 2003). En plus de la perturbation de la vasomotricité et de l'initiation de l'athérosclérose, la dysfonction endothéliale est impliquée dans la réponse fibroproliférative (remodelage vasculaire), dans l'oxydation des lipoprotéines, dans l'activation plaquettaire, dans le recrutement de cellules inflammatoires et dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Gimbrone et al., 2000).

#### 2.3.1. *Stress oxydant*

La déplétion en NO étant souvent une cause de dysfonction endothéliale, préserver sa biodisponibilité apparaît essentiel pour un bon fonctionnement vasculaire (Flammer et al., 2012). Le NO est sensible aux ERO, une surconcentration de ceux-ci favorise l'installation d'une dysfonction endothéliale (Higashi et al., 2009). De plus, les ERO entraînent une augmentation des facteurs vasoconstricteurs stimulant les CML comme l'endothéline-1, la prostaglandine H2 et le thromboxane A2 (Gareus et al., 2008) contribuant à l'altération de la balance vasodilatateurs/vasoconstricteurs observée dans la dysfonction endothéliale.

#### ➤ Origine du stress oxydant

Toutes les cellules qui fonctionnent à l'oxygène sont sources d'ERO caractérisées par un électron non apparié associé à un radical libre. On retrouve principalement l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), l'hydroxyle radicalaire ( $HO^{\cdot}$ ), le monoxyde d'azote radicalaire ( $NO^{\cdot}$ ) ou encore les

radicaux lipidiques. Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le peroxynitrite ( $ONOO^{\bullet}$ ) ne sont pas des radicaux libres mais possèdent des capacités oxydantes et contribuent largement à l'installation du stress oxydant à l'origine de pathologies cardiovasculaires. Une production excessive d'ERO, dépassant les capacités de défenses antioxydantes endogènes, engendre l'oxydation de macromolécules biologiques comme l'ADN, les protéines, les carbohydrates, les lipides, ce phénomène est nommé stress oxydant. Les ERO peuvent avoir une origine exogène, comme les radiations ioniques, la lumière UV, la nourriture, un environnement polluant et le tabac, ou une origine endogène et sont principalement produites par des enzymes comme la NADH/NADPH oxydase, la xanthine oxydase, la lipoxygénase, les NOS, la myéloperoxydase, le cytochrome p450 et la chaîne respiratoire mitochondriale.

**Les NADPH oxydases (NOXs)** sont des enzymes membranaires et sont les principales sources de stress oxydant vasculaire. Les NOXs transfèrent un électron d'une molécule de NADPH ou de NAD vers une molécule de dioxygène produisant l'anion superoxyde dans différents compartiments (noyau, réticulum endoplasmique, endosome, phagosome, mitochondrie ou membrane plasmique). Il existe différentes isoformes de NOX constitutives exprimées dans les cellules endothéliales, les CML et les fibroblastes de l'adventice. La NOX2 est surexprimée en présence de facteurs de risques cardiovasculaires notamment pro-inflammatoires (Brandes and Schroder, 2008) ce qui induit une production excessive d'ERO participant à l'installation d'une dysfonction endothéliale via la réduction du NO.

**La xanthine oxydase** endothéliale est fortement régulée par l'angiotensine II (Landmesser et al., 2007) et par des facteurs pro-inflammatoires comme le  $TNF\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6 et l'interféron  $\gamma$  (Berry and Hare, 2004). Elle catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique avec la production d' $H_2O_2$ . La concentration d'acide urique et de xanthine oxydase seraient des prédictors de risque cardiovasculaire et pathologies métaboliques (Dawson and Walters, 2006).

**La chaîne de transport d'électron mitochondriale** est une source majeure d'ERO ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  et  $OH^{\bullet}$ ), elle est impliquée dans l'installation de l'athérosclérose et de différentes pathologies cardiovasculaires. Des électrons s'échappent de la chaîne de transport d'électron mitochondriale et se fixent sur une molécule de dioxygène, formant un  $O_2^{\bullet-}$ , transformé en  $H_2O_2$  par la superoxyde dismutase mitochondriale (SOD-Mn) (Boveris and Cadenas, 1975).

➤ Système de défense antioxydant

La paroi vasculaire comprend un système enzymatique antioxydant complexe permettant de protéger les autres molécules de l'oxydation et de réguler le niveau d'ERO. Ce système inclut principalement la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase. De nombreuses protéines ont un effet antioxydant par chélation des radicaux libres, des ions ferreux ou des complexes métalliques comme la sérum albumine, la lactoferrine, la transferrine, la ferritine, l'haptoglobine et l'hémopexine. Cependant, ce système antioxydant ne bloque pas les réactions d'oxydations requises pour le métabolisme, les voies de signalisation ou d'autres fonctions cellulaires.

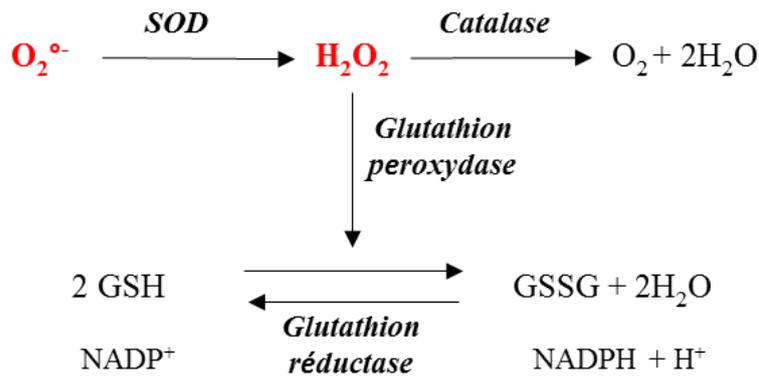
Il existe trois isoformes de **SOD** (hémoprotéine à 4 sous-unités) au sein de la paroi vasculaire :

- La SOD1 (Cu/Zn-SOD) essentiellement cytoplasmique, présente dans l'espace inter-membranaire mitochondrial,
- La SOD2 (Mn-SOD) présente dans la matrice mitochondriale,
- La SOD3 (Cu-Zn-SOD) produite essentiellement par les CML et les macrophages mais agissant uniquement au niveau extracellulaire (Fukai and Ushio-Fukai, 2011).

Les SOD transforment l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène permettant de préserver la biodisponibilité du NO. Une surexpression des SOD peut engendrer des conséquences fonctionnelles liées à une production excessive de peroxyde d'hydrogène (Fukai and Ushio-Fukai, 2011).

**La catalase** possède un hème-ferrique qui se lie au peroxyde d'hydrogène et le transforme en eau et oxygène.

**La glutathion peroxydase** est une enzyme ubiquitaire, principalement responsable de l'action antioxydante dans de nombreuses cellules. L'isoforme 1 de l'enzyme est la plus abondante, elle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau. Son activité est inversement corrélée aux risques cardiovasculaires (Blankenberg et al., 2003), et une diminution de son expression induit une augmentation de LDLox, responsable d'un accroissement de l'activité des macrophages (Cheng et al., 2013) (Figure 20).



**Figure 20 :** Principaux mécanismes de défenses antioxydantes endothéliales.

SOD : superoxyde dismutase;  $\text{O}_2^{\bullet -}$  : anion superoxyde;  $\text{H}_2\text{O}_2$  : peroxyde d'hydrogène; GSH : glutathion réduit; GSSG : glutathion oxydé.

### 2.3.2. Stress oxydant et eNOS

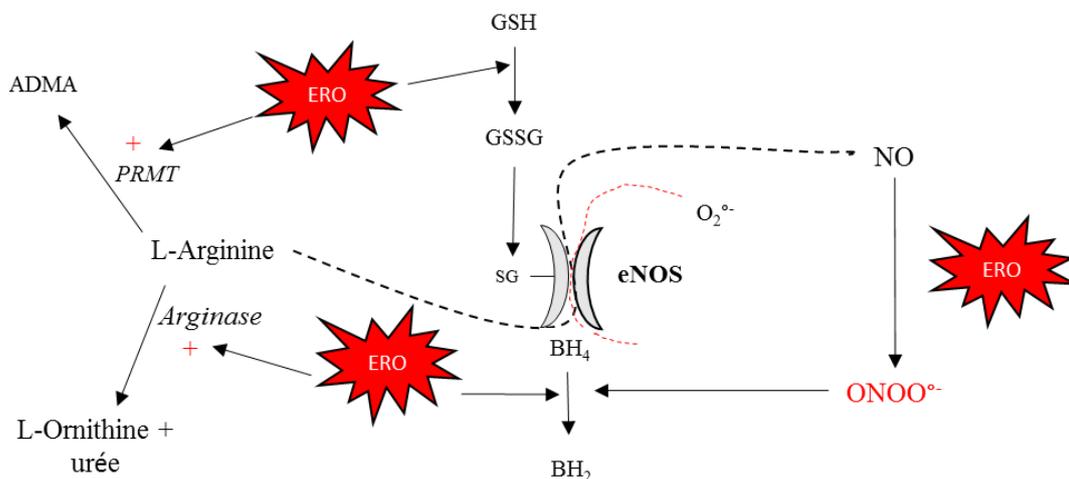
La voie eNOS/NO est particulièrement impactée par le stress oxydant. En effet, une forte production d'ERO entraîne une diminution de la biodisponibilité du NO, d'une part en réduisant l'activité catalytique de la eNOS et d'autre part en réagissant avec l'anion superoxyde responsable de la formation de peroxynitrite, molécule pro-oxydante puissante (Channon, 2004).

L'activité enzymatique de la eNOS dépend de la disponibilité de son substrat, la L-arginine. Le métabolisme de cette molécule est complexe et fait intervenir différents facteurs qui peuvent être influencés par le stress oxydant. La L-arginine peut être dégradée en ornithine et en urée par l'arginase, enzyme dont l'expression augmente considérablement en présence d'ERO (Wu and Morris, 1998). L'ADMA (*Asymmetric Methylarginine*) est un agent compétitif de la L-arginine inhibiteur de la eNOS, empêchant ainsi la synthèse de NO. Une enzyme permet cependant de dégrader les molécules d'ADMA en citrulline et en diméthylamine, la diméthylarginine diméthylarginohydrolase (DDAH) (Vallance and Leiper, 2004). Malheureusement, elle est également la cible des ERO qui inhibent son activité (Palm et al., 2007).

Le  $\text{BH}_4$  possède un métabolisme complexe, sa déplétion en condition de stress oxydant semble être la principale cause de découplage de la eNOS. Le  $\text{BH}_4$  stabilise la forme dimérique

de la eNOS en permettant la fixation du dioxygène et participe au transfert d'électron lors de la réaction de synthèse du NO. En absence de BH<sub>4</sub>, le complexe hème ferreux se dissocie formant de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et un hème ferrique. La déplétion en BH<sub>4</sub> est généralement attribuée à son oxydation en dihydrobioptérine (BH<sub>2</sub>) par les ERO et notamment par le peroxy-nitrite. Sous forme de BH<sub>2</sub>, sa fixation sur la eNOS peut toujours se faire mais conduit à la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et non de NO. Le ratio BH<sub>4</sub>/BH<sub>2</sub> est donc prépondérant dans la production de NO (Crabtree et al., 2008).

La S-glutathionylation est une modification post-transcriptionnelle par ajout d'une molécule de glutathion (GSH) sur un groupement thiol d'une protéine. La S-glutathionylation de la eNOS, au niveau de deux résidus cystéines (Cys689 et Cys908), engendre un découplage fonctionnel. Celle-ci devient donc une source de stress oxydant pouvant participer à l'installation de maladies cardiovasculaires (Figure 21).



**Figure 21** : Effet des ERO sur la dysfonction de la eNOS.

ERO : espèces réactives de l'oxygène; PRMT : protéine arginine N-méthyltransférase; GSH/GSSG : glutathion réduit/oxydé; BH<sub>4</sub> : tétrahydrobioptérine; BH<sub>2</sub> : dihydrobioptérine; ONOO<sup>-</sup> : peroxy-nitrite; SG : glutathion.

En résumé, la dysfonction des cellules endothéliales est responsable de plusieurs phénomènes majeurs impliqués dans l'athérogénèse comme une augmentation de l'inflammation (recrutement leucocytaire, activation plaquettaire, augmentation des chimiokines et expression de molécules d'adhésion et de facteurs pro-inflammatoires), une augmentation de la perméabilité vasculaire aux lipoprotéines, une oxydation des lipoprotéines liée à la production d'ERO et enfin à une altération de la vasomotricité. Lors de dysfonction endothéliale, on retrouve une augmentation de peroxy-nitrite oxydant le BH<sub>4</sub> (Szabo et al., 2007) ainsi qu'une réduction de la biodisponibilité du NO (Dimmeler et al., 1999). On retrouve

également une inactivation d'enzymes antioxydantes (Szabo et al., 2007), une diminution de la concentration calcique intra cellulaire et la production de cytokines proinflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1B, MCP-1) qui favorisent la dysfonction endothéliale (Raines and Ferri, 2005).

## **2.4. L'athérosclérose**

### *2.4.1. Généralité*

Le terme artériosclérose a été utilisé pour la première fois au 19<sup>ème</sup> siècle par Lostein et le terme athérosclérose au 20<sup>ème</sup> siècle par Marchand. Actuellement, le terme artériosclérose comprend trois groupes de maladies artérielles dont l'athérosclérose qui est définie comme une maladie caractérisée par sa richesse en cholestérol et en plaque fibreuse. Le terme athérome est, quant à lui, utilisé pour décrire les lésions anatomiques riches en lipides des artères.

En 1958, l'OMS a voulu clarifier le phénomène et donner une définition anatomopathologique de l'athérosclérose : « l'athérosclérose correspond à un remaniement de l'intima des artères de gros et moyen calibre (comme aorte, artères des membres, carotides, rénales, coronaires et digestives) consistant à une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang, de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaire, le tout s'accompagnant de modification de la media ». Les conséquences cliniques des complications athéro-thrombotiques affectent 20 à 40% des personnes âgées dans les pays industrialisés.

Les lésions athéromateuses se développent initialement au niveau de l'épaississement de l'intima située principalement aux bifurcations artérielles et à la face interne des courbures vasculaires (Nakashima et al., 2002). A ce niveau, le flux sanguin laminaire devient perturbé entraînant une diminution et une irrégularité des forces de cisaillement qui deviennent oscillatoire et participent donc à l'installation de la dysfonction endothéliale reconnue comme un évènement précoce de l'athérogénèse (Gimbrone et al., 1995; Malek et al., 1999).

#### 2.4.2. *L'initiation de la formation de la plaque d'athérome*

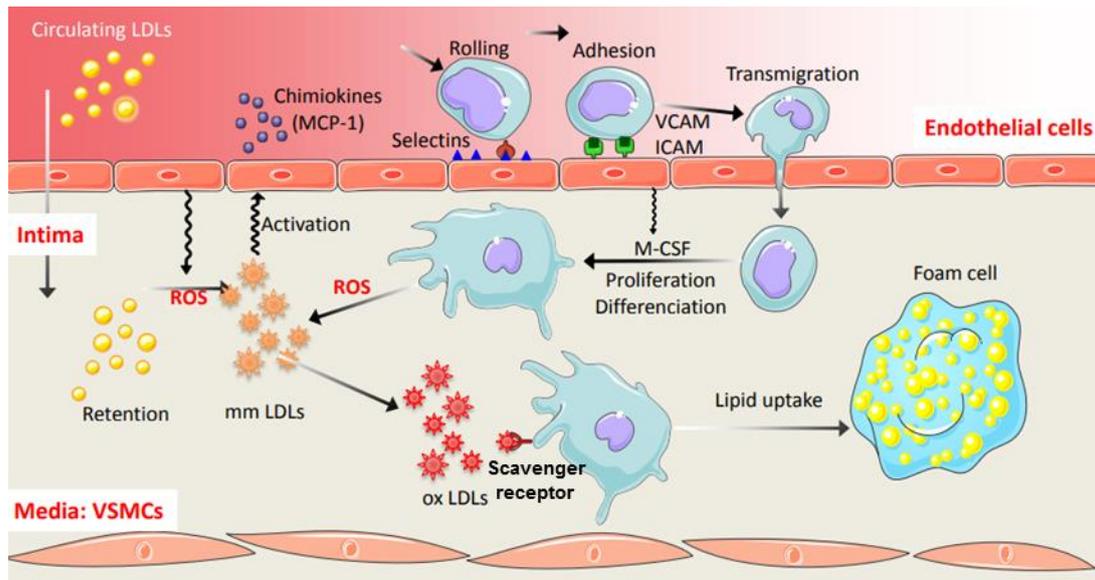
L'athérosclérose est un processus multifactoriel associé à une dysfonction endothéliale, un stress oxydant et à un trouble inflammatoire chronique qui commence dès l'enfance. Elle est caractérisée par un dépôt initial de lipides et un remodelage artériel qui progresse silencieusement pendant des décennies pour former des plaques athérosclérotiques avancées. Les lésions athérosclérotiques précoces se forment principalement au niveau de flux sanguin turbulent (bifurcation, départ artériel). Ces dépôts lipidiques se forment tout au long de la vie. En effet, des dépôts lipidiques ont été retrouvés dans des artères fœtales et ce phénomène était accentué par la présence d'une hypercholestérolémie maternelle (Napoli et al., 1997). Ces dépôts lipidiques progressent rapidement en présence de facteurs de risque cardiovasculaire jusqu'à la survenue d'évènements cliniques.

L'initiation des lésions athérosclérotiques est liée à la dysfonction endothéliale, à la rétention de lipoprotéines dans la paroi artérielle et à leur modification par oxydation dans l'espace sous-endothéliale, ce qui induit le recrutement de divers types cellulaires lié à l'inflammation et leur internalisation. L'accumulation de lipides et l'installation d'une inflammation favorisent la formation d'un cœur lipidique recouvert par des tissus fibreux (capsule fibreuse) définissant les plaques d'athéromes.

La rétention des LDL dans la média est l'évènement clé de l'athérogénèse (Williams and Tabas, 1995). Les protéoglycanes jouent un rôle majeur dans la rétention des LDL par liaison avec les acides aminés chargés positivement de l'ApoB100. La taille et le degré de sulfatation des protéoglycanes ainsi que la taille, le degré d'oxydation et l'agrégation des lipoprotéines sont des facteurs qui augmentent la rétention LDL dans la paroi vasculaire (Camejo et al., 1993; Khalil et al., 2004). En cas d'hypercholestérolémie, l'influx des LDL dans l'intima est augmenté et leur élimination est réduite. Cette rétention au niveau sous-endothéliale rend susceptible les LDL à l'oxydation. L'oxydation lipidique peut-être initiée par la présence d'ERO produits par différents types cellulaires (cellules endothéliales, leucocytes recrutés ou CML) en présence d'ion métallique ou par voie enzymatique (myéloperoxydase ou lipooxygénase).

L'initiation du développement des plaques d'athérome implique le recrutement et la migration trans-endothéliale de cellules inflammatoires de la circulation (monocytes et lymphocytes T). Les mmLDL induisent la sécrétion de MCP-1 permettant le recrutement des monocytes qui

deviendront des macrophages dans la media. Les sélectines induisent un roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium (Eriksson et al., 2000). Ensuite, la présence des protéines ICAM (*Intercellular Adhesion Molecule*) et VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) à la surface de l'endothélium, et dont l'expression est augmentée par la présence des LDLox et par des stimuli pro-inflammatoires (Osborn et al., 1989), réalisent une adhésion forte des cellules immunitaires avant la migration trans-endothéliale par la reconnaissance des intégrines à la surface cellulaire. Le M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*) induit alors la prolifération et la différenciation des monocytes en macrophages ainsi que l'expression des récepteurs scavengers (RS) au niveau des membranes plasmiques des macrophages (Smith et al., 1995). L'internalisation des LDLox en excès par les macrophages est induite par reconnaissance entre les RSs (dont l'expression n'est pas autorégulée) et les LDLox (Steinbrecher, 1999). Ce mécanisme permet l'élimination, par capture, de grandes quantités de lipoprotéines (Figure 22). Cependant, l'accumulation incontrôlée de LDLox dans les macrophages ou les CML induit la formation de cellules spumeuses. La mort de ces cellules spumeuses est responsable de la formation du cœur nécrotique lipidique de la plaque d'athérome. En effet, l'accumulation de cholestérol confère le phénotype spumeux et contribue à l'apoptose des macrophages en présence de stress oxydant et de stress du réticulum endoplasmique. Les cellules spumeuses peuvent avoir pour origine les CML au niveau du feuillet musculo-élastique ou les macrophages dans les couches superficielles de l'intima dans les lésions précoces (Katsuda et al., 1992).



**Figure 22 :** Mécanisme d'initiation de l'athérosclérose.

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1; VCAM : vascular cell adhesion molecule; ICAM : intercellular adhesion molecule; M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating Factor; ROS : Espèces réactive de l'oxygène; mm LDL : LDL faiblement modifiés; ox LDL : LDL oxydés; VSMC : cellules musculaires lisses.

#### 2.4.3. L'oxydation des lipoprotéines LDL

Les LDL sont retrouvées dans les zones sensibles au développement des plaques d'athérome. L'influence des lipoprotéines sur la formation de plaques d'athérome dépend de leur concentration plasmatique, de leur rétention et de la perméabilité endothéliale (passage para- et trans-cellulaire par restructuration du cytosquelette). La rétention des lipoprotéines LDL dans l'espace sous-endothéliale peut être à l'origine de leur oxydation, leur conférant des propriétés immunogéniques et pro-inflammatoires.

Le stress oxydant induit l'oxydation des acides gras polyinsaturés présents à la surface des LDL, ou d'esters de cholestérol et de TG au cœur. Cette oxydation induit la formation d'hydroperoxydes instables ainsi que l'altération des apolipoprotéines des LDL. Les produits d'oxydation des acides gras peuvent être le résultat d'une oxydation non enzymatique (ERO) ou enzymatique (ex : lipooxygénase). Ils sont retrouvés au niveau des lésions athéromateuses (Waddington et al., 2003) et ils participent à l'instabilité des plaques d'athérome (Mallat et al., 1999) en affectant la qualité et la destruction du collagène par des métalloprotéinases (MMP, « *Matrix MetalloProteinase* »).

Brièvement, le processus d'oxydation des LDL peut être divisé en trois phases identiques à celle de l'oxydation lipidique au niveau de l'estomac (Stocker and Keaney, 2004) (Figure 8).

- **une phase d'initiation** où un radical libre enlève un hydrogène d'un AGPI pour former un radical alkyle  $L^{\bullet}$ .

- **une phase de propagation** où le radical alkyle,  $L^{\bullet}$ , après un réarrangement en un motif de diène conjugué, forme le radical peroxyde,  $LOO^{\bullet}$ , avec l'ajout d'une molécule de dioxygène. Le radical  $LOO^{\bullet}$  peut à son tour enlever un hydrogène à une autre molécule d'AGPI pour donner un hydroperoxyde  $LOOH$  et générer un autre radical alkyle  $L^{\bullet}$ .

- **une étape de terminaison** par épuisement de substrat ou formation de composés stables (alcane, alcools, cétones, aldéhydes, acides carboxyliques) notamment par la fragmentation des hydroperoxydes en aldéhydes hautement réactifs avec les protéines et les phospholipides. Les aldéhydes se lient aux résidus lysine des ApoB, ce qui augmente la reconnaissance des ApoB par les RSs des macrophages conduisant à la formation des cellules spumeuses (Steinbrecher, 1999).

L'oxydation enzymatique des AGPI peut donc induire notamment du malondialdéhyde ou du 4-HNE.

Les oxystérols, produit d'oxydation du cholestérol, peuvent être induit également par voie enzymatique (25-hydroxycholestérol) (Lund et al., 1993) ou non enzymatique (7- $\beta$ -hydroxycholestérol et le 7-kétocholestérol) (Gargiulo et al., 2017). Ces trois composés sont majoritaires dans les LDLox. Ils sont responsables des effets pro-inflammatoires et pro-apoptotiques des macrophages (Lemaire et al., 1998) contribuant au développement des cellules spumeuses et donc des plaques d'athéromes.

Les LDLox favorisent la dysfonction endothéliale en altérant la vasodilatation (Feron et al., 1999), en augmentant la production de MCP-1 (Cushing and Fogelman, 1990) et de M-CSF (Rajavashisth et al., 1990) ainsi que la prolifération des CML (Auge et al., 2002). Les LDLox induisent également la mort cellulaire par apoptose des cellules endothéliales et des CML (Vindis et al., 2005) aggravant l'athérosclérose avec la formation de thrombus qui joue un rôle majeur dans le syndrome coronarien aigu.

#### 2.4.4. *Les types cellulaires impliqués dans le développement de l'athérosclérose*

**Le macrophage tissulaire**, dérivé de monocyte après transmigration et différenciation dans la paroi vasculaire, est le principal type cellulaire inflammatoire présent dans les lésions athéromateuses. Il a un rôle majeur dans l'inflammation. En effet, la polarisation pro-inflammatoire M1 des macrophages induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, et IL-12.

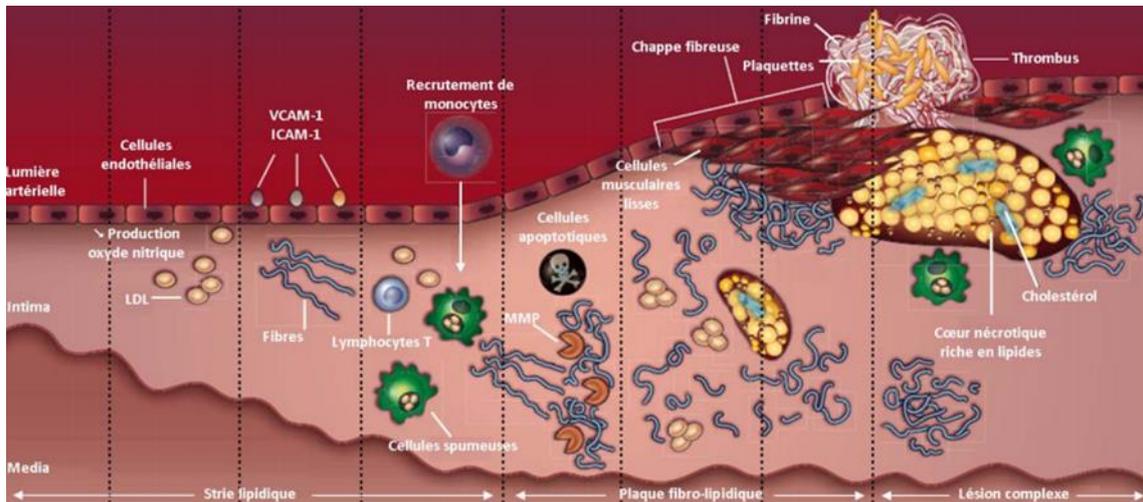
**Les lymphocytes pro-inflammatoires à polarisation TH1** sont prédominants dans la plaque d'athérome (Ait-Oufella et al., 2006). Leur présence a pour conséquence une sécrétion importante de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5 et IL-13) et ils sont activés uniquement par les mmLDL (Hansson and Hermansson, 2011).

**Les neutrophiles pro-inflammatoires** induisent la sécrétion d'enzymes protéolytiques (MMP-2/9, cathepsine G), de myéloperoxydase et de MCP-1 qui aggravent l'athérosclérose et la dysfonction endothéliale en présence d'oxydation. Le taux circulant des neutrophiles pro-inflammatoire est augmenté en présence d'hyperlipidémie (Araujo et al., 1995).

#### 2.4.5. *Développement des plaques d'athérome*

L'évolution vers le stade athéromateux des lésions précoces se fait par le maintien ou l'aggravation des processus d'initiation (entrée, rétention et oxydation des LDL) ainsi que la réponse inflammatoire. Les CML migrent vers l'intima, prolifèrent et adoptent un phénotype sécrétoire permettant la formation de la chape fibreuse recouvrant le cœur nécrotique et le remodelage excentrique de la paroi artérielle (Gibbons and Dzau, 1994). Ce changement de phénotype est caractérisé par une perte des protéines contractiles, une altération du métabolisme calcique ainsi que l'apparition d'un réticulum endoplasmique et d'un appareil de Golgi développés (Owens et al., 2004) induisant le phénotype sécrétoire. Ce phénotype est à l'origine d'une matrice extracellulaire riche en collagène, en fibres élastiques, en glycoprotéines et en protéoglycanes. Les CML expriment également les RSs et peuvent donc devenir des cellules spumeuses (Campbell and Campbell, 1994). Les CML induisent également la calcification des plaques par accumulation de calcium et de phosphate en formant des cristaux d'hydroxyapatite (Demer and Tintut, 2008). Le collagène fibrillaire, majoritairement de type III, secrété compte

pour 30 à 60% de la masse sèche des plaques au niveau de la chape fibreuse (Stary et al., 1995). Si les facteurs de risques persistent, la lésion progresse doucement durant de nombreuses années entraînant un mécanisme complexe de remodelage artérielle et l'augmentation de la taille des plaques d'athérome jusqu'à l'apparition d'évènements cliniques (Figure 23).



**Figure 23 :** Développement des lésions athéromateuses et formation d'un thrombus (Adapté de Sanz et al., 2008).

MMP : matrix metalloproteinase; VCAM : vascular cell adhesion molecule; ICAM : intercellular adhesion molecule.

#### 2.4.6. Effet pro-athérogène des LDLox plasmatiques

Après l'absorption intestinale, les produits d'oxydation lipidiques (oxystérols et 4-HNE notamment) se retrouvent au niveau plasmatique. Les mmLDL, présentent un taux faible de produits de l'oxydation lipidique et une altération mineure de l'ApoB100 n'empêchant pas sa reconnaissance par le récepteur ApoB100/E (Negre-Salvayre et al., 1990). L'augmentation de l'oxydation des LDL modifie l'ApoB100 par fixation du 4-HNE sur un résidu lysine et contribue à l'athérogénéité des LDLox. Les LDL fortement modifiées sont reconnues par les RSs non régulés induisant la formation de cellules spumeuses (Steinberg et al., 1989). Les propriétés athérogènes des LDLox sont dues à la présence des lipides oxydés (oxystérols, acides gras oxydés) (Negre-Salvayre et al., 1990). Les effets varient selon la concentration et le degré d'oxydation des LDL mais il est difficile d'établir la part respective de chaque type de lipides

oxydés. Les mmLDL où l'oxydation n'est que partielle, participent également à la formation de la plaque d'athérome (Witztum and Steinberg, 1991).

Les LDLox sont principalement captées par les RSs des macrophages et des CML. Il existe différentes classes de récepteurs capables de lier les LDLox à l'origine de la formation des cellules spumeuses ainsi que la cascade de signalisation régulant l'activité des macrophages, la réponse inflammatoire et la production d'ERO. Les RSs sont donc impliqués dans les lésions athérosclérotiques (Moore and Freeman, 2006) et différents types sont retrouvés :

- Les RS-AI et -AII sont exprimés à la surface des macrophages, des cellules endothéliales et des CML mais également à l'intérieur des plaques d'athérome (Daugherty et al., 1997). Ils ont une forte affinité pour les ApoB100 modifiées et participent au captage de 80% des LDLox par les macrophages (Kunjathoor et al., 2002).

- Les CD36 et SR-B1 qui ont des fonctions différentes dans le métabolisme lipidique et l'athérosclérose. Les CD36, présent dans les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et les plaquettes (Shaw et al., 2000), joue un rôle dans la clairance des LDLox et il est responsable de 60 à 70% de l'accumulation des esters de cholestérol dans les macrophages exposés aux LDLox (Kunjathoor et al., 2002). Le CD36 est aussi capable de lier les lipoprotéines natives non oxydées et les mmLDL (Calvo et al., 1998). SR-BI, présent au niveau des macrophages, capte également les LDLox, les lipoprotéines natives (HDL, LDL, VLDL) (Gillotte-Taylor et al., 2001) et de manière sélective les esters de cholestérol des HDL. Le SR-BI participe également au transport reverse du cholestérol vers les HDL (Acton et al., 1996).

- Le CD68 de classe D qui est exprimé dans les endosomes et les lysosomes des macrophages. Il capte les LDLox mais il a un rôle mineur dans l'internalisation et participe à la dégradation endolysosomale des LDL.

- Le LOX-1 de la classe E qui est exprimé au niveau des cellules endothéliales, des CML et des macrophages (Kataoka et al., 1999). Il capte les LDLox des cellules apoptotiques et des bactéries. La surexpression de LOX-1 chez les souris ApoE accélère le développement des lésions d'athérosclérose (Inoue et al., 2005) suggérant un rôle pro-athérogène.

Les LDLox sont significativement impliquées dans l'initiation, la formation, la progression et la déstabilisation des plaques d'athérome en induisant notamment une inflammation et un

stress oxydant. Les LDLox engendrent également une dysfonction endothéliale, un recrutement des monocytes, une différenciation des macrophages ainsi qu'une prolifération des CML. Ils sont également pro-apoptotiques à forte concentration.

Plus précisément, les effets pro-athérogènes des LDLox sont :

- L'augmentation des protéoglycanes et glycosaminoglycanes favorisant la rétention des LDL (Gargiulo et al., 2017).
- La surexpression de facteurs de croissance et de cytokines favorisant l'accumulation des macrophages dans les lésions par MCP-1 et GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor*), la prolifération des CML et la réponse inflammatoire (TNF- $\alpha$ , IL-1) (Libby, 2000).
- La surexpression de la matrice extracellulaire impliquée dans la fibrose, la sténose, la rétention des lipoprotéines et la stabilité de la plaque (Kaplan and Aviram, 2001).
- La surexpression d'enzymes oxydantes comme la 15-lipoxygénase (Galle et al 2006).
- La surexpression de métalloprotéinases stimulant la migration cellulaire, le remodelage vasculaire et la fragilité de la plaque (Rajavashisth et al., 1990).
- La modulation de protéines pro-thrombotiques avec une augmentation de la synthèse des facteurs tissulaires par l'endothélium et des thromboxanes par les plaquettes (Berliner and Heinecke, 1996).
- L'augmentation de la concentration en calcium cytosolique provoquant la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Vindis et al., 2005).
- Le développement la dysfonction endothéliale par diminution de la vasodilatation artérielle (Kugiyama et al., 1990) lié à une augmentation de la calveoline-1 inhibant la production de NO par la eNOS (Feron et al., 1999).
- Le développement du cœur lipidique des plaques d'athérome ainsi que la rupture par déstabilisation en affectant la composition en collagène de la chape fibreuse et en augmentant le taux de sécrétion des MMP produites par les macrophages (Xu et al., 1999).
- La contribution à la néovascularisation des plaques et la fragilité des capillaires aboutissant à une hémorragie intra-plaque favorisant le risque de rupture (Negre-Salvayre et al., 2017).

Les LDLox, plus denses, contiennent des teneurs plus élevées en cholestérol libre en lysophospholipide et en ApoB modifiée. Un taux de LDLox élevé est associé à un risque important de développer des maladies coronariennes. En effet, la suppression des LDLox circulantes, chez la souris ApoE<sup>-/-</sup>, prévient totalement la formation des lésions athérosclérotiques (Ishigaki et al., 2008).

#### 2.4.7. Effets bénéfiques des HDL

Les HDL ont un rôle majeur dans la prévention du développement des plaques d'athérome. Les effets bénéfiques anti-athérogènes des HDL sont associés à leur rôle dans le transport inverse du cholestérol et à leurs propriétés biologiques antioxydantes et anti-inflammatoires (Negre-Salvayre et al., 1990).

Le transport inverse du cholestérol par les HDL a pour but d'éliminer le cholestérol en excès présent dans les tissus périphériques. Les HDL transportent ainsi le cholestérol des tissus périphériques jusqu'au foie, qui après leur captage via un récepteur spécifique (SR-BI), l'élimine sous forme de cholestérol biliaire après métabolisation extra-lysosomale (Figure 24).

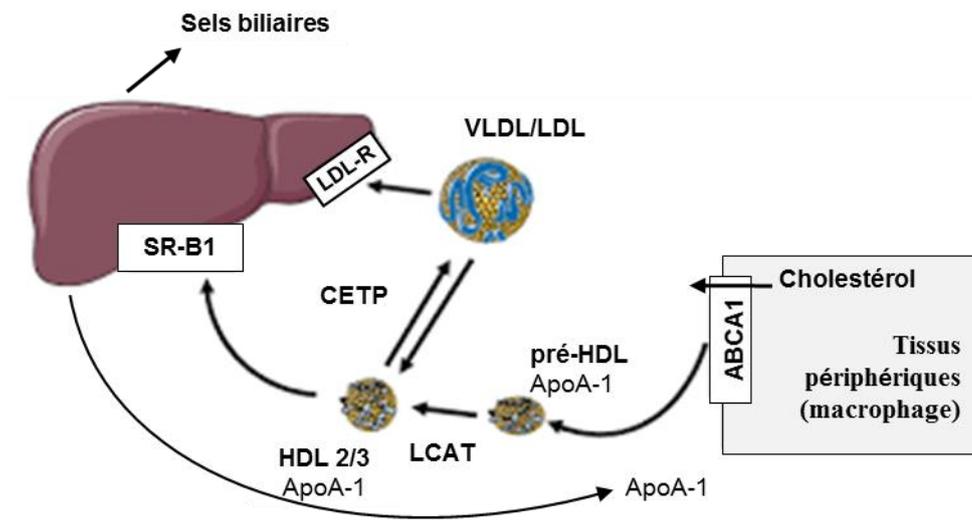
Les HDL peuvent également récupérer des AGPI oxydés, par la lipoxygénase, au niveau des LDL et les convertir en composés inertes moins toxiques (hydroxydés) (Sattler et al., 1995) qui seront alors captés par le foie et éliminés. Cette voie constitue un mécanisme de détoxification des lipides oxydés.

La paraoxonase (PON), notamment la PON3, est une enzyme calcium-dépendante associée aux HDL qui est capable d'hydrolyser les acides gras oxydés des phospholipides. Elle permet ainsi de réduire l'accumulation de lipides oxydés dans les LDL, et donc leurs effets pro-inflammatoires (Aviram and Rosenblat, 2004).

Chez l'homme, des études montrent qu'un taux de HDL élevés améliore la fonction endothéliale par augmentation de la production de NO (Yuhanna et al., 2001). Les HDL sont également capables de réduire l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et l'activation de l'inflammation par la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et la production d'ERO (Robbesyn et al., 2003).

Pour finir, les HDL inhibent la migration des CML et favorisent celle des cellules endothéliales ce qui aide à maintenir l'intégrité endothéliale face aux lipoprotéines (Seetharam

et al., 2006). Les HDL ont également un effet inhibiteur au niveau de l'activation et de l'agrégation plaquettaire (Aviram and Brook, 1983) réduisant le risque de thrombose et d'ischémie.



**Figure 24 :** Transport inverse du cholestérol.

CETP: Cholesteryl Ester Transfer Protein; SR B1 : Scavenger Receptor B1; LDL-R : LDL récepteur; LCAT : Lécithine Cholesterol Acyl Transférase; ABCA1: ATP-binding cassette A1.

## 2.5. Les conséquences cliniques des plaques d'athérome avancées

Il existe deux types de plaques d'athérome vulnérables : les plaques susceptibles à l'érosion avec une perte partielle d'endothélium et une exposition à la lumière artérielle du sous-endothélium riche en CML et les plaques susceptibles à la rupture responsables de thromboses et par suite d'ischémies. Les infarctus du myocarde, les AVC et les embolies pulmonaires sont des événements aigus principalement dus à une ischémie. L'ischémie est définie comme un apport en oxygène et nutriments inférieur aux besoins des cellules. Celle-ci est le plus souvent provoquée par obstruction ou rétrécissement de la lumière de l'artère en amont des cellules irriguées. Le mécanisme sous-jacent à l'apparition d'une ischémie est l'athérosclérose qui se développe sur de longues années atteignant un stade avancé lorsque les symptômes cliniques se manifestent.

La rupture de la plaque d'athérome fait suite à la perte d'intégrité physique de la capsule fibreuse (une fine capsule fibreuse inflammatoire et un large cœur nécrotique) par l'élévation de la contrainte pariétale (Richardson et al., 1989). Un volume de cœur nécrotique supérieur à 40% du volume total de la plaque augmente le risque de rupture (Kolodgie et al., 2001). Les autres critères majeurs de vulnérabilité susceptibles d'aboutir à une rupture de la plaque d'athérome sont la richesse de la plaque en esters de cholestérol qui la rend « molle » et moins résistante au flux sanguin (Loree et al., 1994) ainsi que la dégradation du collagène par les MMP 2/3/9 (Galis et al., 1994) induites par les cytokines pro-inflammatoires et l'inhibition de sa synthèse par l'IFN- $\gamma$  (*Interferon- $\gamma$* ) (Lee and Libby, 1997) qui ont pour effet de déstabiliser la capsule fibreuse. L'apoptose des cellules vasculaires de la plaque (cellules endothéliales, macrophages et CML) ainsi que l'hémorragie intra-plaque augmentent également la vulnérabilité de la plaque d'athérome. La formation d'un thrombus par l'activation et l'agrégation plaquettaire est responsable d'événements cliniques éloignés. Le thrombus selon son volume et sa localisation entraîne des infarctus du myocarde, des AVC ischémiques, des ischémies des membres inférieurs ou des embolies pulmonaires. La formation d'un thrombus au niveau d'une plaque d'athérome est induite dans 60% des cas par une rupture de la capsule fibreuse et pour 40% des cas à l'érosion (Taubman et al., 1997). La rupture des plaques est généralement causée par une hausse de la pression artérielle en réponse à l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique lors de l'exercice physique ou d'un stress émotionnel (Mittleman and Mostofsky, 2011).

A l'inverse, une plaque stable caractérisée par une chape fibreuse importante peut rester silencieuse cliniquement ou obstruer le vaisseau aboutissant également à une ischémie. En effet, lorsque la surface excède 40% de la surface totale de la paroi, le remodelage de la paroi n'est plus suffisant pour contenir la plaque. Le développement se fait au détriment du diamètre de la lumière artérielle entraînant une sténose progressive.

Finalement, l'occurrence des événements cardiovasculaires résulte de la structure de la plaque et des facteurs de risque de l'individu.

## **2.6. Effets au niveau vasculaire des oxystérols et du 4-HNE**

### *2.6.1. Effet pro-athérogène des oxystérols*

La consommation ou la production d'oxystérol peut entraîner des effets athérogènes, cytotoxiques, mutagènes, apoptotiques et cancérogènes impliqués dans de nombreuses maladies dégénératives telles que les maladies cardiovasculaires.

Les oxystérols s'accumulent dans l'espace sous-endothéliale durant le processus athéromateux et modulent le développement de l'athérosclérose (Witztum and Steinberg, 2001). De nombreuses études ont montré que les oxystérols sont impliqués dans l'initiation et la progression athérosclérose (Brown and Jessup, 1999).

Les oxystérols ont un effet sur la stabilité membranaire. En effet, les oxystérols, présents dans les LDLox, peuvent s'incorporer dans les membranes cellulaires et altérer leurs fonctionnements. Le 7-kétocholestérol s'incorpore dans les microdomaines de la membrane des macrophages et il est à l'origine de la translocation d'un canal calcique dont l'activation conduit à l'apoptose (Berthier et al., 2004). Au niveau des membranes des cellules endothéliales, l'incorporation des oxystérols active les transporteurs  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase provoquant une rigidité endothéliale et une altération de la vasodilatation en réponse au flux sanguin (Gargiulo et al., 2017). Les oxystérols sont également impliqués dans la rupture de la membrane lysosomale induisant la mort cellulaire (Yuan et al., 2000).

Les oxystérols ont un effet pro-inflammatoire en augmentant la synthèse des molécules d'adhésions ICAM-1 et VCAM-1, la sécrétion d'IL-1/IL-6/IL-8, de MCP-1 et des intégrines  $\beta 1$

ainsi que l'activation de la voie MAPK/Nf- $\kappa$ B. Les 22 et 27-hydroxycholestérol peuvent également activer la synthèse du facteur de transcription TNF- $\alpha$  (Gargiulo et al., 2017).

L'effet pro-oxydant des oxystérols est induit par l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase entraînant une surproduction d'anion superoxyde et d'ERO intracellulaires. La présence de 7-kétocholestérol dans les cellules entraîne un stress du réticulum endoplasmique et une apoptose cellulaire par l'intermédiaire des caspases 3 et 7 à la suite de l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase 4 chez les humains. De plus, les oxystérols peuvent réduire par association la biodisponibilité du NO sans affecter la eNOS (Gargiulo et al., 2017).

Les oxystérols peuvent également induire la mort cellulaire par voie mitochondriale, en altérant la concentration cytosolique en calcium due à l'augmentation des ERO et du stress du réticulum endoplasmique. En effet, l'altération de la concentration du calcium provoque une mauvaise déphosphorylation de la calcineurine, une augmentation du complexe calpaïne/ $\text{Ca}^{2+}$ , le clivage de Bid et un relargage de cytochrome C. Ils induisent l'apoptose en agissant sur le cycle cellulaire par activation de la protéine p53. En plus de l'apoptose, les oxystérols entraînent une dysfonction de l'autophagie (Gargiulo et al., 2017).

Pour finir, une étude a montré chez les souris ApoE<sup>-/-</sup> que les oxystérols peuvent accélérer la déstabilisation et la rupture de la plaque en augmentant l'infiltration et la différenciation des macrophages ainsi que l'activité des MMP 2 et 9 (Sato et al., 2012).

### *2.6.2. Effet pro-athérogène du 4-HNE*

Les effets de la réactivité du 4-HNE au niveau vasculaire dépendent de sa concentration locale et de l'expression des enzymes détoxifiantes telles que la glutathion S-transférase, l'aldose réductase et l'aldéhyde déshydrogénase qui permettent l'élimination rapide du 4-HNE des cellules (Jin et al., 2014). La concentration physiologique de 4-HNE (0,1-1  $\mu\text{mol/L}$ ) induit des réponses homéotiques comme la synthèse d'enzymes antioxydantes (Zhong et al., 2014) ou d'enzymes promouvant la survie et la prolifération cellulaire (Poli et al., 2008). En effet, le 4-HNE, à très faible concentration, active les facteurs de transcription (Nrf2, Nf- $\kappa$ B) régulant diverses réponses de signalisation hormonale et de survie cellulaire. Cependant, il possède des effets inflammatoires et apoptotiques à des concentrations plus élevées. Des concentrations modérées de 4-HNE, allant de 1 à 10  $\mu\text{mol/L}$ , induisent une accumulation d'adduit sur les

protéines et une inflammation. Des concentrations plus élevées, supérieure à 10-60  $\mu\text{mol/L}$ , peuvent induire un dysfonctionnement cellulaire, une fragmentation de l'ADN et une apoptose dans des conditions de stress oxydant élevé. A une concentration très élevée ( $> 100 \mu\text{mol/L}$ ), le 4-HNE devient extrêmement toxique et inhibe la synthèse de protéines, d'ADN et d'enzymes glycolytiques ainsi que la respiration mitochondriale (Luczaj et al., 2017).

Le 4-HNE possède de nombreuses propriétés biologiques résultant principalement de la formation d'adduits protéiques sur les groupements thiol des acides aminés ce qui altère le fonctionnement et la structure des protéines induisant une dysfonction cellulaire et des dommages tissulaires favorisant l'athérosclérose.

La formation d'adduits protéiques peut se faire sur des enzymes, comme la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, l'hexokinase, l'aldolase, la lactate déshydrogénase, le glucose-6-phosphate déshydrogénase, l'ADN polymérase, ou des protéines de la signalisation cellulaire (récepteurs adrénergiques, adénylate cyclase) entraînant des dysfonctionnements des voies métaboliques et de signalisation cellulaire (Negre-Salvayre et al., 2008).

Parmi la variété de cibles cellulaires, le 4-HNE peut modifier les protéines impliquées dans le remodelage de la plaque athéromateuse, notamment les récepteurs de facteurs de croissance (*Platelet-derived Growth Factor Receptor*, *Epidermal-growth Factor Receptor*), les protéines du cycle cellulaire et des mitochondries, les composants du réticulum endoplasmique ou des protéines de la matrice extracellulaire, altérant progressivement la prolifération des CML, l'angiogenèse et l'apoptose. Les adduits protéiques de 4-HNE s'accumulent dans le cœur nécrotique des lésions avancées et peuvent localement contribuer à l'apoptose des macrophages et des CML ce qui induit une déstabilisation et/ou une rupture de la plaque augmentant ainsi le risque d'événements athérotrombotiques.

Le 4-HNE est plus précisément impliqué dans :

- Les dommages de la barrière endothéliale et de la perméabilité en diminuant la communication intercellulaire, en provoquant un stress des filaments d'actine et des jonctions serrées intercellulaires (Gargiulo et al., 2017).

- Le découplage de la eNOS par déplétion de  $\text{BH}_4$  induit par la dégradation protéosomale de la GTP cyclohydrolase (responsable de la synthèse *de novo* du  $\text{BH}_4$ ) et par la réduction de l'activité des dimères restants par diminution de la phosphorylation de la sérine1177 via la voie akt (Negre-Salvayre et al., 2017).

- La stimulation de l'inflammation par l'augmentation de la synthèse du MCP-1, du PKC- $\beta$ 1, de l'IL-8, de l'IL-1 $\beta$  et du TNF- $\alpha$  ainsi que par l'augmentation de l'expression de la cyclo-oxygénase et de la 5-lipoxygénase, des protéases calpaïne dépendantes et des récepteurs CD36 et RS-A (Gargiulo et al., 2017).

- L'accumulation d'adduits protéiques de 4-HNE produit des agrégats de haut poids moléculaire stimulant le stress du réticulum endoplasmique. Par la suite, le stress du réticulum endoplasmique entraîne une diminution de l'UPR (*Unfolded Protein Response*), une altération de l'activité protéolytique, une inhibition du protéasome et une activation de l'autophagie. De plus, le stress du réticulum endoplasmique pourrait avoir un rôle dans l'activation endothéliale et dans l'inflammation indépendamment de la production d'ERO et de la déplétion en glutathion. Le 4-HNE peut également former des adduits protéiques sur les oxydoréductases, les disulfures isomérasés et les protéines chaperonnes telles que « *Heat shock 70 protein 5* » (HSPA5), inhibant l'activité du réticulum endoplasmique et induisant l'apoptose (Negre-Salvayre et al., 2017).

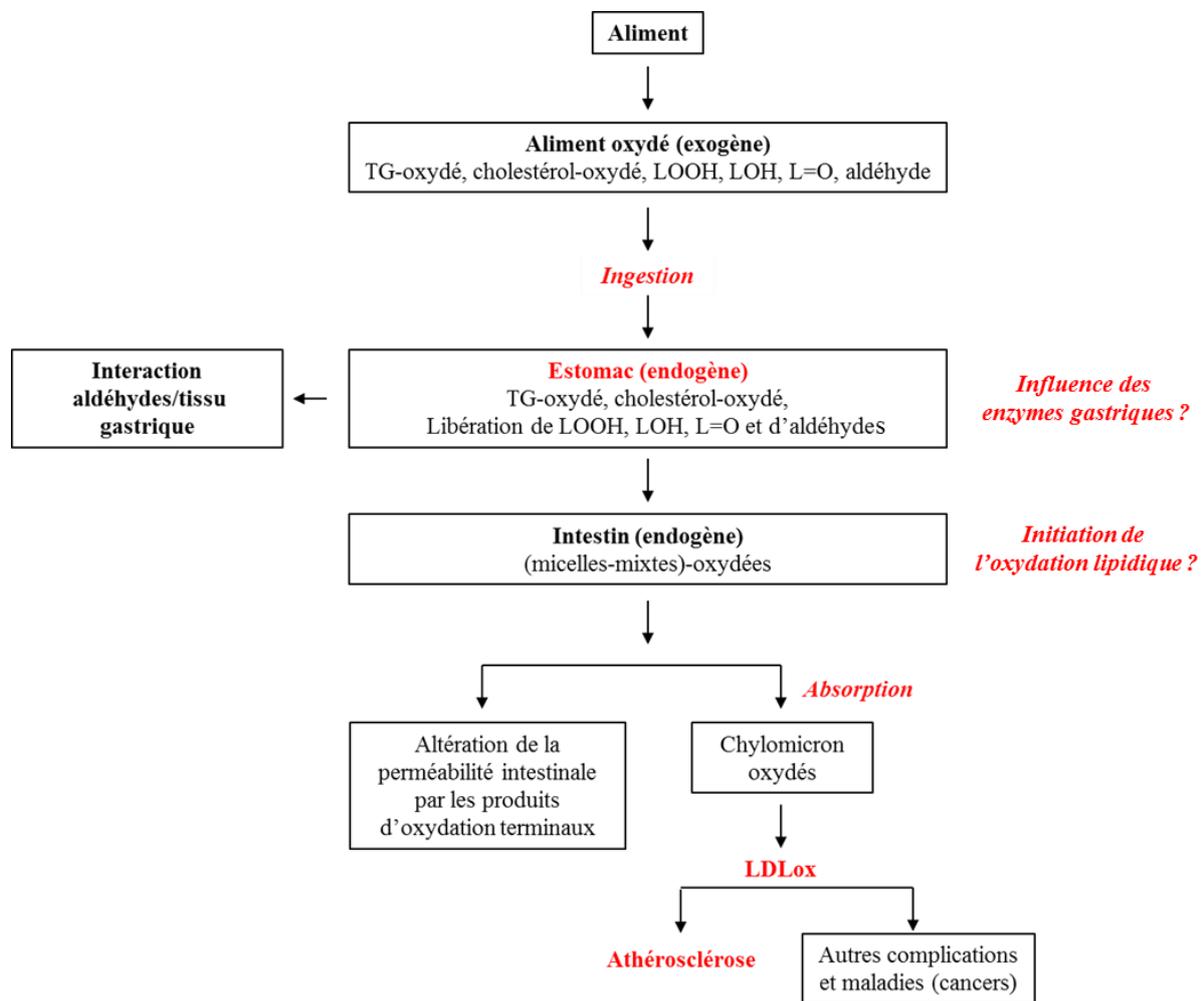
- L'apoptose cellulaire par voie intrinsèque ou extrinsèque. Par la voie intrinsèque, la voie apoptotique mitochondriale est induite par les ERO et elle est caractérisée par la dérégulation du potentiel de membrane, l'altération de l'homéostasie calcique des cellules endothéliales et des CML provoquant un « *swelling* » mitochondriale et la formation des pores mPTP (*membrane Permeability Transition Pore*) régulant cette apoptose. De plus, l'altération de l'homéostasie calcique peut entraîner la diminution de la production d'ATP et la mort cellulaire par nécrose. La voie extrinsèque fait intervenir des récepteurs cellulaires de surface comme le TNF- $\alpha$ , les récepteurs Fas/CD95 ou TRAIL (*TNF Related Apoptosis Inducing Ligand*). Le 4-HNE mime les effets du ligand du récepteur Fas et transmet le signal apoptotique. Enfin, l'inhibition du protéasome et de l'ubiquitinylation des protéines entraînent l'apoptose cellulaire (Negre-Salvayre et al., 2017).

- La stimulation de l'expression de la protéine p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire et par suite l'apoptose par l'expression de Bax (Laurora et al., 2005). Il peut également arrêter le cycle cellulaire en phase G1/S possiblement par la réduction de l'expression de cycline D1, D2 et l'augmentation de l'expression de la cycline-A (Pizzimenti et al., 1999).

- La sénescence, ou un vieillissement prématuré, des cellules endothéliales par la formation du pro-oxydant TXNIP (*Thioredoxine-Interacting Protein*) (Riahi et al., 2015), par la perte d'élastine induite par l'action des MMP 9 et ainsi que l'autophosphorylation de ERK/1 contribuent au vieillissement vasculaire (Negre-Salvayre et al., 2017).

L'efflux du cholestérol en modifiant l'ApoA-1 et le récepteur ABCA-1 ce qui favorise la rétention et les effets délétères du cholestérol dans la paroi vasculaire (Negre-Salvayre et al., 2017).

Le 4-HNE est donc un marqueur de stress oxydant, d'oxydation lipidique et potentiellement un marqueur de vieillissement vasculaire induit par le stress oxydant. Les deux produits d'oxydation lipidique, les oxystérols et le 4-HNE, entraînent une aggravation de la dysfonction endothéliale, de l'inflammation, de la mort cellulaire par apoptose, autophagie et nécrose ainsi qu'une augmentation de la vulnérabilité de la plaque d'athérome (Figure 25).



**Figure 25 :** Principales étapes aboutissant au développement de l'athérosclérose ou à d'autres pathologies après ingestion de lipides sensibles à l'oxydation.

*A retenir*

**- Les pathologies ischémiques sont la première cause de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés.**

**- Elles ont pour origine une dysfonction endothéliale, responsable de la rétention et de la modification des lipoprotéines LDL ayant pour conséquence la formation de plaques d'athérome.**

**- Les LDLox plasmatiques d'origine alimentaire accélèrent le développement des plaques d'athérome.**

### 3. Protection de la fonction vasculaire par les antioxydants alimentaires

Au vu de l'importance des régimes alimentaires délétères dans les pays industrialisés et les conséquences néfastes sur la santé cardiovasculaire, il apparaît nécessaire de mettre en place des stratégies de prévention primaire. Ainsi, la mise en place d'une stratégie naturelle de supplémentation alimentaire riche en fruits et légumes pourrait s'avérer primordiale. En effet, outre leur abondance en vitamines, en fibres et leur faible teneur en calories, les fruits et légumes sont riches en antioxydants tels que les caroténoïdes, les vitamines C et E et les polyphénols. De nombreuses études épidémiologiques suggèrent que les polyphénols, omniprésents dans les céréales, les fruits et les légumes ainsi que dans leurs produits dérivés (vin, thé), pourraient exercer un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires. Une supplémentation en polyphénols lors de la prise alimentaire pourrait protéger la santé cardiovasculaire des effets néfastes de l'oxydation lipidique endogène.

#### 3.1. Antioxydants alimentaires

Le terme antioxydant prend en compte une définition assez large et caractérise les molécules qui inhibent de manière significative (même à très faible concentration par rapport à la molécule cible) l'oxydation de biomolécules sensibles (lipides, protéines, glucides, acides nucléiques) et dont la protection est une priorité pour le bon fonctionnement de l'organisme. Les systèmes de défenses antioxydants sont nombreux et de nature différents. Certaines molécules sont synthétisées par notre organisme (glutathion, ubiquinol) alors que d'autres sont d'origine alimentaire (vitamines, polyphénols, caroténoïdes). Notre alimentation joue un rôle primordial dans la protection contre le stress oxydant en apportant des antioxydants exogènes. La prévention nutritionnelle du stress oxydant implique l'optimisation des apports et une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'effet antioxydant de molécules exogènes. Les principaux antioxydants d'origine alimentaire sont :

➤ les micronutriments avec les vitamines C et E, la vitamine A (rétinol) et les minéraux essentiels à l'activité des enzymes antioxydantes et font l'objet d'un apport journalier recommandé,

➤ les microconstituants qui n'ont pas de valeur nutritionnelle et dans lesquels se retrouvent les composés phénoliques, une classe diversifiée de métabolites secondaires des végétaux, et les caroténoïdes.

Les antioxydants protègent leur cible par différentes stratégies qui sont :

- le piégeage des ERO de manière chimique,
- la chélation sous forme inerte des métaux de transition de basse valence ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ) produisant des ERO (réaction de Fenton),
- l'inhibition d'enzymes pro-oxydantes ou impliquées dans la production des ERO,
- la régénération d'antioxydants naturels (ex :  $\alpha$ -tocophérol).

Par ailleurs, une alimentation de type méditerranéenne, caractérisée par une consommation riche en fruits (dont les fruits à coques), en légumes, en céréales, en herbes aromatiques, en produits transformés d'origine végétale (vin, thé, huile végétale) en association avec une consommation modérée de produits laitiers, d'œuf ainsi qu'une consommation limitée de poisson voire faible de viande, est souvent citée en exemple pour ses bienfaits sur la santé.

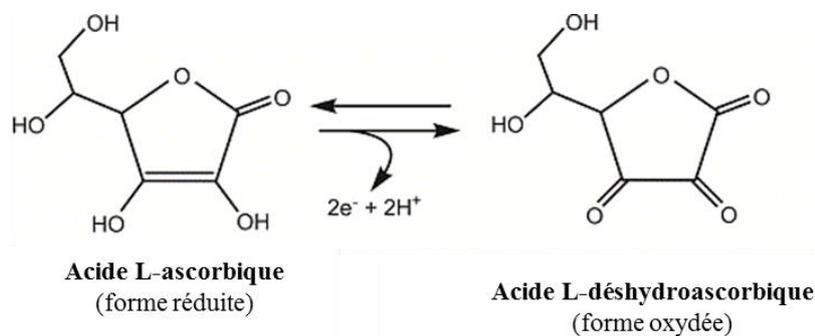
### **3.2. Mécanisme d'action et sources alimentaires en vitamines C et E**

#### *3.2.1. La vitamine C*

La vitamine C est une vitamine hydrosoluble sensible à la chaleur et à la lumière. La forme réduite est l'acide L-ascorbique conjugué avec sa base, l'ion ascorbate (Figure 26). L'acide L-ascorbique est l'antioxydant le plus important dans le milieu extracellulaire. L'homme étant incapable de le synthétiser à partir du D-glucose, il doit être apporté par l'alimentation. Selon les apports nutritionnels conseillés en France, l'apport en vitamine C doit être de 110 mg/jour pour un adulte. Les sources alimentaires les plus riches en vitamine C sont l'acérola, les agrumes (orange, pamplemousse rose), le cassis, le poivron rouge, le kiwi, la fraise, l'ananas, le brocoli, le chou fleur et le chou de Bruxelles.

Dans les tissus et organes, la forme réduite est majoritaire alors que la forme oxydée ne représente qu'environ 10% de la vitamine C totale. La demi-vie de la vitamine C chez un adulte est de 20 jours avec un turnover de 1 mg/kg/j pour un taux corporel total de 1500 mg (Basu and

Donaldson, 2003). La vitamine C possède un potentiel réducteur et participe à de nombreuses réactions d'hydroxylation en tant que cofacteur. C'est aussi un piègeur efficace de l'anion superoxyde, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et peroxydes et de l'oxygène singulet. En piégeant les radicaux dans la phase aqueuse, ceux-ci n'amorcent pas l'oxydation lipidique protégeant ainsi les membranes cellulaires et les lipoprotéines. De plus, la vitamine C est l'un des meilleurs stimulants des défenses immunitaires, elle facilite l'absorption du fer non hémérique par l'organisme (céréales, fruits, légumes secs, etc.) et participe à la synthèse du collagène.

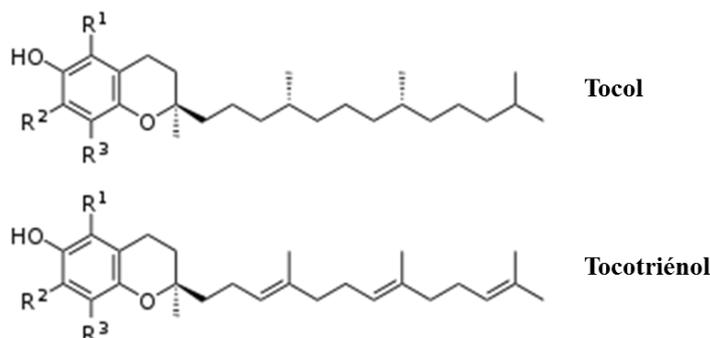


**Figure 26 :** Représentation de la forme réduite et oxydée de la vitamine C.

### 3.2.2. La vitamine E

La vitamine E est la principale vitamine liposoluble présente au niveau plasmatique et dans les érythrocytes humains. Elle regroupe huit molécules organiques comprenant quatre tocophérols et quatre tocotriénols (présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale) dont la forme la plus biologiquement active est l' $\alpha$ -tocophérol. Cependant, la forme majoritaire dans l'alimentation est le  $\gamma$ -tocophérol. La vitamine E est un micronutriment essentiel dont les apports nutritionnels conseillés sont de 9,9 mg par jour pour les femmes et 15,5 pour les hommes adultes. Le tocol, la structure de base des tocophérols, est constitué d'un noyau hydroxychromane fixé sur une chaîne phytyle saturée. La différence entre les formes alpha, bêta, gamma et delta réside dans le nombre et la position des groupements méthyles sur le noyau chromanol (Figure 27). La vitamine E est synthétisée par les plantes. Les sources de vitamines E les plus riches sont l'huile de tournesol, l'huile de noisette, l'huile de colza, l'huile d'olive,

la margarine, le germe de blé, les amandes, les noix, les noisettes, les pignons de pin et les céréales. Les produits d'origine animale (lait, viande, volaille, œufs) en contiennent en moindre mesure mais contribuent aux apports alimentaires par leur consommation fréquente (Frei, 1994). Les tocophérols sont généralement présents dans l'alimentation sous forme d'esters (acétate ou succinate). Après ingestion, la vitamine E est libérée par des estérases pancréatiques ou duodénales. Cependant, son absorption est incomplète (de 21 à 74%) (Frei, 1994) et facilitée par l'absorption simultanée de graisses alimentaires. La vitamine E est véhiculée dans le sang par les lipoprotéines et la forme circulante majoritaire est l' $\alpha$ -tocophérol (80-90%). Elle est retrouvée à un taux plasmatique compris entre 5 et 16 mg/L. La vitamine E peut s'accumuler dans les tissus en concentration variable selon son utilisation. La présence de vitamine E dans les lipoprotéines et les membranes cellulaires joue un rôle essentiel dans la protection contre l'oxydation lipidique. Ainsi, elle agit en piégeant l'oxygène singulet, en réduisant les radicaux hydroxyles ( $\text{HO}^\bullet$ ) et peroxydes ( $\text{ROO}^\bullet$ ) inhibant ainsi la phase de propagation dans le processus d'oxydation lipidique dans les structures lipidiques. Pour finir, l' $\alpha$ -tocophérol peut être régénéré soit par l'acide L-ascorbique en réduisant le radical tocophéryle ou par la tocophéryl réductase (glutathion dépendante) capable également de réduire le radical tocophéryle en  $\alpha$ -tocophérol (Delattre, 2005).



Dénomination	R1	R2	R3
$\alpha$ -tocophérol (5,7,8-triméthyltolcol) / $\alpha$ -tocotriénol (5,7,8-triméthyltocotriénol)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\beta$ -tocophérol (5,8-diméthyltolcol) / $\beta$ -tocotriénol (5,8-diméthyltocotriénol)	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
$\gamma$ -tocophérol (7,8-diméthyltolcol) / $\gamma$ -tocotriénol (7,8-diméthyltocotriénol)	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\delta$ -tocophérol (8-méthyltolcol) / $\delta$ -tocotriénol (8-méthyltocotriénol)	H	H	CH <sub>3</sub>

**Figure 27** : Représentation des formules développées des tocophérols et des tocotriénols.

### 3.3. Les polyphénols

Le terme de « polyphénol » est utilisé depuis 1960 pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux en remplacement du terme de « tanin végétal ». L'ancien terme de « tanin » désignait les composés présentant un grand nombre d'unités phénoliques et capables de former des réseaux avec des molécules de collagène (action de tanner). Les composés phénoliques ont en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La désignation du terme « polyphénols » ne concerne que les molécules possédant plusieurs unités phénoliques. Cependant, dans le sens le plus large le terme « polyphénol » est utilisé pour l'ensemble des composés y compris ceux ne possédant qu'un seul groupe phénolique.

Depuis deux décennies, les polyphénols ont une importance croissante du fait de leurs propriétés antioxydantes, de leur abondance dans l'alimentation ainsi que de leur rôle probable dans la prévention de maladies associées à un stress oxydant et/ou une inflammation (cancers, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives) et ils sont donc de plus en plus étudiés (Santos-Buelga and Scalbert, 2000). Ils sont également utilisés comme additifs dans l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

#### 3.3.1. Définition et rôles des polyphénols dans la plante

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. Par opposition aux caroténoïdes largement lipophiles, les polyphénols sont des métabolites secondaires généralement hydrosolubles. Ils sont synthétisés par la plante par une combinaison de deux voies : acétate/malonate et shikimate. Les polyphénols s'accumulent plus particulièrement dans les vacuoles intracellulaires de la plante mais on peut retrouver certaines molécules associées aux parois cellulaires. Actuellement, près de 8000 structures phénoliques sont connus dont 6000 sont des flavonoïdes (Garcia-Salas et al., 2010). Les polyphénols sont à l'origine d'une grande diversité de fonction chez les plantes permettant de préserver leur intégrité. Ainsi, ils participent à la résistance aux microorganismes, aux insectes, aux animaux herbivores et aux facteurs de stress environnementaux (rayonnement UV, déshydratation par température élevée, présence de métaux lourds). Ils interviennent également dans la croissance

et le développement de la plante en régulant le transport d'auxines polaires ou comme biorégulateur de certaines parties de la plante (racines, tiges, bourgeons, feuilles). Enfin, les polyphénols jouent un rôle dans la protection contre le stress oxydant, l'absorption du fer, la pigmentation des fruits et légumes et dans la relation symbiotique avec les bactéries du sol pour la fixation de l'azote.

### 3.3.2. *Classification et principales sources alimentaires des polyphénols*

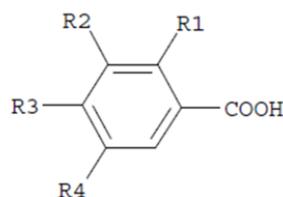
Les composés phénoliques peuvent être classés selon leur squelette carboné de base. Ils sont divisés en deux grandes classes, les acides phénoliques (non flavonoïdes) et les flavonoïdes.

#### 3.3.2.1. Les principaux acides phénoliques

Les polyphénols non flavonoïdes ou acides phénoliques peuvent être classés suivant leur structure chimique. Les acides phénoliques sont les polyphénols les plus répandus dans notre alimentation (50%) et se trouvent sous différentes formes chez les plantes y compris sous forme d'aglycones, d'esters, de glycosides (Garcia-Salas et al., 2010; Perez-Jimenez et al., 2011). Les acides phénoliques peuvent être divisés en deux classes principales en fonction du nombre de carbones de la chaîne aliphatique : les acides hydroxybenzoïques (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) et les acides hydroxycinnamiques (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) (Tsao, 2010). Les autres classes d'acides phénoliques sont les stilbènes (dont le resvératrol), les lignanes et les polymères de lignanes.

##### ➤ *Les acides hydroxybenzoïques*

Les acides hydroxybenzoïques possèdent un squelette carboné C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> et sont présents sous forme non estérifiée en faible teneur notamment dans les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon (quelques dizaines de milligrammes par kilogramme de fruit frais) (Manach et al., 2004). Les principaux représentants de ce groupe sont les acides *p*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, syringique et gallique (Figure 28).

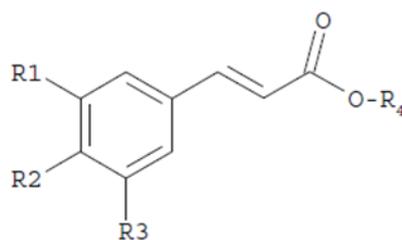


- R1, R2, R3, R4 = H : acide benzoïque
- R1, R2, R4 = H ; R3 = OH ; acide *p*-hydrobenzoïque
- R1, R4 = H ; R2, R3 = OH : acide protocatéchique
- R1, R4 = H ; R2 = OCH<sub>3</sub> ; R3 = OH : acide vanillique
- R1, R3 = OCH<sub>3</sub> ; R2 = OH ; R4 = H : acide syringique
- R1 = H ; R2, R3, R4 = OH : acide gallique

**Figure 28 :** Structure chimique des différents acides hydroxybenzoïques.

### ➤ *Les acides hydroxycinnamiques*

Les acides hydroxycinnamiques sont caractérisés par un squelette carboné C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> dont la structure de base dérive de l'acide cinnamique. Les plus abondants dans l'alimentation sont l'acide caféique et l'acide férulique, puis l'acide *p*-coumarique et l'acide sinapique (Figure 29). L'acide férulique est abondant dans les céréales (0,8-2 g/kg de matière sèche et jusqu'à 90% des polyphénols totaux) et le germe de blé. L'acide caféique ou acide (E) 3-(3,4-dihydroxyphényl)prop-2-énoïque est le plus abondant et peut représenter de 75 à 100% de la teneur en acides hydroxycinnamiques totaux des fruits (Manach et al., 2004). Il est présent sous forme libre ou estérifié notamment par l'acide quinique pour former l'acide chlorogénique ou 5-O-caféoylquinique. L'acide caféique est ubiquitaire dans les végétaux et particulièrement dans la sauge, la menthe douce, la cannelle de Ceylan, le thym et l'airelle rouge. L'acide chlorogénique est lui présent en grande quantité dans le café qui représente la principale source alimentaire (500 à 800 mg par litre) mais également dans les graines de tournesol, l'artichaut, les endives, les pommes de terre, les pruneaux et la pomme.

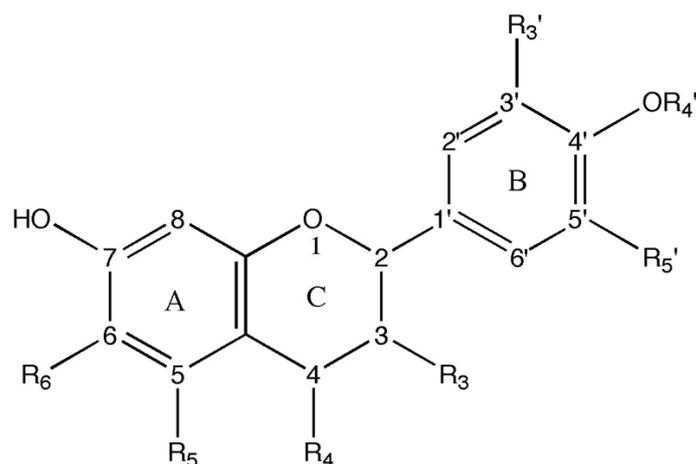


R1, R2, R3, R4 = H : acide cinnamique  
 R1, R3, R4 = H ; R2 = OH ; acide *p*-coumarique  
 R1, R2 = OH ; R3, R4 = H : acide caféique  
 R1 = OCH<sub>3</sub> ; R2 = OH ; R3, R4 = H : acide férulique  
 R1, R3 = OCH<sub>3</sub> ; R2 = OH ; R4 = H : acide sinapique  
 R1, R2 = OH ; R3 = H ; R4 = H : acide chlorogénique

**Figure 29 :** Structure chimique des principaux acides hydroxycinnamiques.

### 3.3.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> formant un tricyclic de type 2-phénylbenzopyrane (excepté pour les isoflavones). Dans cette structure, deux noyaux benzéniques phénoliques A et B sont liés par un cycle C pyranique (Figure 30). La structure de l'hétérocycle central C permet de distinguer les principales sous-classes : les flavanones, les flavones, les flavonols, les isoflavones, les flavanols et les anthocyanes (Dai and Mumper, 2010). Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits, légumes, céréales, jus de fruits, thé, vin, etc.). Ils ne sont présents dans les plantes que sous forme de glycosides sauf pour les flavanols (El Gharras, 2009). A l'intérieur des sous-classes, le degré d'hydroxylation des différents cycles, le niveau de méthylation et de glycosylation (D-glucose, L-rhamnose, D-xylose) des OH phénoliques représentent les variations possibles. Les flavonoïdes sont associés à diverses activités biologiques comme des activités antibactériennes, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-thrombotiques (Pyrzynska and Biesaga, 2009).

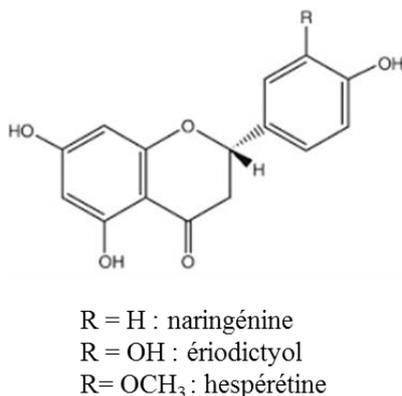


**Figure 30 :** Structure chimique générale des flavonoïdes.

Les principales sous-classes de flavonoïdes sont :

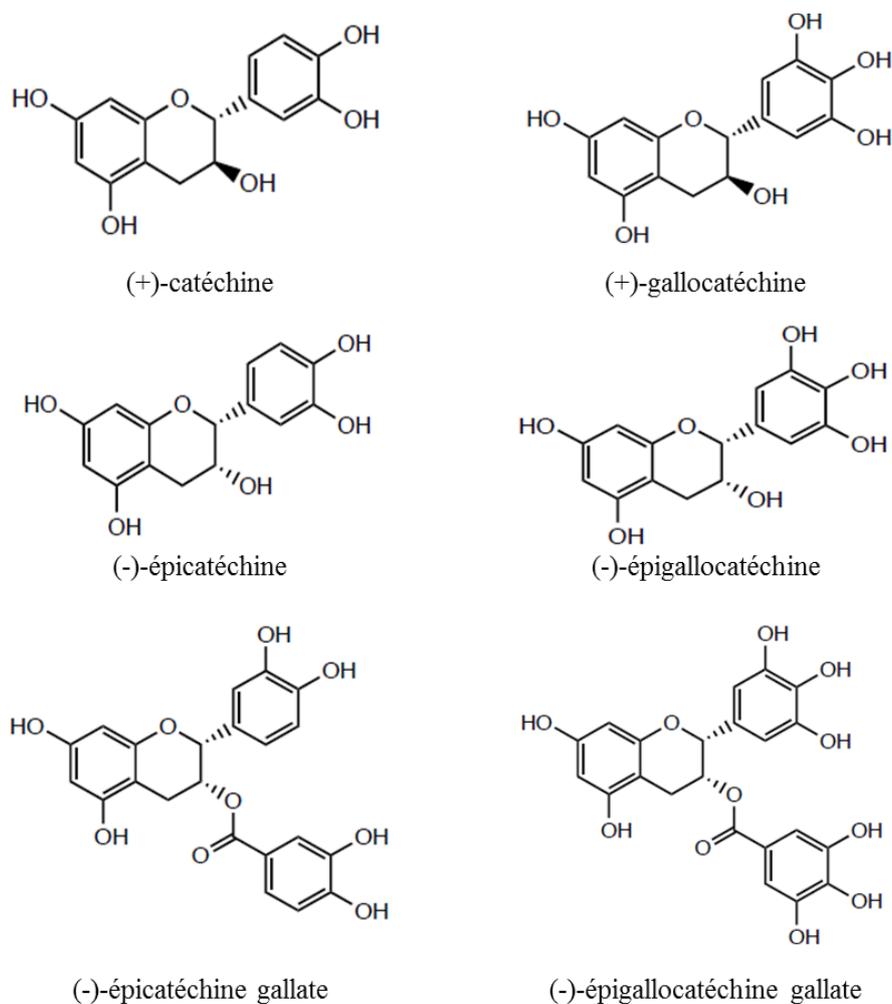
➤ *Les flavanones et flavan-3-ols*

Ils ont comme précurseur la 2-phényl-benzopyrone et ils ne présentent pas de double liaison entre le C2 et le C3. Dans l'alimentation, les principales sources de flavanones sont la tomate, les plantes aromatiques (notamment la menthe), les agrumes (orange, pamplemousse, citron) et leur jus. Les principales flavanones aglycones sont l'hespérétine (orange), la naringénine (pamplemousse, orange, raisin), l'ériodictyol (citron), le pinocembrine (miel, curcuma et la propolis) et la butine (Figure 31). Les flavanones sont généralement glycosylées en position 7 par un disaccharide (néohespéridose donnant le goût amer au pamplemousse).



**Figure 31 :** Structure chimique des principales flavanones.

Les flavanols ou flavan-3-ols sont caractérisés par la présence d'un hydroxyle OH en position 3 de l'hétérocycle C et se différencient selon les substitutions par des hydroxyles sur les cycles A et B. Les flavanols existent soit sous forme de monomère qui sont la (+)-catéchine, l'(-)-épicatéchine, la (+)-gallocatéchine et l'(-)-épigallocatéchine, soit sous forme d'oligomère ou de polymère appelés proanthocyanidines car des anthocyanidines sont libérées après chauffage en condition acide. Dans ces proanthocyanidines, les unités sont liées par des liaisons C-C de type C4-C8 et C4-C6. Les flavanols monomères peuvent être naturellement présents comme conjugués 3-O-gallates avec par exemple l'(-)-épicatéchine gallate et l'(-)-épigallocatéchine gallate. Les flavonols ne sont pas glycosylés dans les aliments (Figure 32). Les principales sources alimentaires riches en flavanols monomériques ou oligomériques sont les pommes, les bananes, les pêches, les poires, le cacao, le thé vert, le vin, les fruits rouges comme les myrtilles, les fraises, les framboises ou les canneberges.



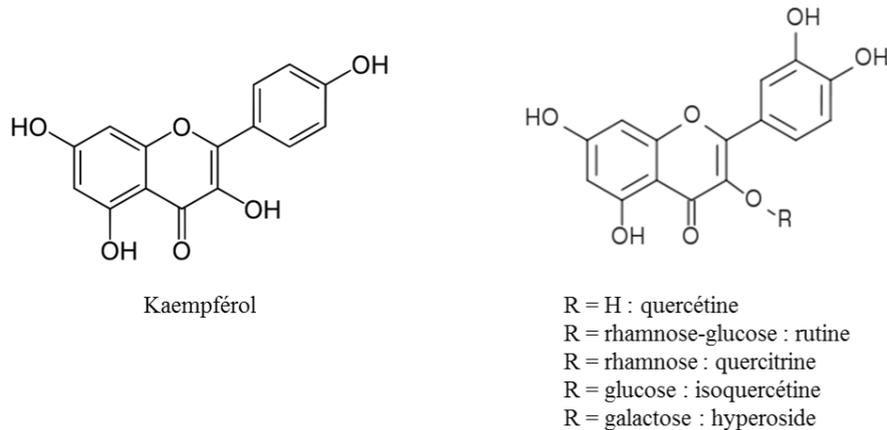
**Figure 32 :** Structure des monomères communs de flavanols.

Les proanthocyanidines ou tanins condensés sont notamment responsables du goût astringent des fruits (raisin, pêche, pomme, poire, kiwi, baies, etc.), des boissons (thé, vin, cidre, bière, etc.) et de l'amertume du chocolat (Manach et al., 2004). Elles sont généralement liées à des fibres (polysaccharides) ou aux protéines dans la matrice alimentaire. Selon la nature du noyau central C des monomères de flavanol, les proanthocyanidines peuvent être sous divisées en propélarгонidines, prodelphinidines ou en PCs.

Le groupe des PCs est le plus important et il est composé exclusivement de monomères flavanols d'épicatéchine et de catéchine. Les PCs sont caractérisées par leur degré de polymérisation ou nombre d'unités flavanols polymérisées (Figure 33). Les PCs de type A sont différenciées du type B par une liaison supplémentaire entre le C2 de l'unité supérieure et un atome d'oxygène en C5 ou C7 de l'unité inférieure. En exemple, les PCs de pomme sont



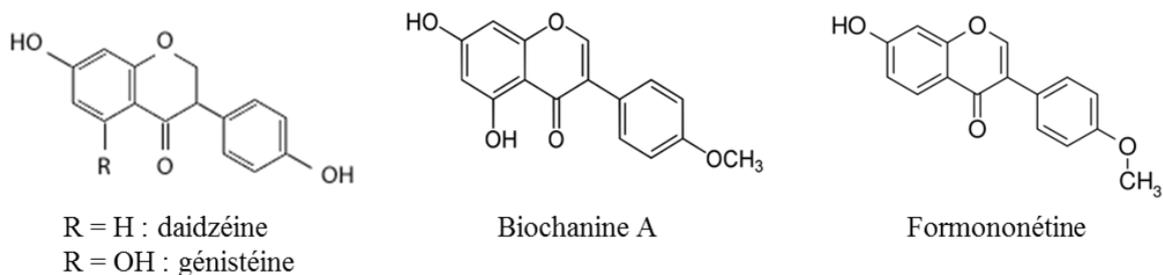
fruits ou des feuilles. Les sources alimentaires les plus riches en quercétine sont les câpres, le persil, l'oignon rouge, les baies, le chou kale et les pommes. La laitue, les tomates, les pois chiches, les amandes, les navets, les patates douces et le quinoa sont également riches en flavonols. Les flavones sont quant à elles retrouvées en grande quantité dans le persil, les poivrons, le céleri, la pomme, les oranges, la pastèque, le piment du Chili et la laitue.



**Figure 34** : Représentation des structures chimiques principales des flavonols.

### ➤ *Les isoflavones*

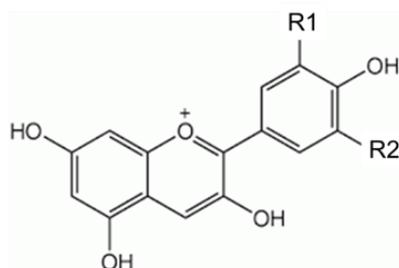
Les isoflavones sont abondants dans les légumes et diffèrent des flavones par la position du groupe phényle lié au C3 à la place du C2 pour les flavones (Andersen, 2006). Les structures chimiques étant analogues à l'œstrogène, elles sont aussi appelées phytoestrogène (Ignat et al., 2011). Les principaux composés de cette classe sont la daidzéine, la génistéine, la biochanine A et la formononétine (Figure 35). Les sources alimentaires les plus riches en isoflavones sont les légumineuses (le pois chiche, le haricot mungo, le soja et ses dérivés comme le tofu), les haricots verts, les pousses de luzerne et l'arachide.



**Figure 35 :** Représentation chimique des principales isoflavones.

### ➤ *Les anthocyanes*

Les anthocyanes sont présentes dans les vacuoles de l'épiderme des fleurs, des feuilles et des fruits et sont responsables de la couleur cyanotique allant du rose, rouge, violet au bleu (Andersen, 2006). Les anthocyanidines (forme aglycone) sont instables et sensibles à la lumière, aux variations de pH et de température. Les sucres les plus courants liés aux anthocyanidines sont des monoglycosides de glucose, de galactose, de rhamnose ou d'arabinose ou bien des di- ou tri-glycosides issus de la combinaison des quatre monosaccharides. Les plus représentatifs dans l'alimentation sont la cyanidine, la delphinidine, la pétunidine, la péonidine, la pélargonidine et la malvidine (Figure 36). Ces anthocyanes se différencient par le nombre de groupements hydroxyles, le degré de méthylation de ces groupes hydroxyles et la nature et le nombre de sucres ainsi que la position et le nombre d'acides aliphatiques ou aromatiques liés au sucre. Au niveau alimentaire, les anthocyanosides sont retrouvées principalement dans les myrtilles, les framboises, les fraises, la canneberge, les mûres, les cerises, le raisin noir, les oranges sanguines, l'oignon rouge, l'aubergine, la prune et la pomme de terre vitelotte.



R1 = OH ; R2 = H : cyanidine  
 R1, R2 = OCH<sub>3</sub> : malvidine  
 R1, R2 = H : pélargonidine  
 R1 = OCH<sub>3</sub> ; R2 = H : péonidine  
 R1 = OCH<sub>3</sub> ; R2 = OH : pétunidine  
 R1, R2 = OH : delphinidine

**Figure 36** : Structure chimique des principaux anthocyanes.

### 3.3.3. *Prise alimentaire journalière en polyphénols*

La prise alimentaire journalière en polyphénols totaux est influencée par deux paramètres : les habitudes alimentaires de la population étudiée et la teneur en polyphénols des aliments qui peut être très variable.

#### 3.3.3.1. Paramètres influençant la teneur en polyphénols des aliments

Pour un même fruit ou légume, il peut être observé une importante variation de la teneur en polyphénols entre les variétés. D'autres paramètres autres que la variété ont été identifiés comme influençant le contenu phénolique. Ces paramètres incluent notamment les facteurs environnementaux, le stade de maturité, les transformations et le mode de conservation. L'effet majeur de la variabilité intra-variété de la teneur en polyphénols est dû aux facteurs environnementaux (type de sol, exposition au soleil, pluviosité, gel, pratiques culturales, etc.).

### 3.3.3.2. Consommation journalière en polyphénol

En France, la consommation journalière en composés phénoliques est estimée à 1,2 g/jour et par personne (0,8 g en équivalent aglycone) (Perez-Jimenez et al., 2011). Celle-ci est d'environ 0,5 g en équivalent aglycone par jour et par personne en Angleterre (Clifford, 2006). Les fruits et les légumes les plus riches en polyphénols comme la fraise, le litchi, le raisin, les artichauts, le persil et le chou de Bruxelles et ne sont pas nécessairement les plus consommés. La très grande majorité des polyphénols est apportée par la consommation de café, de thé, de pomme, de vin, de cacao et de pomme de terre. Les pommes et les pommes de terre fournissent la moitié de la quantité quotidienne en polyphénols consommés (Brat et al., 2006).

Les acides hydroxycinnamiques sont les composés phénoliques les plus consommés en France (599 mg/j) et le plus important est l'acide chlorogénique (216 mg/j). La seconde classe la plus consommée sont les flavanols (326 mg/j) dont 227 mg/j de PCs. Ensuite, dans l'ordre décroissant de consommation sont retrouvés les anthocyanes (57 mg/j), les flavonols (51 mg/j) et les flavones, flavanones et acides hydroxybenzoïques (30 à 41 mg/j par classe) (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Classes de polyphénols et consommation journalière (Pérez-Jiménez et al., 2011).

<b>Classe de polyphénols</b>	<b>Quantité ingérée en mg/jour</b>	<b>Sources alimentaires</b>
Acides hydroxycinnamiques	599 ± 426	Café, pomme, pomme de terre
Procyanidines	227 ± 162	Pomme, cacao, vin blanc
Catéchines	99 ± 116	Thé, vin rouge, pomme, cacao
Anthocyanes	57 ± 47	Vin rouge, baies, fraise, raisin noir
Flavonols	51 ± 28	Thé, oignon, vin rouge, épinard
Acides hydroxybenzoïques	41 ± 39	Thé, vin rouge, noix
Flavones	33 ± 17	Farine de blé, orange
Flavanones	26 ± 29	Orange, jus d'orange, jus de pomme, vin rouge
Théaflavines	12 ± 21	Thé
Dihydrochalcones	7 ± 9	Pomme, vin rouge, blanc, rosé
Autres polyphénols	41 ± 20	Café, farine de blé et produits dérivés

Il est a noté que les théaflavines sont des polyphénols du thé noir qui apparaissent après le procédé de fermentation et qui résultent d'une oxydation enzymatique des feuilles de thé vert (épigallocatechines).

### 3.4. Propriétés physico-chimiques des polyphénols

#### 3.4.1. Affinité pour les protéines et les polysaccharides

Les composés phénoliques peuvent se lier aux protéines de la matrice alimentaire par de multiples interactions faibles et covalentes (Ishii et al., 2008). Dans le cas des liaisons covalentes, l'oxydation des composés phénoliques possédant une unité ortho-dihydroxyphenyl conduit à une O-quinone électrophile qui peut réagir avec les résidus nucléophiles des protéines (Cys, Lys, His) (Rohn et al., 2004). Quant aux PCs, elles se lient de manière non-covalente et préférentiellement aux protéines ayant une structure ouverte faiblement organisée riche en proline pour former des agrégats colloïdaux (Le Bourvellec et al., 2011). Ce phénomène semble être induit par une réduction de la charge superficielle et donc une répulsivité électrostatique réduite entre les protéines près du point isoélectrique (de Freitas and Mateus, 2002). La stabilité de ces agrégats dépend de la concentration initiale en protéines et du ratio monomère/protéine (Poncet-Legrand et al., 2007). Elle est augmentée en présence d'un degré de polymérisation élevé. Les PCs à haut degré de polymérisation se lient plus facilement aux protéines en se liant simultanément à plusieurs sites (Prigent et al., 2009). Les interactions non-covalentes entre les PCs et les protéines se font par :

- Des liaisons hydrogènes entre les groupes hydroxyles des composés phénoliques et les groupes carbonyles et NH<sub>2</sub> des protéines.
- Des interactions de Van der Waals renforcées par l'effet hydrophobe entre les cycles aromatiques des composés phénoliques et la chaîne latérale des acides aminés apolaires.
- Des liaisons ioniques entre les anions phénolates et les sites cationiques des protéines.

Les liaisons ioniques sont exclues à pH acide ou pour des pH inférieurs au pKa des groupes phénoliques (de Freitas and Mateus, 2012). Cependant, des liaisons covalentes peuvent se former à pH faible et sous conditions oxydantes.

Les PCs peuvent se lier spontanément aux polysaccharides de la paroi cellulaire végétale après rupture lors du broyage, de la mastication ou du traitement thermique. Cette interaction dépend de la structure moléculaire, du degré de polymérisation et de galloylation des PCs ainsi que des propriétés et de la composition chimique de la paroi végétale. Lors de la digestion, ce

phénomène peut affecter la bioaccessibilité des polyphénols, les effets fonctionnels des polysaccharides et la cinétique de fermentation des fibres alimentaires et des polyphénols (Le Bourvellec et al., 2019). Dans ce cas, les interactions électrostatiques ou ioniques n'ont aucun rôle mais l'association des PCs et des polysaccharides serait due à des forces hydrophobes et des liaisons hydrogènes. La complexation de ces deux éléments semble être similaire à l'agrégation avec les protéines (liaisons hydrogènes et hydrophobes). Cependant, la réaction avec les protéines se fait en une série d'étapes dans lesquelles les complexes solubles initiaux forment des agrégats par auto-association puis précipitent par formation de colloïdes (Mcrae et al., 2010) alors que les interactions avec les polysaccharides semblent être directes et rapides sans formation d'agrégats compacts. Les oligomères ou les microgels formés sont moins compacts que les polysaccharides initiaux (Carn et al., 2012). L'affinité des PCs est meilleure pour la pectine (galacturonane méthylé) que pour le xyloglucane et elle est faible pour la cellulose (Le Bourvellec et al., 2005). Quand les PCs sont associés aux polysaccharides de la paroi cellulaire, ils sont peu bioaccessibles dans l'intestin grêle et atteignent le colon où ils sont convertis en métabolites actifs (Renard et al., 2017). Les effets biologiques des PCs sont généralement associés à leurs métabolites coliques qui sont des acides phénoliques produit au cours de la fermentation par la microflore colique.

#### 3.4.2. *Effets antioxydants des polyphénols*

Les effets santé et les implications probables des polyphénols dans les maladies cardiovasculaires, les cancers ou les maladies neurodégénératives sont généralement associés à leurs propriétés antioxydantes. Plusieurs mécanismes antioxydants des polyphénols ont été identifiés comme la réduction des ERO, la chélation des ions métalliques initiateurs des processus d'oxydation, l'inhibition d'enzymes impliquées dans la production d'ERO ou encore la stimulation des défenses antioxydantes endogènes.

##### 3.4.2.1. Réduction des ERO

Dans la classe des flavonoïdes, le squelette carboné C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> le nombre et la position des groupements hydroxyles, tout comme l'insaturation entre les carbones C2 et C3, influencent la

capacité antioxydante de ces composés. En particulier, la présence de groupements hydroxyles en position 3' et 4' du noyau catéchol confère un pouvoir réducteur supérieur aux flavonoïdes qui s'exerce, soit par un transfert d'atomes d'hydrogène, soit par un transfert d'électrons aux ERO. Ceci constitue le mécanisme antioxydant principal des composés phénoliques (Dangles, 2012).

Dans le cas d'un transfert d'hydrogène, un antioxydant phénolique donne un atome d'hydrogène à un radical R<sup>•</sup> entraînant la formation du produit RH et d'un radical phénolique ortho-semiquinone stabilisé par la délocalisation d'électrons non appariés le long du cycle aromatique (Dangles, 2012). Dans le cas d'un transfert d'électrons, l'oxydation à un seul électron de l'antioxydant phénolique est rapidement suivie d'une déprotonation du cation radicalaire résultant. Les effets réducteurs antioxydants sont régis par deux facteurs physico-chimiques : l'énergie de dissociation de la liaison O-H et le potentiel d'ionisation des composés phénoliques. Plus ils sont faibles, plus la réduction est forte (Quideau et al., 2011).

Les composés phénoliques antioxydants sont capables de régénérer des antioxydants endogènes comme l' $\alpha$ -tocophérol. L' $\alpha$ -tocophérol est un antioxydant lipophile agissant dans la phase lipidique en inhibant la propagation du processus d'oxydation par réduction des radicaux peroxy. Quand l' $\alpha$ -tocophérol cède un atome d'hydrogène à un radical, il se forme le radical tocophéryle. Les composés phénoliques, donateurs d'hydrogène, réduisent le radical  $\alpha$ -tocophéryle pour régénérer l' $\alpha$ -tocophérol. La quercétine, l'épicatéchine et la catéchine, présentant un noyau catéchol, augmentent significativement les concentrations d' $\alpha$ -tocophérol dans le plasma et le foie de rat (Frank et al., 2006). Les composés phénoliques du thé vert (épicatéchine, épigallocatechine, gallate d'épigallocatechine et l'acide gallique) régénèrent également l' $\alpha$ -tocophérol (Zhou and Elias, 2013).

Les composés phénoliques antioxydants hydrosolubles agissent quant à eux dans la phase aqueuse en réduisant les espèces initiatrices hydrophiles (Goupy et al., 2007; Lorrain et al., 2010; Vulcain et al., 2005). Les polyphénols réagissent rapidement avec le fer hémique hypervalent (MbFe<sup>IV</sup>=O) le réduisant en métmyoglobine (MbFe<sup>III</sup>), retardant ainsi l'initiation du processus d'oxydation lipidique (Lorrain et al., 2007).

### 3.4.2.2. Chélation des ions métalliques

Les polyphénols possèdent également des propriétés chélatrices qui contribuent à leur activité antioxydante en inhibant l'effet pro-oxydant des ions métalliques. En effet, les ions métalliques comme le fer II, et le cuivre I, convertissent par la réaction de Fenton le peroxyde d'hydrogène en  $\text{OH}^\bullet$  (Quideau et al., 2011). La chélation des ions métalliques pourrait réduire la formation de ce radical hydroxyle susceptible d'oxyder les biomolécules environnantes. L'activité chélatrice dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles dans la structure des composés phénoliques antioxydants. La réaction de Fenton est fortement réduite par les flavonoïdes les plus courants contenant un groupement catéchol (3',4'-diOHphenyl) ou des motifs 3-hydroxy-4-oxo et 5-hydroxy-4-oxo (Wang et al., 2006) au niveau des cycles A et C, qui permettent la chélation des ions métalliques. A l'opposé, les groupes hydroxyles liés de manière covalente à des groupements méthyles ou à un glycoside ne sont pas impliqués dans la chélation des ions métalliques. De plus, la formation de complexe par chélation peut avoir un impact sur la solubilité des composés phénoliques et des ions métalliques conduisant à leur précipitation comme pour les tanins (McDonald et al., 1996). La formation de ces complexes présente une importance d'un point de vue nutritionnelle par la réduction de l'absorption intestinale des ions métalliques essentiels pour l'organisme ainsi que celle des composés phénoliques.

### 3.4.2.3. Inhibition d'enzymes pro-oxydantes

Les flavonoïdes peuvent inhiber l'activité d'enzymes impliquées dans le stress oxydant (xanthine oxydase, myéloperoxydase, NADPH oxydase et lipoxigénase) par chélation ou réduction du site actif des enzymes (cavité hydrophobe). La formation d'adduits covalents entre les produits d'oxydation des flavonoïdes (o-quinones, p-méthylène quinones) et des groupes amines ou sulfhydryles du site actif serait une explication à l'inactivation irréversible des enzymes (Sadik et al., 2003).

### **3.5. Digestion et métabolisme des polyphénols**

#### *3.5.1. Digestion et absorption des polyphénols*

La bioaccessibilité des micronutriments est définie comme la fraction de micronutriments libérée de la matrice alimentaire dans la phase aqueuse et qui sont susceptibles d'être absorbés par le tractus gastrointestinal au cours de la digestion (Alminger et al., 2014; White et al., 2009). Le tube digestif est le principal lieu qui régit la bioaccessibilité des composés phénoliques (Halliwell et al., 2000). La matrice alimentaire joue un rôle primordial dans la bioaccessibilité des composés phénoliques. Cette bioaccessibilité implique l'action combinée de la mastication et des enzymes digestives pour libérer les composés phénoliques présents dans les vacuoles. Les différents facteurs influençant la bioaccessibilité des polyphénols sont la taille et la texture des aliments en lien avec les procédés de transformation, l'équilibre hydrophile/lipophile des composés d'intérêt, le pH, les transformations au cours de la digestion comme l'épimérisation, l'hydrolyse ou l'oxydation et l'interaction des polyphénols avec les composants alimentaires (Karakaya, 2004). L'affinité des flavonoïdes pour les protéines ou les polysaccharides au cours de la digestion (Dangles and Dufour, 2008) conduit à une modulation importante de leur absorption dans l'intestin grêle. La salive induit une hydrolyse partielle des glucosides par les glucosidases salivaires (de Freitas and Mateus, 2001).

A l'exception des flavanols, les composés phénoliques sont sous formes estérifiés ou glycosylés dans les aliments et le type de sucre influence l'efficacité de l'absorption intestinale (Morand et al., 2000). Il n'existe pas qu'une voie d'absorption vue la diversité de structures des polyphénols mais plusieurs mécanismes impliquant des transports actifs ou passifs. Les polyphénols sous forme d'aglycones et de faible poids moléculaire (< 600) sont absorbés directement par l'intestin grêle et les formes glycosylées ou estérifiées doivent être hydrolysées par des enzymes secrétées par l'intestin ou le microbiote avant d'être absorbées (Gonthier et al., 2003). Ainsi, il a été montré chez le rat qu'une activité uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférase localisée dans les muqueuses gastriques et intestinales conduisait à une métabolisation de la quercétine en quercétine glucuronidée, forme ultimement retrouvée dans la circulation (Murota and Terao, 2005). L'absorption au niveau de l'estomac semble être mineure et limitée aux anthocyanes et à des composés spécifiques comme l'acide chlorogénique (Fernandes et al., 2012; Gonthier et al., 2003).

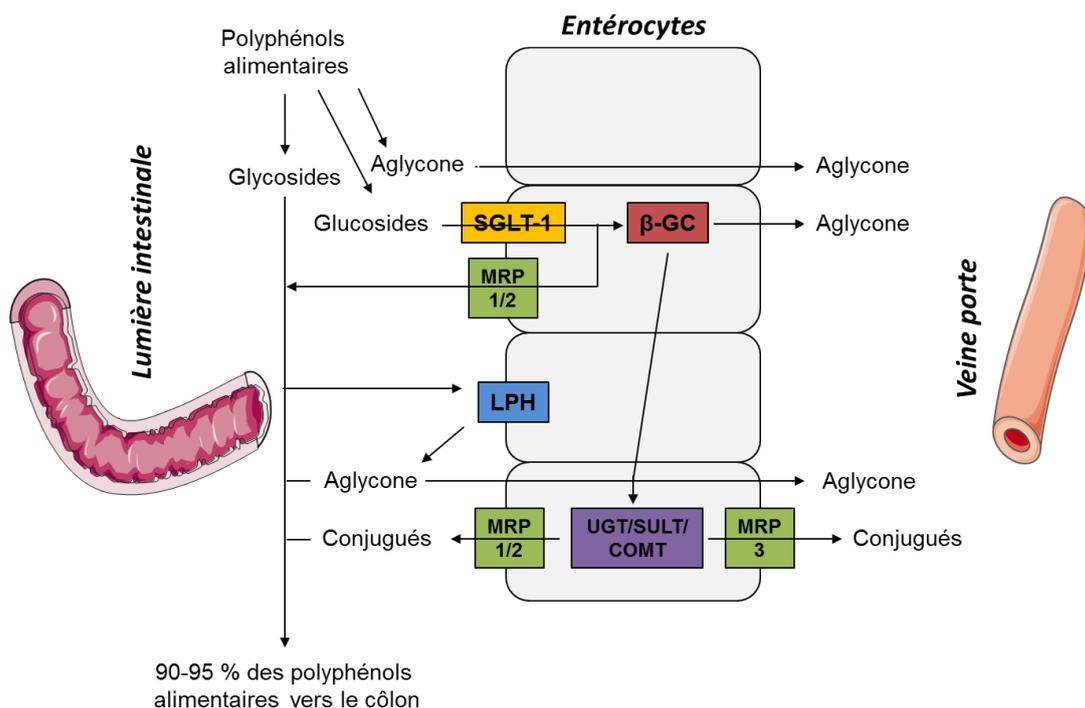
Certains glucosides peuvent être absorbés au niveau de l'intestin alors que les composés phénoliques liés à d'autres sucres (rhamnose, arabinose, xylose, etc.) ne sont libérés que par des glycosidases de la flore microbienne (Day et al., 2000).

De plus, une enzyme de la bordure en brosse des entérocytes de l'intestin grêle, la lactate phloridzine hydrolase, catalyse l'hydrolyse extracellulaire des glucosides (Day et al., 2000) permettant à l'aglycone d'être absorbée (quercétine notamment) par diffusion passive dans les entérocytes. L'internalisation des glucosides de flavonoïdes pourrait mettre en jeu des transporteurs du glucose dépendant du sodium, les SGLT1, et ces glucosides seraient hydrolysés dans les entérocytes par la  $\beta$ -glucosidase cytosolique (Gee et al., 2000). Le transporteur des acides monocarboxyliques (MTC) semble être impliqué dans le transport des acides phénoliques et de l'épicatéchine gallate par les entérocytes (Manach et al., 2004). Pour les flavanols, seuls les monomères sont absorbés au niveau de l'intestin. Les oligomères (PCs) sont métabolisés au niveau du côlon et leur bioaccessibilité peut être affectée par leur interaction avec les protéines ou les polysaccharides.

Les polyphénols sont ensuite métabolisés dans les entérocytes sous forme de conjugués glucuronidés et/ou O-méthylés sous l'action d'enzymes (glucuronyltransferase et catéchol-O-méthyltransferase (COMT)) (Manach and Donovan, 2004) puis dans les hépatocytes (sulfotransferase et catechol-O-méthyltransferase). Il s'agit du métabolisme de détoxification commun à de nombreux xénobiotiques pour limiter les éventuels effets toxiques et faciliter leur élimination en diminuant leur hydrophobicité. L'importance relative des types de conjugués dépend de la nature du polyphénol et de la dose ingérée. Une fraction des conjugués est sécrétée par la voie biliaire après être passée par le foie et revient au niveau du duodénum (cycle entéro-hépatique) puis est soumis à l'action enzymatique bactérienne en particulier de la  $\beta$ -glucuronidase dans les segments distaux de l'intestin avant d'être réabsorbée. La glycoprotéine-P et le transporteur des cations organiques influencent ce retour des polyphénols conjugués vers la lumière intestinale. La famille des protéines de résistance aux drogues (MRP) et la protéine BCRP1 (*Breast Cancer Resistant Protein 1*) jouent un rôle dans la ré-excrétion des glucuronides de quercétine vers la lumière intestinale (Figure 37). Les conjugués peuvent présenter des actions différentes biologiques de la forme native et sont généralement des antioxydants moins efficaces (Day et al., 2000).

L'absorption au niveau du côlon est plus généralement due à la grande diversité d'enzymes du microbiote colique permettant un catabolisme important (Dangles, 2012). Au niveau du côlon, l'absorption des glycosides est moins efficace que celle qui a lieu au niveau de l'intestin

grêle, du fait de la réduction de la surface d'échange et de la densité des transporteurs. Au niveau intestinal, 90% des PC's ne sont pas absorbées et atteignent le colon. L'effet biologique des PC's serait donc largement dû à leurs métabolites coliques (Williamson and Clifford, 2010). Le catabolisme par le microbiote comprend l'hydrolyse des glycosides, le clivage du cycle central des flavonoïdes et la désoxygénation des cycles phénoliques, ce qui conduit à l'absorption de petits composés aromatiques, comme l'acide protocatéchique, au niveau du colon (Aura et al., 2005).



**Figure 37 :** Mécanisme général d'absorption et de métabolisme entérocytaire des composés phénoliques dans l'intestin grêle.

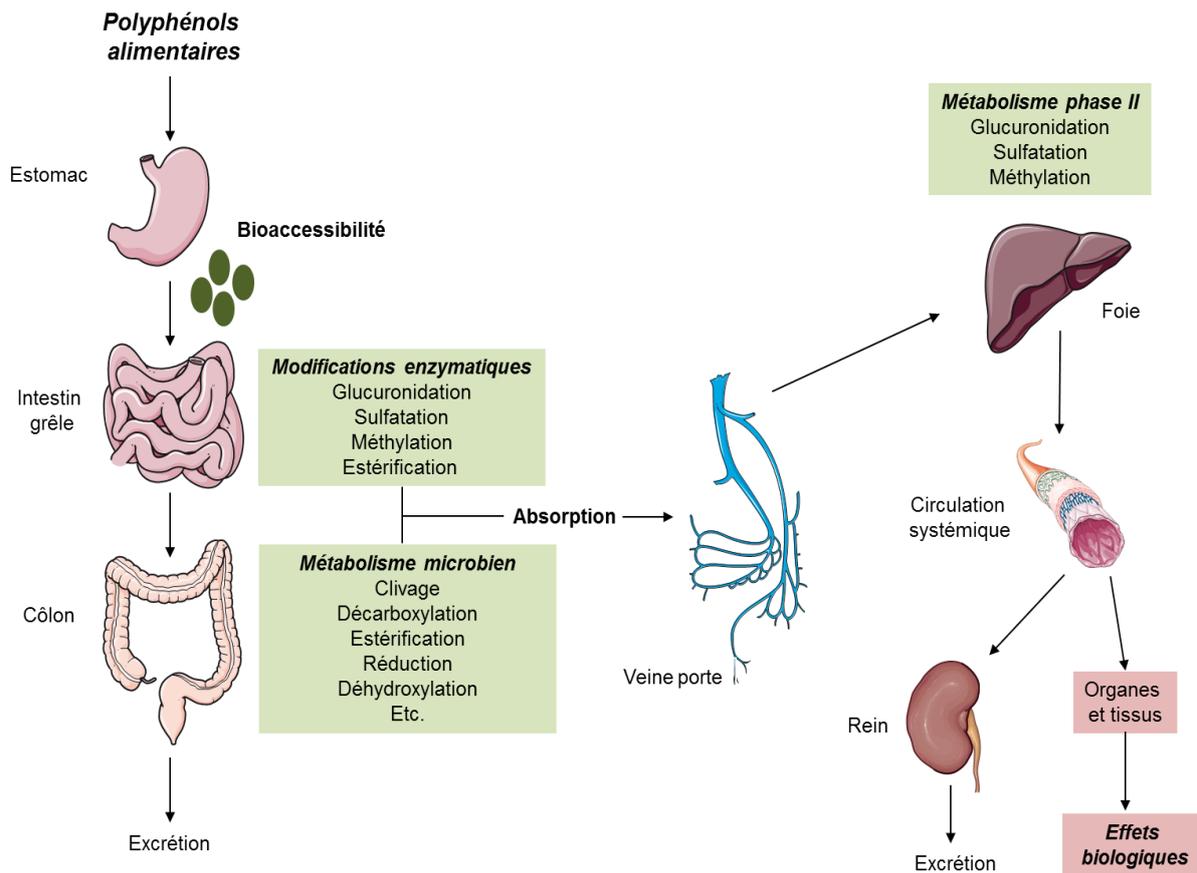
SGLT-1 : Sodium dependant Glucose Transporter 1;  $\beta$ -GC : $\beta$ -Glucosidase cytosolique; MRP : Multidrug-resistant proteins; LPH : Lactate phloridzin hydrolase; UGT : uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferase; SULT : Sulfotransferase; COMT : Catechol-O-methyltransferase.

Au niveau du côlon, les principaux métabolites de l'épicatéchine, de la catéchine et des PC's B sont des dérivés plus ou moins hydroxylés des acides 2-phénylacétique et 3-phenylpropionique et de la 5-phényl- $\gamma$ -valérolactone qui pourront être absorbés puis excrétés dans les urines (Del Rio et al., 2013; Le Bourvellec et al., 2019). La 5-(3'-hydroxyphényl)- $\gamma$ -

valérolactone représente plus de 70% des métabolites pour la variété Granny Smith (Ou et al., 2014). Il faut noter, qu'après absorption, seuls les métabolites des PCs et non pas les molécules natives pourraient avoir une action sur la fonction vasculaire.

### 3.5.2. Biodisponibilité et transport sanguin des métabolites phénoliques

La biodisponibilité des micronutriments est définie comme la fraction de micronutriments retrouvée dans la circulation sanguine et utilisable par les tissus périphériques pour les effets biologiques (Wood, 2005). La biodisponibilité est donc dépendante de la bioaccessibilité, du métabolisme (microbien et phase II), de l'absorption intestinale, du transport sanguin et de l'excrétion (Figure 38). De plus, les concentrations plasmatiques peuvent varier selon la nature du composé phénolique et de sa source alimentaire. Au niveau plasmatique, les métabolites de polyphénols circulent sous forme conjuguée (sulfate, glucuronide ou O-méthylethers des aglycones) principalement liés à l'albumine pour des concentrations totales dépassant rarement les 1  $\mu\text{M}$  (Dufour and Dangles, 2005; Manach et al., 2004). Ainsi, maintenir une concentration plasmatique significative implique un apport régulier par l'alimentation. Les concentrations maximales sont souvent atteintes entre 1 et 2 heures après l'ingestion pour les polyphénols absorbés au niveau de l'intestin grêle. Pour les polyphénols qui sont absorbés après dégradation partielle par la microflore, les concentrations maximales sont généralement atteintes 5 à 7 heures après ingestion. Pour les flavonoïdes absorbés par le petit intestin, la concentration plasmatique diminue rapidement ensuite (demi-vie d'élimination 1 à 2 h).



**Figure 38 :** Biodisponibilité des polyphénols.

### 3.6. Mécanismes protecteurs de la santé cardiovasculaire

Les effets bénéfiques d’une alimentation de type méditerranéenne, riche en fruits, légumes, céréales et produits transformés d’origine végétale contenant des polyphénols, sont inversement corrélés aux risques de maladies cardiovasculaires (Aune et al., 2017; Hooper et al., 2008; Kay et al., 2012; Macready et al., 2014). Par conséquent, l’étude des composés phénoliques et de leurs effets sur le corps humain revêt un intérêt croissant. D’après Galleano (Galleano et al., 2010), leurs concentrations plasmatiques sont trop faibles pour répondre aux exigences de réaction physiologiquement pertinentes notamment antioxydantes. De plus, d’autres auteurs n’ont pas réussi à démontrer l’implication d’une action antioxydante au niveau cellulaire pour expliquer les bénéfices santé des polyphénols (Hollman et al., 2011). La plupart des études menées chez l’homme n’ont pas montré d’influence directe de la part des composés phénoliques sur le statut redox après absorption. Les métabolites de polyphénols ne semblent pas avoir

d'effet d'antioxydant à proprement parler au niveau tissulaire. L'effet bénéfique antioxydant direct des composés phénoliques contre les espèces radicalaires alimentaires semble limité au niveau du tractus gastro-intestinal en raison de leur forte concentration (Grassi et al., 2010; Halliwell, 2007). Cependant, les métabolites de polyphénols interviennent, par d'autres mécanismes régulateurs, bénéfiques pour la santé au niveau tissulaire.

#### ➤ Les flavanols

Les flavanols, par amélioration du flux sanguin, réduiraient la pression artérielle systolique et diastolique. En effet, une supplémentation en flavanols de cacao chez des individus hypertendus réduirait la pression artérielle (Grassi et al., 2010; Khawaja et al., 2011). Le mécanisme impliqué dans cet effet serait lié à la capacité des flavanols (monomériques conjugués ou métabolites) à moduler la production de NO par la eNOS et à l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (Corti et al., 2009). Cette augmentation de la production de NO peut être réalisée par deux voies d'activation de la eNOS : par la voie PI3/Akt activant la phosphorylation sur sa sérine 1177 ou par augmentation de la concentration calcique intracellulaire favorisant la formation du complexe  $Ca^{2+}$ -CaM (Oak et al., 2018). L'épicatéchine pourrait également améliorer la vasodilatation par stimulation du G Protein Coupled oestrogen receptor (Moreno-Ulloa et al., 2015). La forme glucuronide de l'épicatéchine, l'épicatéchine- $\beta$ -D-glucuronide, est capable d'inhiber la NADPH oxydase endothéliale et donc la production d'anion superoxyde ainsi que de réduire les radicaux anions superoxydes (Steffen et al., 2008). De plus, l'épicatéchine après méthylation par la COMT (3'-O-methyl-transferase) inhiberait également la NADPH oxydase dans les cellules endothéliales (Steffen et al., 2008). Pour d'autres, l'épicatéchine activerait des enzymes antioxydantes comme la SOD2 et la catalase (Ramirez-Sanchez et al., 2013). L'épicatéchine gallate pourrait inhiber l'expression génique du RS CD36 et donc la formation de cellules spumeuses (Kawai et al., 2008). Les PCs inhiberaient la cyclo-oxygénase-2, la iNOS ainsi que des molécules liées à l'inflammation telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-8 (Andre et al., 2012). A noter que cette étude *in vitro* ne prend pas en considération la métabolisation des PCs. De plus, elles diminueraient aussi l'agrégation plaquettaire (Bordeaux et al., 2007) même si pour cette étude, les effets étaient observés pour des doses ingérées supérieures à 200 mg/j.

L'ensemble de ces mécanismes limiterait la dégradation de la fonction endothéliale et diminuerait la réponse inflammatoire. Les effets santé vasculaires des flavanols portent sur la modulation de la production et de la biodisponibilité du NO, l'inhibition de l'absorption du cholestérol et du glucose. De plus, la réduction de la pression artérielle, l'amélioration du profil lipidique sanguin préviendraient le diabète et l'obésité.

➤ L'acide chlorogénique

Bien que l'acide chlorogénique améliore la biodisponibilité du NO pour contrer les effets de la caféine lors de l'ingestion de café (Bonita et al., 2007), ses principaux effets seraient sur le métabolisme glucidique. En effet, il pourrait inhiber l'activité de l' $\alpha$ -glucosidase, de la glucose-6-phosphatase hépatique et inhiber les transporteurs du glucose au niveau intestinal diminuant ainsi la glycémie et le risque de diabète.

➤ Les flavonols

La quercétine-3-glucuronide, métabolite majeur de la quercétine, peut s'accumuler dans les lésions athéromateuses et non dans les aortes saines. Après internalisation dans les macrophages, elle est déglucuronidée par la  $\beta$ -glucuronidase. Ensuite, la COMT convertie partiellement la quercétine en 3'/4'-O-méthyléther. Ce dernier est capable d'inhiber l'expression des RSs à la surface des macrophages impliqués dans l'internalisation des LDLox et la formation des cellules spumeuses (Kawai et al., 2008). De plus, lors d'une dysfonction mitochondriale, l'augmentation de l'acidité (sécrétion de lactate) et l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium des macrophages entraînent une amélioration de l'activité de la  $\beta$ -glucuronidase. Après déconjugaison des métabolites de quercétine à la surface cellulaire, la quercétine peut également par simple diffusion pénétrer dans les macrophages puis est convertie par la COMT en O-méthylether de quercétine représentant la forme active pour les activités anti-inflammatoires et anti-athérosclérotiques de la quercétine (Ishisaka et al., 2013).

La quercétine, après déglucuronidation dans les cellules endothéliales, améliorerait la vasodilatation chez les rats hypertendus (Galindo et al., 2012). Elle inhiberait l'activité de l'hème oxygénase favorisant la biodisponibilité du NO et la fonction endothéliale.

Enfin, de nombreux flavonols comme la quercétine pourraient réguler le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et réduire le TNF- $\alpha$  (Koutsos et al., 2015).

Les polyphénols, ou plutôt leurs métabolites, agiraient par une combinaison de mécanismes au niveau vasculaire permettraient de réduire la pression artérielle, de réduire le stress oxydant vasculaire, de maintenir une homéostasie de la fonction endothéliale et de réduire le développement de l'athérosclérose retardant ainsi la survenue d'évènements cliniques thrombotiques chez les patients à risque.

### **3.7. La pomme comme supplément alimentaire riche en polyphénols : un choix pertinent ?**

#### ➤ Généralité

Le Programme National Nutrition Santé recommande de manger au moins 5 portions de 80 à 100 g de fruits ou de légumes par jour. La pomme (fruit complexe des arbres du genre *Malus domestica*) appartenant à la famille des rosacées est le fruit le plus consommé en France représentant une part de marché des fruits de 20,3% loin devant la banane (14,6%) et l'orange (12,4%) pour une consommation moyenne 18,5 kg par an et par foyer. La consommation de pomme augmente avec l'âge allant jusqu'à 23 kg/an après 50 ans. Une pomme pesant en moyenne 150 g, une petite pomme ou une demi-pomme de grande taille correspond à une portion de fruit. Il existe de très nombreuses variétés de pommes et l'association National des Pommes et Poires les classe en cinq catégories : les gourmandes, les parfumées, les équilibrées, les rustiques ou les toniques. Les variétés sont choisies par le consommateur selon les préférences gustatives et le mode de consommation. En France, les variétés les plus consommées sont la Golden Delicious suivie de la Gala puis de la Granny Smith. En moyenne une prise alimentaire de 100 g de pomme contient 10,7 g de glucides, 0,22 g de protéines, 0,12 g de lipides et 1,3 g de fibres pour un apport énergétique faible d'environ 50 kcal. De plus, la pomme contient 4 mg de vitamine C et 0,04 mg de vitamine E pour 100 g de fruit frais en

moyenne. Une pomme contient également des minéraux comme le magnésium et le potassium ainsi qu'en moyenne 85% d'eau.

➤ Teneur en polyphénols

Les teneurs en polyphénols totaux peuvent varier de 0,75 - 0,9 g/kg pour des variétés comme les Golden Delicious, Gala et Granny Smith jusqu'à 4,5 g/kg pour des variétés de pomme à cidre ou des variétés rustiques comme la *Reinette de Flandre* utilisée dans nos travaux.

Six catégories de composés phénoliques ont été identifiées dont les acides hydroxycinnamiques (4 - 18%), les flavanols monomériques et les PCs (71 - 90%) qui représentent environ 95% des polyphénols totaux et sont présents dans tous les tissus (peau, chair et pépins) (Vrhovsek et al., 2004). Les autres catégories, en quantité très minoritaires (< 2% des polyphénols totaux) sont les dihydrochalcones, les flavonols et les anthocyanes. Cependant, les anthocyanes sont présents uniquement dans les pommes rouges. Les flavanols monomériques et oligomériques sont présents dans la chair mais surtout dans la peau (Tsao et al., 2003). Les PCs dimériques les plus abondantes dans la pomme sont B1 et B2. Une classe de polyphénols, les dihydrochalcones sont exclusivement présentes dans les pommes et les produits à base de pomme. Leur structure chimique comprend un cycle central ouvert (Crozier et al., 2009). Il s'agit de dérivés de phlorétine dont les principales formes présentes dans la pomme sont la phlorétine-2'-glucoside (phloridzine) et la phlorétine-2'-xyloglucoside (Vrhovsek et al., 2004). On les retrouve principalement dans la peau et les pépins. Les dihydrochalcones sont des inhibiteurs des transporteurs du glucose (GLUT ou SGLT) (Ehrenkranz et al., 2005).

Dans la pomme, la peau présenterait un potentiel antioxydant 4 à 5 fois plus élevé que la chair (Tsao et al., 2005). L'épicatéchine, la catéchine, les glycosides de flavonols et l'acide chlorogénique ont des capacités antioxydantes similaires et lagement supérieure à celle de la phloridzine. Quant aux PCs B1 et B2, elles sont deux fois plus actives du fait de la présence des 2 unités monomériques (Tsao et al., 2005). La biodisponibilité des polyphénols de pomme serait d'environ 30% pour les flavanols, d'environ 30% pour les acides phénoliques, d'environ 50% pour les flavonols et d'environ 60% pour les dihydrochalcones (Hyson, 2011).

➤ Effet santé de la pomme

La consommation de pomme est associée à une réduction des maladies chroniques telles que les cancers (cavité buccale, pharynx, œsophage, larynx, colorectale, seins, ovaires, prostate), les maladies cardiovasculaires, l'asthme et Alzheimer et aurait un effet positif sur le diabète, la gestion du poids, la santé osseuse, la fonction pulmonaire et la protection gastro-intestinale (Hyson, 2011). La pomme est connue comme ayant des effets bénéfiques pour le transit intestinal liés à ses fibres, des effets anti-cancérigènes, anti-cholestérolémiques, anti-diabétiques et protège contre les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires notamment par leur effet antioxydant et anti-inflammatoire. Les données épidémiologiques suggèrent que la consommation de flavonoïdes pourrait réduire le risque de maladies cardiovasculaires et que les pommes seraient le contributeur majeur (Knekt et al., 2002; Mink et al., 2007). Dans ces études finlandaises, la consommation de pommes apparaît comme inversement corrélée avec la mortalité cardio-ischémique, les AVC, la thrombose et la mortalité en générale. Un mécanisme mis en avant dans la bibliographie serait que la consommation de pomme réduirait *in vivo* le taux de LDLox circulant (Aprikian et al., 2002; Ogino et al., 2007; Serra et al., 2012). Cependant, bien d'autres mécanismes peuvent être envisagés aux regards des effets connus des différents métabolites contenus dans la pomme.

L'ensemble de ces éléments font que le choix de la pomme pour la stratégie antioxydante de supplémentation alimentaire protectrice à long terme de la fonction vasculaire est un choix pertinent.

*A retenir*

- Les polyphénols largement présents dans les fruits et légumes sont une source exogène d'antioxydants.
- Les PCs, une sous classe des flavonoïdes, pourraient inhiber l'initiation de l'oxydation lipidique au cours de la digestion.
- Après absorption, des métabolites de polyphénols pourraient diminuer la dysfonction endothéliale par augmentation de la biodisponibilité du NO et limiter la formation de cellules spumeuses impliquées dans les pathologies ischémiques.
- La pomme riche en PCs est le fruit le plus consommé en France. Une supplémentation alimentaire riche en pomme pourrait limiter les effets néfastes d'une alimentation occidentale.

## OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

L'ensemble des travaux réalisés au cours de ce travail de doctorat ont eu comme objectif d'évaluer la formation de produits issus de l'oxydation lipidique, notamment les diènes conjugués lipidiques et le 4-HNE, après une initiation par le fer héminique alimentaire de manière aigüe dans le tractus gastro-intestinal au cours de la digestion (*in vitro*). Ensuite nous avons évalué les effets chroniques de leur formation sur la fonction vasculaire, et plus particulièrement sur la fonction endothéliale, la voie du NO et le développement de l'athérosclérose (*in vivo*). Le second objectif majeur de ce travail de thèse a été d'évaluer l'effet d'une supplémentation alimentaire en pomme riches en antioxydants comme stratégie de prévention afin de limiter les effets délétères des produits de l'oxydation lipidique.

Au cours de notre première étude, nous nous sommes intéressés au niveau du tractus gastrique à l'influence de différents paramètres de la digestion sur l'oxydation des lipides alimentaires en présence de fer héminique. Ainsi, dans un système émulsionné simulant la digestion gastrique des lipides alimentaires, l'effet du pH et des enzymes de la digestion gastrique (pepsine et lipase) ont été évalués sur l'oxydation lipidique et le potentiel antioxydant des polyphénols de la pomme apportés sous différentes formes de matrices (pomme fraîche, purée, extrait phénolique).

Lors d'une deuxième étude, l'oxydation lipidique et son inhibition par les mêmes formes de matrices de pomme ont été suivies dans un modèle *in vitro* de digestion gastro-intestinale statique afin d'évaluer pour la première fois la contribution de la phase intestinale de digestion à la formation des produits d'oxydation lipidique.

Afin de valider les modèles *in vitro* et d'évaluer les effets vasculaires de ce type de régime alimentaire occidental pris de manière chronique en présence ou non de fruits riches en antioxydants, un régime nutritionnel de 12 semaines a été réalisé. Cette étude a été réalisée sur des souris transgéniques déficientes en apolipoprotéine E sensibles au développement de l'athérosclérose afin de pouvoir évaluer l'évolution de cette dernière dans les différentes conditions nutritionnelles. Lors de cette troisième étude, la fonction endothéliale ainsi que le développement et les caractéristiques des plaques d'athérome ont été évalués afin de comprendre les conséquences physiologiques à long terme de la consommation de régimes favorisant l'oxydation lipidique et de démontrer l'intérêt d'une supplémentation en antioxydants comme stratégie de prévention.



# **MATERIELS ET METHODES**

# 1. Matériels et méthodes des études *in vitro* de simulation de digestion

## 1.1. Produits chimiques et solvants

Le méthanol, l'acétonitrile, l'acétone, l'hexane et le propan-2-ol utilisés ont un grade LC/MS et proviennent de chez Fisher Scientific (Illkirch, France).

La myoglobine de cœur de cheval (M1882, lot SLBD8797V, 90%), l'hématine porcine (H3281, lot 092K0530), la pepsine porcine (P6887, lot SLBM3035V, 2829 U/mg selon le protocole COST INFOGEST pour la détermination de l'activité enzymatique), la lipase fongique Amano Lipase A d'*Aspergillus Niger* (534781, lot MKBP5118V, activité enzymatique de 120000 U/g), la pancréatine porcine (P7545, lot SLBL3953, 2,8 U de trypsine/mg selon le protocole COST INFOGEST par mesure de l'activité enzymatique), l'extrait de bile porcine (B8631, lot SLBM3454V), le diméthylsulfoxyde (154938, lot 82096JM), la 2,4-dinitrophenylhydrazine (D19,930-3, lot S44008-038, 97%), l'acide chlorhydrique, l'acide trichloroacétique, l'acide acétique, l'acide formique, l'acide citrique, l'(-)-épicatechine (E1753; lot BCBH5714V, 96%), l'(+) - $\alpha$ -tocophérol (T-3251, lot 119H0889, 96%) et l'acide L-ascorbique (A-0278, lot 116F-0210, 99%), la trilinoléine (T9517, lot 048K5208, 99%), la trioléine (réf. T7140, lot 091M1390V, 99%), l'acide linoléique (L1376, lot 056K1276, 99%), l'acide oléique (O1008, lot SLBK2336V, 99%) provenaient de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). La L- $\alpha$ -phosphatidylcholine de jaune d'œuf (50%, réf. 3556, lot 1203670) provenait de chez Fluka (Buchs, Suisse).

La L- $\alpha$ -phosphatidylcholine de jaune d'œuf utilisée au cours du projet contenait 33% de phosphatidylcholine, 13% de phosphatidyléthanolamine, 3% de sphingomyéline, 2% de lysophosphatidylcholine, 2% de phosphatidylinositol et 47% d'une fraction neutre composée en majorité de triglycérides. Cette analyse a été réalisée par l'unité BIA de l'INRA de Nantes.

L'huile de tournesol (Rustica, lot A21815, Marque Repère, France) a été achetée chez E. Leclerc en décembre 2015.

Les gammes d'aldéhydes ont été réalisées avec du 4-HNE (32100, lot 0510178-4, 98%) et 4-HNE-D3 (332101, lot 0423757-57, 98%) provenant de chez Bertin Pharma (Montigny-le-Bretonneux, France), du *trans*-2-octéнал (W32,150-8-K, lot 12605DD-267, 94%) et du pentanal

(42272, lot MKCC3861, 97%) provenant de chez Sigma-Aldrich. L'hexanal (21520, lot 1308725, 97%) et le *trans*-2-heptenal (00502, lot 1351781, 98%) provenaient de chez Fluka (Buchs, Suisse).

Pour la quantification des polyphénols, l'acide chlorogénique (C3878, lot 119K1340, 95%), l'acide *p*-coumarique (C-9008, lot 117F-0581, 98%), la phloridzine dihydrate (79320, lot 452806/1, 99%) provenaient de chez Sigma-Aldrich et l'isoquercitrine (0062, lot 01032811, 99%) de chez Extrasynthèse (Genay, France).

L'eau ultra-pure est obtenue par un système Millipore QPak 2 (Millipore Corporation, Bedford, USA) présentant une résistivité de 18,2 M $\Omega$ .cm<sup>-1</sup> à 25 °C.

Les sels minéraux de KCl, de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, de NaHCO<sub>3</sub>, de NaCl, de MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>, de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, de NaOH, de CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, et de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ainsi que l'acétate de sodium provenaient de chez Merck (Darmstadt, Allemagne) et de chez Fluka (Buchs, Suisse).

## **1.2. Caractérisation de l'huile de tournesol**

L'huile de tournesol (Rustica, Marque Repère, E. Leclerc) a été choisie comme source de lipides alimentaires pour son pourcentage élevé en AGPI n-6 pour l'ensemble du projet de thèse (études *in vitro* et *in vivo*). L'huile a été conservée en chambre froide positive à + 4 °C avant son utilisation. Lorsqu'une bouteille était ouverte, l'huile était répartie dans des falcons de 50 mL et conservée à -20 °C sous atmosphère inerte d'argon pour éviter l'oxydation lipidique.

### *1.2.1. Détermination de la composition en acides gras*

La teneur en acides gras saturés et insaturés de l'huile de tournesol a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Pour cela, 15 mg d'huile de tournesol ont été solubilisés dans 200  $\mu$ L de toluène puis 2 mL d'une solution d'acide sulfurique dans le méthanol (0,025/0,975) ont été ajoutés. Le mélange était alors incubé pendant 1 heure à 100 °C. Les esters méthyliques d'acides gras étaient extraits après addition de 2 mL d'eau ultra-pure et de 2 mL d'hexane, homogénéisation, centrifugation et récupération de la phase organique (supérieure). La phase organique était séchée avec du sulfate de sodium puis l'extrait est récupéré et injecté.

Un volume de 1  $\mu\text{L}$  a été injecté en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID, Clarus 500, Perkin Elmer, Villebon sur Yvette, France) sur une colonne DB-225MS (longueur 30 m, 0,25 mm i.d., épaisseur 0,25  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies, Les Ulis, France). Les conditions chromatographiques étaient les suivantes : le gaz vecteur était  $\text{H}_2$  à 37 cm/s, la température d'injection était de 250 °C en mode split (ratio de 20), le programme de température du four démarrait à une température initiale de 60 °C pendant une minute puis la température est augmentée de 20 °C par minute jusqu'à 180 °C puis de 3 °C par minute jusqu'à 230 °C. L'identification des acides gras a été réalisée en comparant le temps de rétention des pics de l'échantillon avec une solution étalon ("*37 component FAME mix*", Supelco, France). Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif de chaque acide gras calculé par normalisation interne de l'aire chromatographique. Ainsi, cette huile contient 9,8% d'acides gras saturés (6,3% C16; 3,3% C18; 0,2% C20), 27,8% d'acides gras monoinsaturés (0,1% C16:1; 27,0% C18:1n-9; 0,6% C18:1n-7; 0,1% C20:1) and 62,4% d'acides gras polyinsaturés (62,4% C18:2; 0,01% C18:3).

### 1.2.2. Détermination de la teneur en $\alpha$ -tocophérol

La teneur en  $\alpha$ -tocophérol est déterminée en chromatographie liquide ultra performance (UPLC). Entre 15 et 30 mg d'huile de tournesol ont été solubilisés dans 1 mL de propan-2-ol. La solution était ensuite centrifugée à 16200 g pendant 5 minutes et à 4 °C. En parallèle, une gamme étalon d' $\alpha$ -tocophérol a été préparée dans du propan-2-ol (de 1 à 50  $\mu\text{M}$ ). La gamme étalon et l'huile de tournesol solubilisée ont été injectées sur un système UPLC ACQUITY (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) avec une colonne ACQUITY BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, taille particule 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters, France). L' $\alpha$ -tocophérol a été détecté par fluorométrie avec une excitation à 290 nm et une émission à 330 nm. Pour la méthode chromatographique, la phase mobile était constituée d'un mélange eau/acide formique (99,95/0,05, v/v, phase A) et de méthanol (phase B) à un débit de 0,2 mL/min, la colonne était maintenue à 35 °C et le volume d'injection était de 2  $\mu\text{L}$ . Le gradient d'élution était le suivant :

Temps (min)	Phase B (%)
0	5
5	60
6,5	100
11,5	100
12	5
16	5

La teneur en  $\alpha$ -tocophérol de l'huile de tournesol a été calculée en comparant l'aire du pic correspondant à l' $\alpha$ -tocophérol avec la courbe de calibration déterminée par l'injection de la solution étalon. Cette valeur est de 665 ppm.

### 1.3. Préparation et caractérisation des différentes matrices de pomme

La variété de pomme, qui a été choisie pour le projet de thèse, est la *Reinette de Flandre*. Elle a été cultivée dans un verger biologique à Ambricourt (Pas-de-Calais, France) et récoltée à l'automne 2015. Ensuite, les pommes ont été conservées en chambre froide à + 4 °C pour les expérimentations *in vitro* jusqu'à leur utilisation ou transformation.

#### 1.3.1. Préparation de la matrice "purée"

La matrice purée a été obtenue en coupant les pommes en 12 dans le sens de la hauteur à l'aide d'une trancheuse puis une fois dans le sens de la largeur à l'aide d'un couteau. Le trognon et les pépins ont été éliminés mais la peau a été conservée, permettant ainsi de préserver la totalité des polyphénols présents dans la pomme. Les morceaux de pommes (2,396 kg) ont été cuits dans une marmite avec une plaque à induction réglée à 2000 W (120 °C) pendant 20 minutes en gardant une température à cœur de 80 °C. Régulièrement, les morceaux ont été mélangés à la spatule et de l'eau a été ajoutée (550 mL) pour éviter la sur-cuisson. A la fin de la cuisson, la purée a été broyée finement à l'aide d'un blender pendant 5 secondes. La purée a été ensuite répartie dans différents pots à confiture de 250 g et un traitement thermique a été

réalisé (20 minutes à 100 °C dans un autoclave) avant la conservation en chambre froide à + 4 °C jusqu'à leur utilisation.

### *1.3.2. Préparation de la matrice "extrait phénolique"*

A l'aide d'une trancheuse, les pommes ont été coupées en 12 dans le sens de la hauteur, le trognon et les pépins ont été éliminés et la peau conservée. Ensuite, les morceaux de pomme ont été mis en surgélation pendant 1 heure à -20 °C puis lyophilisés. Les morceaux de pommes ont été pesés avant et après lyophilisation pour déterminer le pourcentage de matière sèche. Pour finir, les morceaux ont été broyés à l'aide d'un blender durant 3 secondes afin d'obtenir une poudre. La matrice "extrait phénolique" a été préparée à partir de cette poudre.

L'extraction des composés phénoliques a été réalisée en deux étapes. La première étape consistait à éliminer les composés apolaires (ex : chlorophylle, acide gras) par de l'hexane (200 g de poudre de pommes lyophilisée pour 600 mL d'hexane, 45 minutes sous agitation à 280 trs/min et à température ambiante). La deuxième étape consistait à réaliser trois extractions successives avec un mélange acétone/eau (60/40, v/v, 1,3 L de volume total) pendant 15 minutes sous agitation à 280 trs/min et à température ambiante. Entre chaque extraction, la poudre a été filtrée en utilisant un papier filtre Whatman (n° 40) et une pompe à vide. Après homogénéisation, l'extrait hydroacétonique a été concentré par élimination de l'acétone grâce à un évaporateur rotatif sous-vide (Rotavapor R110, Büchi, Rungis, France) puis lyophilisé afin d'obtenir les extraits phénoliques sous forme de poudre. Les extraits étaient stockés et conservés à -20 °C.

### *1.3.3. Identification des composés phénoliques de la pomme*

La séparation et l'identification des composés phénoliques, présents dans cette variété de pomme, ont été réalisées en UPLC (ACQUITY, Waters) couplé à un détecteur UV-Visible à barrette de diode (PDA, Waters) et à un spectromètre de masse de type *ultra ion trap* (HCT, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). La séparation a été obtenue avec une colonne ACQUITY BEH C18 (100 mm x 2,1 mm i.d., 1,7 µm, Waters) maintenue à une température de 35 °C. La

phase mobile était constituée d'un mélange eau/acide formique (99,95/0,05, v/v, phase A) et d'acétonitrile (phase B) à un débit de 0,4 mL/min. Le gradient d'élution était le suivant :

Temps (min)	Phase B (%)
0	3
3	3
7	6
13	10
20	30
22	100
23	100
23,5	3
25	3

Pour l'analyse, 10 mg de pomme lyophilisée ont été solubilisés dans 1 mL d'eau ultrapure, puis 2  $\mu$ L de cette solution ont été injectés. Les conditions de masse étaient les suivantes : ionisation par electrospray (ESI) en mode négatif avec un balayage de masse de 100 à 1400  $m/z$ . Le voltage du capillaire était réglé à 4 kV, le débit d'azote à 12 L/min et la température du gaz de séchage était de 365 °C avec une pression de nébulisation de 60 psi. L'identification des composés phénoliques a été réalisée par comparaison de leur temps de rétention avec des standards ((+)-catéchine, (-)-épicatéchine, acide chlorogénique, isoquercitrine, rutine, phloridzine), de leur profil d'absorption en UV-visible et de leur spectre de masse avec la littérature.

#### 1.3.4. Quantification de la teneur en polyphénols des différentes matrices

L'analyse des monomères et des oligomères ainsi que la quantification des principales classes de polyphénols ont été réalisés après thiolysse acide par HPLC/DAD (UFLC Prominence avec un détecteur à barette de diode (SPD-M20A), Shimadzu, Kyoto, Japon). La séparation a été réalisée sur une colonne LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP18 (250 mm x 4 mm i.d., 5  $\mu$ m, Merck, Darmstadt, Germany) chauffée à 30 °C en présence d'une pré-colonne (LiChrospher RP18 guard cartridge, 5  $\mu$ m, Merck Darmstadt, Germany). La phase mobile était constituée d'un mélange eau/acide acétique (97,5/2,5, v/v, phase A) et d'acétonitrile (phase B) à un débit de 1 mL/min pour un volume d'injection de 20  $\mu$ L. Le gradient d'élution était le suivant :

Temps (min)	Phase B (%)
0	3
5	9
15	16
45	50
48	90
52	90
55	3
60	3

La thiololyse est une méthode permettant de dépolymériser, en milieu acide et à 40 °C, les PCs en libérant les unités d'extension sous forme de carbocations. Ces carbocations vont réagir avec le benzyl mercaptan pour former de l'(épi)catéchine benzylthioether. Après la thiololyse, les unités terminales des PCs sont retrouvées sous forme d'(épi)catéchine libre (Guyot et al., 2001). Les PCs sont caractérisées par leur composition et leur degré de polymérisation. Le degré de polymérisation est calculé par le ratio molaire entre toutes les unités de flavan-3-ols libérées et la somme des unités terminales (épicatechine et catéchine). Le degré de polymérisation moyen est déterminé après soustraction de la somme épicatechine + catéchine de l'échantillon soumis à la thiololyse de cette même somme dans l'échantillons non soumis à la thiololyse.

Pour les deux conditions, des pesées indépendantes en triplicat de 50 mg de chaque matrice lyophilisée ont été effectuées. Les échantillons soumis à la thiololyse ont été dissouts dans 800 µL de benzyl mercaptan à 5% (solubilisé dans du méthanol anhydre) et 400 µL d'acide chlorhydrique 0,4 N également solubilisé dans du méthanol anhydre. Ensuite, la réaction a été réalisée dans un bain marie à 40 °C et pendant 30 minutes. La solution était homogénéisée au vortex toutes les 10 minutes. Pour arrêter la réaction, les échantillons ont été plongés 5 minutes dans la glace. Pour finir, le surnageant a été prélevé à la seringue et filtré (filtre teflon 0,45 µm, diamètre de 15 mm) puis transféré dans un vial de 2 mL en vue de l'injection en HPLC/DAD.

Pour les échantillons bruts (non soumis à la thiololyse), les échantillons ont été dissouts dans 800 µL de méthanol anhydre et 400 µL d'acide formique à 1% solubilisé dans du méthanol anhydre. Le mélange était ensuite placé dans un bain à ultrasons à 40 °C pendant 20 minutes avec une homogénéisation au vortex toutes les 5 minutes. Pour finir, le surnageant était prélevé, filtré et transféré dans un vial de 2 mL en vue de l'injection en HLPC/DAD.

Les composés phénoliques sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention et de leur profil d'absorption en UV-visible par rapport à des solutions étalons ((+)-catéchine, (-)-épicatechine, acide chlorogénique, quercétine, phloridzine). De plus, l'(-)-épicatechine

benzylthioether a été quantifié à 280 nm en équiv. épicatechine, l'acide 4-*p*-coumaroylquinique à 320 nm en équiv. acide *p*-coumarique, les glycosides de quercétine à 350 nm en équiv. quercétine, les PCs dimères B1 et B2 en équiv. épicatechine à 280 nm, la phlorétine-2'-xyloglucoside à 280 nm en équiv. phloridzine. La quantification en mg/kg de poids frais a été réalisée à partir des facteurs de réponse obtenues pour 6 solutions étalons indépendantes de concentration de 40 mg/L.

#### *1.3.5. Quantification de la teneur en vitamine C*

Le principe du dosage de la vitamine C (ou acide ascorbique) repose sur la réduction des ions Fe<sup>3+</sup> en ions Fe<sup>2+</sup> par l'acide ascorbique ce qui, en présence de 2,2-dipyridyl, induit la formation d'un complexe coloré absorbant à 525 nm. Lors de ce dosage, la vitamine C totale et la forme réduite (acide ascorbique) naturelle sont évaluées. La teneur en acide déshydroascorbique (forme oxydée) est obtenue par différence entre la forme totale et la forme réduite. Lors du dosage de la vitamine C totale, l'acide déshydroascorbique est réduit en acide ascorbique par le DL-dithiothréitol (DTT).

Brièvement, quatre pommes fraîches ont été coupées et broyées dans un blender pendant 10 secondes. Ensuite, 50 mg de pommes broyées ont été homogénéisés avec 600 µL d'acide trichloroacétique à 6% puis centrifugés 15 minutes à 10000 *g* et à 4 °C et le surnageant a été prélevé. Pour la mesure de vitamine C totale, 20 µL de DTT ont été ajoutés à 20 µL de surnageant. Pour la mesure de l'acide ascorbique, 20 µL de tampon phosphate à pH 7,4 (100 mM) étaient rajoutés pour remplacer le DTT. Après 20 minutes d'incubation, les échantillons ont été transférés sur une microplaque auquel étaient ajoutés 10 µL de N-éthylmaléimide pour neutraliser l'excès de DTT ou 10 µL de tampon phosphate pour la mesure de l'acide ascorbique. Pour finir, 80 µL de 2,2-dipyridyl ont été ajoutés puis l'absorbance est mesurée à 525 nm (spectrofluorimètre SAFAS FLX-Xenius, SAFAS, Monaco) et à 37 °C. Parallèlement, une gamme étalon d'acide ascorbique (de 0 à 25 mg/100 mL) a été réalisée afin de déterminer une courbe de calibration. Le dosage de la vitamine C a été réalisé en triplicat dans le fruit frais.

## 1.4. Modèles de digestion *in vitro*

Pour limiter les études chez l'homme souvent onéreuses et difficile à mettre en place, plusieurs méthodes *in vitro* ont été développées pour simuler les conditions de digestion gastro-intestinale humaine. Brièvement, les lipides se retrouvant au niveau de l'estomac sont sous la forme d'une émulsion de lipides dispersés dans une phase aqueuse contenant des enzymes, des ions métalliques, du dioxygène en quantité non limitante, des protéines et des polysaccharides. A l'arrivée du bol alimentaire, le pH de l'estomac augmente brusquement pour atteindre une valeur proche de pH 6. Le pH décroît pour arriver à pH 1,5 quatre heures après l'ingestion d'un repas. Un modèle d'émulsion huile dans eau stabilisé par des protéines et/ou des phospholipides alimentaires, dont les quantités sont adaptées à la prise alimentaire, s'est révélé être un bon modèle pour étudier l'oxydation lipidique lors de la digestion gastrique.

### 1.4.1. Oxydation d'une émulsion dans un modèle *in vitro* de digestion gastrique

Dans un premier temps, l'oxydation lipidique a été évaluée sur une émulsion en modèle *in vitro* de digestion gastrique. Une émulsion huile dans eau à 10% a été réalisée pour simuler l'état physique des TG alimentaires au niveau gastrique. Ce système a permis de suivre l'oxydation lipidique à différents stades de la digestion gastrique selon le pH : à pH 5 (début de la digestion) et à pH 3 (digestion avancé).

Dans le cas d'une émulsion à pH 5, un tampon acétate de sodium à 10 mM a été préparé à partir d'acétate de sodium trihydrate et d'acide acétique. Un tampon citrate (10 mM) / phosphate de sodium (20 mM) ajusté à pH 3 a été utilisé comme tampon de digestion avancée. Ce premier système a été utilisé pour évaluer l'interaction de différents paramètres et leurs influences sur l'oxydation lipidique.

#### 1.4.1.1. Préparation de l'émulsion

Dans une bouteille de 60 mL, 100 mg de phospholipides de jaunes d'œuf ont été ajoutés à 36 mL de tampon approprié (pH 3 ou 5). Les phospholipides ont été dispersés avec un

homogénéiseur rotor-stator (Silent Crusher M-01, Heidolph) à 24000 trs/min pendant 2 minutes. Ensuite, 4 g d'huile de tournesol ont été ajoutés à la solution, puis celle-ci a été homogénéisée une nouvelle fois à 24 000 trs/min pendant 2 minutes. Pour finir, le mélange a été sonifié sur un lit de glace par 8 cycles de 30 secondes avec un intervalle de 30 secondes et une amplitude de 40% (20 kHz, Q 700 Sonicator, QSonica, Newtown, CT, USA).

#### 1.4.1.2. Préparation de l'initiateur de l'oxydation lipidique

Environ 22 mg de myoglobine de cœur de cheval étaient dissous dans 4,8 mL d'eau ultra-pure. La concentration initiale de la solution était comprise entre 206 et 215  $\mu\text{M}$ . La concentration de la solution était ensuite ajustée à 200  $\mu\text{M}$  par ajout d'eau ultra-pure après détermination de sa concentration exacte par absorption à 525 nm en utilisant un epsilon de  $7700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Mikkelsen and Skibsted, 1995).

#### 1.4.1.3. Préparation de la pepsine

Pour évaluer l'effet de l'hydrolyse protéique sur la structure du pro-oxydant, de la pepsine porcine était solubilisée dans 1 mL de tampon approprié (pH 3 ou pH 5) pour obtenir des concentrations de 100, 25, 6,25 mg/mL. La pepsine était ensuite diluée d'un facteur 100 dans l'émulsion selon les conditions expérimentales souhaitées.

#### 1.4.1.4. Préparation des différentes sources d'antioxydants

Une solution mère d'épicatéchine à 10 mM a été préparée dans du méthanol. Cette solution était diluée d'un facteur 100 afin d'obtenir une concentration d'épicatéchine de 100  $\mu\text{M}$  dans le milieu de digestion.

De la même manière, l'extrait phénolique a été solubilisé dans le tampon approprié (pH 3 ou pH 5) afin d'avoir une solution à 10 mM en polyphénols totaux. Cette solution a été diluée d'un facteur 100 pour obtenir une concentration en polyphénols totaux de 100  $\mu\text{M}$  dans le milieu de digestion.

La purée de pomme a été pesée et introduite directement dans le milieu de digestion afin d'obtenir une concentration finale de 100  $\mu\text{M}$  en équivalent polyphénols totaux.

La pomme, sous forme de fruit frais, a été broyée pendant 3 secondes à l'aide d'un robot ménager (Valentin, SEB) dans le tampon approprié pour simuler l'étape masticatoire. Ainsi, pour 60 g de pomme provenant de 2 à 3 pommes, 30 g de tampon sont ajoutés. Le mélange a été ensuite incorporé au milieu de digestion afin d'obtenir une concentration de 133  $\mu\text{M}$  en équivalent polyphénols totaux.

#### 1.4.1.5. Simulation de la digestion gastrique d'une émulsion

L'évaluation de l'oxydation lipidique a été réalisée selon différentes conditions de pH (3 ou 5), différentes concentrations en pepsine (0,0625, 0,25 et 1 mg/mL) et différentes sources d'antioxydant (fruit frais, purée, extrait phénolique et épicatechine). Dans un ballon de 50 mL (base 36 mm, hauteur 94 mm, diamètre du col 20 mm), on place à l'aide d'une pipette en verre 13,35 mL d'émulsion auxquels ont été ajoutés 150  $\mu\text{L}$  de la solution de pepsine (ou du tampon approprié). L'évaluation de la capacité antioxydante des différentes matrices a été réalisée par ajout de 150  $\mu\text{L}$  d'épicatechine 10 mM dans le méthanol, ou 150  $\mu\text{L}$  d'extrait solubilisé dans le tampon, ou 111 mg de purée ou 215 mg de pomme broyée comme décrit ci-dessus. Dans l'expérience témoin, 150  $\mu\text{L}$  de tampon approprié étaient utilisés. Enfin, l'oxydation est initiée par ajout de 1,5 mL de la solution de méthyoglobine (20  $\mu\text{M}$  final). Le volume final de digestion était de 15,15 mL.

La digestion était réalisée pendant 6 h dans une étuve à 37 °C et sous agitation magnétique (280 trs/min). Le premier prélèvement (T0) a été effectué pour tous les groupes avant l'ajout de l'initiateur de l'oxydation lipidique (méthyoglobine).

#### 1.4.1.6. Evaluation de l'oxydation lipidique

##### ✓ Mesure des produits d'oxydation primaires

Les hydroperoxydes lipidiques, qui sont considérés comme le premier produit d'oxydation de l'acide linoléique, ont en commun un motif diènes conjugués (Dufour et al., 2007). Pour évaluer l'apparition des diènes conjugués, un prélèvement de 200  $\mu\text{L}$  d'émulsion était réalisé toutes les heures sur 6 h et dissout dans 1 mL de propan-2-ol puis homogénéisé au vortex afin de casser l'émulsion. La solution était alors centrifugée à 16200 g à 4 °C pendant 5 minutes pour éliminer les protéines présentes dans le prélèvement. Après une dilution appropriée du surnageant (200, 100 ou 50  $\mu\text{L}$  dans 2 mL de propan-2-ol), la concentration en diènes conjugués était déterminée par la mesure de l'absorbance à 234 nm (spectrophotomètre HP 8453 à barrette de diode, longueur du trajet optique : 1cm) en utilisant un coefficient d'absorption molaire de 27000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  pour les hydroperoxydes conjugués (Pryor, 1984). L'absorbance des diènes conjugués initialement présents dans l'huile de tournesol était soustraite.

##### ✓ Mesure des produits d'oxydation secondaires

Les produits d'oxydation secondaires ont été évalués en déterminant la concentration des aldéhydes présents dans l'émulsion, dont le 4-HNE. Les aldéhydes sont très réactifs, en particulier avec les protéines. Dans ce travail, seuls les aldéhydes sous forme libre ont été dosés.

Des prélèvements de 200  $\mu\text{L}$  d'émulsions ont été dilués dans l'iPrOH (400  $\mu\text{L}$ ) puis centrifugés (5 min à 16200 g, 4 °C) avant stockage à -20 °C pour analyse des aldéhydes dont le 4-HNE, de l'épicatéchine et de l' $\alpha$ -tocophérol.

Les aldéhydes ont été quantifiés en HPLC/MS après dérivatisation par la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH). Pour cela, une solution de dérivatisation était préparée en dissolvant 50 mg de DNPH dans 20 mL d'acétonitrile et 0,4 mL d'acide formique. Cette préparation est stable 7 jours à + 4 °C.

Le surnageant a été mélangé avec la solution de dérivatisation, volume pour volume (400  $\mu\text{L}$ ), dans un vial de 1,5 mL. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 1 h à température ambiante sous agitation puis les échantillons ont été directement analysés en UPLC/PDA/ESI-

MSn (HCT Bruker Daltonics). La stabilité des adduits avec le DNPH était suivie au cours de l'analyse grâce à l'injection d'un échantillon témoin toutes les heures et le pourcentage de déviation a alors été déterminé.

L'analyse en UPLC/PDA/ESI-MSn a été réalisée avec une colonne ACQUITY HSS T3 (50 mm x 2,1 mm i.d., 1,7 µm, Waters) préchauffé à 40 °C avec un débit de 0,4 mL/min pour un volume d'injection de 2 µL. La phase mobile était constituée d'eau à 0,05% en acide formique (phase A) et d'acétonitrile (phase B). Le gradient d'élution était le suivant :

Temps (min)	Phase B (%)
0	50
1	50
9	98
10	98
10,1	50
11	50

Le détecteur de spectrométrie de masse (HCT Bruker Daltonics) était configuré avec un mode d'ionisation par electrospray en mode négatif et avec un rapport  $m/z$  cible de 350. Le voltage du capillaire était réglé à 4 kV, le débit d'azote à 12 L/min et la température du gaz de séchage était de 360 °C avec une pression de nébulisation de 55 psi. Les spectres étaient enregistrés en mode MRM. La transition suivie pour le 4-HNE était : l'ion 335 fragmenté en ion 167 au temps de rétention 3,96 minutes.

Pour la quantification, une gamme étalon avec le standard de 4-HNE était préparée dans l'acétonitrile et mise à réagir avec le DNPH comme ci-dessus avec 5 points de calibration allant de 1,02 à 0,064 µM. Le 4-HNE donnant deux régioisomères séparés en chromatographie, les aires des 2 pics ont été cumulées.

#### 1.4.1.7. Evaluation de la concentration en $\alpha$ -tocophérol

La dégradation de l' $\alpha$ -tocophérol a été évaluée par UPLC/Fluorométrie. Pour cela, un prélèvement de 200  $\mu$ L d'émulsion dilué 3 fois dans du propan-2-ol était effectué toutes les 15 minutes durant la première heure de digestion puis à 90, 120 et 180 minutes. L'échantillon était ensuite centrifugé à 16200  $g$  et à 4 °C pendant 5 minutes. Le surnageant était mis sous atmosphère d'argon et conservé à -20 °C jusqu'à l'analyse en UPLC détaillée à la section 1.2.2.

#### 1.4.1.8. Evaluation de la bioaccessibilité des polyphénols natifs

Pour les groupes contenant l'épicatéchine et les matrices fruit frais, purée et extrait phénolique, la bioaccessibilité des polyphénols a été évaluée toutes les heures par des prélèvements de 500  $\mu$ L d'émulsion. Le prélèvement était suivi d'une centrifugation à 16200  $g$  pendant 5 minutes et à 4 °C. La phase aqueuse était récupérée et filtrée sur un filtre seringue Phenex RC 0,45  $\mu$ m (Phenomenex, Le Pecq, France) puis conservée à -80 °C jusqu'à l'analyse. L'analyse était réalisée en UPLC/DAD/ESI-MS avec la méthode détaillée en section 1.3.3. L'acide chlorogénique a été quantifié à 320 nm, les dérivés *p*-coumaroylés en équivalent de l'acide *p*-coumarique à 320 nm, les dihydrochalcones en équivalent de la phloridzine à 280 nm, les PCs monomères et dimères en équivalent épicatéchine à 280 nm et les flavonols en équivalent de l'isoquercitrine à 350 nm. Pour l'épicatéchine comme source unique d'antioxydant, sa présence a été évaluée en adaptant la méthode chromatographique utilisée pour quantifier l' $\alpha$ -tocophérol avec une détection en UV/Vis à 280 nm (méthode décrite à la section 1.2.2).

Une calibration de 30 à 0,5  $\mu$ M en 6 points de gamme a été réalisée pour quantifier les différentes classes de polyphénols.

#### 1.4.1.9. Evaluation de la dégradation de la vitamine C

La vitamine C a été mesurée toutes les 5 minutes durant les 30 premières minutes de la digestion pour les matrices de fruit frais et purée.

Pour cela, un prélèvement de 200  $\mu\text{L}$  d'émulsion était dilué dans 600  $\mu\text{L}$  d'acide phosphorique à 2%. Après homogénéisation au vortex, l'échantillon était centrifugé 5 minutes à 16200 g et à 25 °C. Le surnageant était alors transféré dans un vial puis analysé en UPLC/PDA. L'analyse était réalisée avec une colonne ACQUITY C18 BEH (50 mm x 2,1 mm i.d., 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters) chauffée à 24 °C. Le débit était réglé à 0,2 mL/min et le volume d'injection était de 2  $\mu\text{L}$ . La phase mobile était constituée d'eau à 0,05% d'acide formique (phase A) et de méthanol (phase B) et le gradient d'élution était le suivant :

Temps (min)	Phase B (%)
0	5
5	10
5,5	5
7,5	5

La vitamine C a été détectée à une longueur d'onde de 254 nm. Une gamme étalon, de 20 à 0,1  $\mu\text{M}$  d'acide ascorbique, a été préparée et injectée parallèlement (7 points de gamme).

#### 1.4.1.10. Effet de la lipolyse sur l'oxydation lipidique

Afin d'évaluer l'impact de la lipolyse sur la cinétique d'oxydation lipidique au niveau gastrique, une lipase fongique a été utilisée (*Aspergillus Niger*, lipase A d'Amano).

Pour cela, à l'émulsion était ajoutée la myoglobine et selon les essais, la pepsine (0,25 mg/mL final) et la lipase pour une activité finale de 100 U/mL (activité selon fabricant de 12000 U/mg).

Toutes les 30 minutes jusqu'à 240 minutes, un prélèvement de 200  $\mu\text{L}$  était effectué et solubilisé dans 1 mL de propan-2-ol pour quantifier les diènes conjugués et le 4-HNE.

De plus, chaque extrait isopropylique, préalablement dilué au  $\frac{1}{4}$  dans du propan-2-ol, était injecté en UPLC/DAD/ESI-MSn afin d'évaluer l'hydrolyse des lipides de l'émulsion. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne ACQUITY C18 BEH (50 mm x 2,1 mm i.d., 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters) préchauffée à 37 °C avec un débit de 0,4 mL/min et un volume d'injection de 2  $\mu\text{L}$ . La phase mobile était constituée d'un mélange eau/acide formique (90/10,

v/v, phase A) contenant 10 mM de formiate d'ammonium et d'acétonitrile (phase B). Le gradient d'élution était le suivant :

Temps (min)	Phase B (%)
0	0
3	0
17	34
17,5	100
18,5	100

Le détecteur de spectrométrie de masse a été configuré pour le mode d'ionisation électrospray négatif entre 0 et 6,8 min avec les paramètres suivants : le voltage du capillaire était de 3 kV et un balayage de 100 à 300 Da. Pour le mode positif, le voltage du capillaire était de -3 kV, un balayage de 200 à 700 Da entre 6,8 et 13 min et un balayage de 250 à 1000 Da après 13 min. Pour les deux modes, la température du gaz de séchage était de 365 °C pour un débit de 10 L/min et une pression de nébulisation de 60 psi.

Pour la quantification des composés, une solution étalon a été préparée contenant de la trilinoléine, de la trioléine, de l'acide linoléique et de l'acide oléique solubilisés dans de l'acétonitrile. Une courbe de calibration a été réalisée allant de 3 mM à 93,75 µM par des dilutions au demi en cascade.

Cette analyse a permis de détecter les quatre acides gras majoritaires de l'huile de tournesol (acides linoléique, palmitique, oléique et stéarique) ainsi que leur présence sous forme de diglycérides ou de triglycérides.

#### *1.4.2. Oxydation d'une émulsion dans un modèle in vitro de digestion gastro-intestinale*

L'oxydation lipidique a été ensuite déterminée lors de la digestion gastro-intestinale d'une émulsion huile dans eau dans un modèle *in vitro* statique utilisant les conditions de digestion harmonisées par le COST Infogest (Minekus et al., 2014).

Pour la matrice « fruit frais », la phase orale a été simulée par un broyage de 3 secondes, à l'aide d'un robot (valentin de Seb), de pommes (60 g sur 3 pommes différentes) dans une

solution de salive artificielle (30 g de SSF, *Simulated Salivary Fluid*) (Tableau 3) comme déterminé lors d'un test d'incorporation de salive durant la mastication de quartiers de pommes. Les autres matrices antioxydantes ont été incluses directement en phase gastrique. Elles ont été préparées comme décrit en 1.4.1.4.

L'émulsion été préparée de manière identique à précédemment (section 1.4.1.1) mais en utilisant comme tampon la solution simulant le fluide gastrique (SGF, *Simulated Gastric Fluid*) (Tableau 3) à un pH ajusté à 5.

La phase gastrique de digestion était constituée de l'émulsion préparée dans le SGF (12,5 mL), de méthyoglobine à 20  $\mu\text{M}$  en final (1,5 mL), de pepsine à 1000 U/mL en final (1 mL), de  $\text{CaCl}_2$  à 0,75 mM en final (112,5  $\mu\text{L}$  d'une solution à 0,1 M) et selon les essais des différentes matrices antioxydantes (150  $\mu\text{L}$  d'une solution d'épicatéchine 10 mM ou 111 mg d'extrait phénolique dans 1 mL de tampon pH 5 ou 124 mg de purée ou 215 mg de pomme fraîche préparée comme ci-dessus) pour un volume total de 15,1-15,2 mL. Les concentrations finales en polyphénols totaux sont de 100  $\mu\text{M}$  pour les matrices purée, extrait phénolique et épicatechine et de 133  $\mu\text{M}$  pour le fruit frais. L'ensemble de ces éléments étaient préparés et ajoutés de manière séquentielle comme dans le modèle de digestion *in vitro* gastrique et le pH ajusté avant l'ajout de méthyoglobine.

La durée totale de la phase gastrique était de 2 heures à 37 °C et sous agitation à 280 trs/min. Durant la phase gastrique, deux conditions ont été réalisées : 2 heures à pH 5,0 ou 1 heure à pH 5,0 puis 1 heure à pH 3,0 par ajout de de HCl à 1 M (19  $\mu\text{L}$ ).

Des prélèvements de 200  $\mu\text{L}$  pour doser les diènes conjugués et de 500  $\mu\text{L}$  pour évaluer la bioaccessibilité des polyphénols ont été effectués toutes les 30 minutes lors de la phase gastrique et traités comme pour la digestion *in vitro* gastrique seule (sections 1.4.1.6 et 1.4.1.8). Les analyses de la dégradation de l' $\alpha$ -tocophérol et de l'épicatéchine durant la phase gastrique dans ce modèle de digestion ont été réalisées de manières identiques (sections 1.4.1.7 et 1.4.1.8). Après le dosage des diènes conjugués au temps 120 minutes, le surnageant restant a été conservé à -20 °C pour analyser les aldéhydes produits en fin de phase gastrique. Un aliquot de 1 mL de la phase gastrique finale était conservé à -20 °C en vue d'analyses complémentaires si nécessaire.

Le passage en phase intestinale a été réalisée par une dilution volume par volume (1/1) des 10,5 mL restant de la phase gastrique par ajout de 5,5 mL de solution de pancréatine (100 U trypsine/mL final) solubilisée dans un tampon simulant les sécrétions intestinales (SIF,

*Simulated Intestinal Fluid*, ajusté à pH 6,5 par du NaOH à 1N) (Tableau 3) et 5 mL d'extrait de sels biliaires également solubilisés dans du SIF pour une concentration finale de 10 mM. Ensuite, 63 µL de CaCl<sub>2</sub> à 0,1 M étaient ajoutés pour obtenir une concentration finale de 0,675 mM (CaCl<sub>2</sub> déjà présent dans SGF) et le pH ajusté à 6,5 par ajout de 195 µL d'HCl à 1 N. La durée de la phase intestinale était de 2 heures à 37 °C sous agitation magnétique à 280 trs/min. Comme pour la phase gastrique, les prélèvements étaient réalisés toutes les 30 minutes pour doser les dièses conjugués et pour évaluer la bioaccessibilité des polyphénols natifs. Le surnageant restant pour doser les aldéhydes en fin de phase intestinale était conservé à -20 °C et 1 mL de phase intestinale finale a été conservé à -80 °C pour des analyses complémentaires si nécessaire. Les analyses étaient identiques à celles pratiquées en modèle de digestion gastrique. Cependant, l'analyse des aldéhydes a également été effectuée pour le pentanal, l'hexanal, le 2-heptéanal et le 2-octéanal. La méthodologie était identique à la section 1.4.1.6. Les transitions suivies étaient les suivantes :

- 4-HNE, ion 335 → 167 (3,96 min),
- pentanal, ion 265 → 163 (4,36 min),
- hexanal, ion 279 → 163 (5,15 min),
- 2-heptéanal, ion 291 → 163 (5,60 min),
- 2-octéanal, ion 305 → 163 (6,30 min).

**Tableau 3 :** Concentration en électrolytes des différents fluides simulés utilisés dans le modèle de digestion gastro-intestinale *in vitro* statique.

	SSF (mmol/L)	SGF (mmol/L)	SIF (mmol/L)
	pH 7	pH 5	pH 6.5
KCl	15,1	6,9	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,7	0,9	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	13,6	25	85
NaCl	-	47,2	38,4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0,15	0,1	0,33
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,06	0,5	-

## **1.5. Effet du pH, de la pepsine et de l'épicatéchine sur la structure de la méthyoglobine**

### *1.5.1. Effet du pH*

L'effet de la variation du pH au cours de la digestion (baisse au niveau gastrique, hausse au niveau intestinale) sur la stabilité de la méthyoglobine a été évalué pour potentiellement expliquer les différences d'oxydation lipidique qui serait directement lié aux variations de pH.

Dans un premier temps, pour mimer la descente du pH dans l'estomac lors de la digestion d'un repas, une descente de pH de 7 à 2 a été réalisée. Pour cela, 50  $\mu$ L d'une solution de myoglobine 200  $\mu$ M dans un tampon citrate 10 mM/phosphate 20 mM à pH 7 ont été dilués dans une cuve en quartz par 1,95 mL du même tampon pour une concentration finale de 5  $\mu$ M en méthyoglobine. Une microélectrode Mettler-Toledo a été insérée dans la solution le long d'un angle de la cuve. Les spectres d'absorption de la méthyoglobine ont été enregistrés toutes les 30 secondes en mode cinétique par un spectrophotomètre à barrettes de diode (Hewlett-Packard 8453, trajet optique : 1cm, 190 nm à 1100 nm). Une fois le pH ajusté exactement à 7, la descente de pH par palier de 0,5 (pH 7 à 5) ou de 0,25 (pH 5 à 3) était réalisée par ajout de HCl 1 N (de 0,8 à 10  $\mu$ L) une fois l'absorbance à 410 nm stabilisée (bande de Soret). La température de la cuve en quartz était maintenue à 37 °C à l'aide d'un bain thermostaté. L'agitation magnétique dans la cuve était réglée pour une vitesse constante de 1000 trs/min grâce à un agitateur Variomag (Telemodul 20C). Les valeurs de pH mesurées à 37 °C étaient inférieures de 0,05 unités de pH à celles mesurées à 25 °C et sont rapportées sans correction.

Dans un second temps, le passage de la fin de la phase gastrique à la phase intestinale (duodénum) a été mimé. Pour cela, la même méthode que précédemment a été utilisée. Quand le pH était à 3 depuis 6 ou 30 min, il a été remonté par palier de 0,25 jusqu'à pH 6,25 à l'aide d'une solution de NaOH 1 N (1,5 -6  $\mu$ L).

En parallèle, des spectres d'absorption ont été acquis pour l'hématine à différents pH. Dans 1,98 mL de tampon citrate/phosphate ajusté avec HCl 1 N pour des pH entre 5 et 3 ont été ajoutés 20  $\mu$ L d'une solution d'hématine 500  $\mu$ M préparée dans DMSO/méthanol (1:1).

### 1.5.2. Effet de la pepsine en absence et en présence d'épicatéchine

L'impact de la pepsine sur la stabilité de la métmyoglobine a été évalué à différents pH pour expliquer son influence sur l'oxydation lipidique. Pour cela, à 1910 µL de tampon citrate/phosphate acidifié à pH 5, 4,75, 4,5 ou 4,25, ont été ajoutés 20 µL de MeOH, suivis 30 s plus tard par 50 µL de métmyoglobine 200 µM préparée dans l'eau. Après stabilisation des changements spectraux (3 min), 20 µL de pepsine à 6,25 mg/mL solubilisée dans du tampon acétate 10 mM à pH 5 étaient ajoutés pour obtenir une concentration finale de 62,5 µg/mL dans la cuve. L'activité de la pepsine pour cette étude était de  $2041 \pm 177$  U/mg comme déterminée selon Minekus et al. (2014). L'enregistrement des spectres était réalisé toutes les 1 à 5 s et les constantes de vitesse d'ordre 1 sont extraites des cinétiques à l'aide du logiciel interne.

Les proportions entre les différents éléments (épicatéchine, pepsine et métmyoglobine) ont été conservées par rapport aux modèles de digestion *in vitro* avec des concentrations 4 fois moindres.

### 1.6. Mesure de la taille de particule (gouttelette lipidique) dans les modèles de digestion

La distribution de la taille des gouttelettes lipidiques a été déterminée au temps T0 sur les modèles de digestion *in vitro* avant l'addition de la myoglobine avec un granulomètre laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Orsay, France). Le calcul a été réalisé en utilisant la théorie de Mie et des indices de réfraction de 1,475 pour l'huile de tournesol, de 1,333 pour le dispersant (eau osmosée) et une valeur d'absorbance de 0,01 pour la taille de particule. La distribution était déterminée en utilisant trois paramètres de granulométrie différents :  $d_{(3,2)}$ ,  $d_{(4,3)}$  et le mode. Le diamètre de Sauter ou surfacique  $d_{(3,2)}$  représente le diamètre d'une sphère qui aurait la même aire de surface que les particules d'intérêt. Il est calculé avec la formule :  $d_{(3,2)} = \sum n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2$  où  $n_i$  est le nombre de particules avec le diamètre  $d_i$ . Le paramètre  $d_{(4,3)}$  représente le diamètre des particules pondéré par leur volume calculé par la formule suivant :  $d_{(4,3)} = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$  où  $n_i$  est le nombre de particules avec le diamètre  $d_i$  (Merkus, 2009). Le mode est le diamètre des particules les plus représentées dans la distribution.

## **1.7. Analyse statistique**

Tous les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $n = 3 - 7$ ). Une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour évaluer l'effet des variations des différentes conditions expérimentales. Si un effet significatif était retrouvé, l'ANOVA était suivie d'un test post-hoc à comparaison multiple de Tukey-Kramer avec une significativité inférieure à 0,05 en utilisant le logiciel XLStat pour identifier les différences entre les groupes (version 2013, Addinsoft SARL, Paris, France).

## 2. Matériels et méthodes des expérimentations *in vivo*

Tous les protocoles expérimentaux de l'étude animale, ont été réalisés au sein du Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire (EA4278, UFR Sciences) de l'université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, de manière conformes au «*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*» décrit par l'institut national de la santé des Etats-Unis (NIH, National Academies Press US, 8th edition, 2011) et en accord avec la directive 2010/63 EU du parlement européen sur l'utilisation des animaux en laboratoire ainsi qu'à la réglementation du ministère français de l'agriculture.

Tous les animaux ont été élevés dans des conditions constantes de température ( $21 \pm 1$  °C) et d'humidité ( $55 \pm 5\%$ ) avec des cycles jour/nuit de 12 heures et un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau.

Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés aux effets chroniques *in vivo* de l'oxydation lipidique induite au cours de la digestion sur la fonction vasculaire ainsi qu'aux effets potentiellement antioxydants des polyphénols de la pomme *Reinette de Flandre*.

### 2.1. Préparation des différents éléments du régime nutritionnel

La nourriture enrichie en lipides était le High Fat 230 (HF 230, SAFE, Augy, France). Les teneurs respectives en acides gras ont été évaluées selon la méthode détaillée dans la section 1.2.1 : C14:0 (1,7%), C16:0 (24,6%), C16:1 (3,2%), C17:0 (0,4%), C17:1 (0,3%), C18:0 (11,9%), C18:1n-9 (32,4%), C18:1n-7 (3,5%), C18:2 (11,1%) et C18:3 (0,8%).

L'huile de tournesol Rustica (lot A21815, Marque Repère, E. Leclerc) utilisée était la même que celle des études *in vitro*. Cette huile contient 9,8% d'acides gras saturés (6,3% C16; 3,3% C18; 0,2% C20), 27,8% d'acides gras monoinsaturés (0,1% C16:1; 27,0% C18:1n-9; 0,6% C18:1n-7; 0,1% C20:1) and 62,4% d'acides gras polyinsaturés (62,4% C18:2; 0,01% C18:3).

La viande de bœuf a été achetée chez un boucher (collier, charolaise, Montfavet) sous forme de steaks hachés de 150 g. Les steaks hachés ont été placés dans des sachets alimentaires plastiques fermés hermétiquement puis cuits dans un bain marie à 70 °C pendant 35 minutes permettant une cuisson douce et homogène. A la fin de la cuisson, les steaks ont été mis en

surgélation pendant 1 h à -20 °C après évacuation du jus de cuisson. Pour finir, les steaks étaient lyophilisés puis broyés (robot Valentin, SEB) pour obtenir une poudre conservée à -20 °C jusqu'à la reconstitution des différents régimes. Cette poudre a été utilisée pour les analyses de fer et de lipides. Ainsi, cette viande contient 10,3 g de lipides (triglycérides) pour 100 g de matière sèche (méthode gravimétrique). Les teneurs respectives en acides gras ont été évaluées selon la méthode détaillée dans la section 1.2.1 : C16:0 (25,6%), C16:1 (3,8%), C17:0 (1,4%), C17:1 (1,1%), C18:0 (17,1%), C18:1n-9 (46,2%), C18:1n-7 (2,2%), C18:2 (1,8%) et C18:3 (0,7%).

Le protocole de dosage du fer héminique contenu dans la viande de bœuf cuite lyophilisée utilisée lors de l'étude *in vivo* est adapté de Lombardi et al. (Lombardi-Boccia et al., 2002). Brièvement, 54,15 mg de viande lyophilisée ont été dissouts dans 1,9 mL d'une solution d'acétone/eau acidifiée par HCl 1,5 N (v/v, 80/20) pendant 60 minutes à l'obscurité et avec une homogénéisation par vortex toutes les 10 minutes. Ensuite, la solution était centrifugée à 6000 g pendant 5 minutes et à 20 °C. Pour finir, l'absorbance au spectrophotomètre de la solution à 640 nm retranchée de l'absorbance à 740 nm a été déterminée. Parallèlement une gamme d'hématine allant de 0 à 100 µM solubilisée dans une solution d'acétone/eau acidifiée par HCl 1,5 N (v/v, 80/20) était préparée afin d'évaluer la quantité de fer héminique contenu dans la poudre de viande (Tableau 4). La teneur en fer héminique a été évaluée à  $82,3 \pm 5,5$  µg de fer atomique/g de matière sèche ou lyophilisée pour le lot n°2 (12 kg) et  $63,1 \pm 4,8$  µg de fer atomique/g de matière sèche pour le lot n°3 (12 kg).

Les pommes utilisées étaient issues de la récolte 2016 du même producteur que pour les études *in vitro*. La quantification de la teneur en polyphénols a été évaluée de manière identique à précédemment pour les matrices « purée » et « extrait phénolique » (section 1.3.4). La matrice extrait phénolique a été préparée de manière identique aux études *in vitro* (section 1.3.2). La matrice purée a été préparée à l'aide d'un robot Roboqbo QB8-3 (Roboqbo, Bentivoglio, Italie). Brièvement, 2,5 kg de pomme ont été coupés en 12 à l'aide d'une trancheuse en éliminant le trognon et pépins mais en conservant la peau. Ensuite, la purée a été cuite dans le robot Roboqbo QB8-3 sous vide (-950 mbar) à 80 °C (par un chauffage double enveloppe à convection) pendant 10 minutes et sous agitation (1000 trs/min). Pour finir, la purée a été répartie dans différents pots à confiture puis autoclavée à 100 °C pendant 20 minutes et stockée à 4 °C en attendant la reconstitution des différents régimes.

## 2.2. Population et régimes expérimentaux

Pour cette étude chronique, 80 souris mâles C57BL6 ApoE<sup>-/-</sup>, déficientes pour le gène de l'apolipoprotéine E ont été fournies par le Laboratoire Hypoxie et Physiopathologies cardiovasculaires et respiratoires (HP<sup>2</sup>) des Facultés de Médecine/Pharmacie de l'Université de Grenoble Alpes/INSERM (U1042). Ces souris âgées de 8 semaines (22 ± 1 g) ont été réparties aléatoirement en quatre groupes de 20 animaux. La durée du régime nutritionnel était de 12 semaines. Les différents régimes ont été constitués au sein du laboratoire et les quatre groupes étaient les suivants :

- (1) HF 230 + viande rouge + *cellulose* (HF+RM)
- (2) HF 230 + viande rouge + huile de tournesol + *cellulose* (HF+RM+SO)
- (3) HF 230 + viande rouge + huile de tournesol + purée de pomme (PUREE)
- (4) HF 230 + viande rouge + huile de tournesol + extrait phénolique + *cellulose* (Phenolic extract, PE).

La composition en macro- et micronutriments des différents régimes est donnée en détail dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Composition et répartition nutritionnelle des différents régimes riches en gras supplémentés ou non en polyphénols.

<b>Nourriture ingérée</b>				
	HF + RM	HF + RM + SO	PUREE	PE
Protéines (% kcal)	16,1	12,3	12,1	12,1
Carbohydrates (% kcal)	24,2	18,5	19,4	16,6
Lipides (% kcal)	59,7	69,2	68,5	68,3
Calories (kcal par jour)	12,1	13,0	11,7	12,4
<b>Composition (% de poids de régime)</b>				
High Fat 230	79,5	68,6	60,6	67,0
Huile de tournesol	-	13,7	12,1	13,4
Viande rouge	19,9	17,1	15,1	16,7
Polyphénols	-	-	0,060	0,061
Purée	-	-	12,1	-
Extrait phénolique	-	-	-	2,3
Cellulose	0,64	0,55	-	0,54
AGPI n-6	10,5	28,3	28,3	28,3
Cholestérol	0,076	0,066	0,058	0,064
Vitamine E	0,014	0,021	0,019	0,021
Fer héminique	0,0013	0,0011	0,0010	0,0011

La cellulose a été ajoutée aux régimes HF+RM, HF+RM +SO et PE pour compenser l'apport en fibres de la matrice purée.

La détermination de la composition des différents éléments de nos régimes nutritionnels a été réalisée à partir des valeurs fournis par SAFE (composition High Fat 230) et par les tables Ciqual (protéines de la viande, cholestérol du saindoux et de la viande, glucides des matrices purée et extrait phénolique de pomme). Les valeurs de matière sèche, de fer héminique et du taux de lipides de la viande ainsi que celles pour les AGPI n-6 de la viande, de l'High Fat 230 et de l'huile de tournesol et celle de la vitamine E de l'huile ont été déterminées dans notre laboratoire (SQPOV).

Les différents régimes étaient conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation. Trois fois par semaine, les régimes ont été changés et un suivi de la prise alimentaire a été réalisé. Le suivi de poids des souris était effectué toutes les semaines.

Le pourcentage d'acide linoléique des lipides totaux a été évalué par calcul en utilisant les valeurs mesurées pour le High Fat 230, l'huile de tournesol et la viande rouge. La teneur en 4-HNE dans la nourriture avant et après les changements de régime a été déterminée selon la

méthode décrite dans la section 1.4.1.6 et ne présentait pas de différence significative indiquant que l'oxydation lipidique n'avait pas lieu lors de la préparation ou du stockage des régimes. La supplémentation en polyphénols est basée sur des doses nutritionnelles utilisées chez l'homme (0,6 g de polyphénols pour 1 kg de nourriture totale).

## **2.3. Mesure de paramètres physiologiques**

### *2.3.1. Evaluation de l'homéostasie du glucose*

#### 2.3.1.1. Test de tolérance au glucose

Afin d'évaluer une éventuelle altération du contrôle de la glycémie, un test de tolérance au glucose a été réalisé en fin de régime. Le principe du test repose sur l'administration intra-péritonéale d'une quantité importante de glucose pour évaluer la capacité de l'organisme à réguler sa glycémie. Cette régulation met en jeu la fonction endocrine du pancréas (sécrétion d'insuline) et la capacité des organes périphériques comme les muscles squelettiques à utiliser ce glucose. Les individus pré-diabétiques ou diabétiques vont présenter une hyperglycémie plus prononcée et persistante indiquant une insulino-résistance.

Brièvement, les animaux ont été mis à jeun la veille et pour une période d'environ 15 heures (18h-9h). Une incision était pratiquée sur le bout de la queue, préalablement anesthésiée par l'application de lidocaïne, permettant de réaliser des prélèvements sanguins au niveau de la veine caudale. Les mesures de glycémie ont été réalisées par un lecteur de glycémie (Caresens N; I sens). Une première mesure de glycémie était réalisée à jeun puis à t=10, 20, 30, 60 et 120 minutes après administration intra-péritonéale d'une dose de glucose correspondant à 1,5 g/kg.

#### 2.3.1.2. Test de tolérance à l'insuline

Le test de tolérance à l'insuline permet d'évaluer la sensibilité à l'insuline et éventuellement la présence d'une insulino-résistance et a été réalisé lors de la 12<sup>ème</sup> semaine de régime. Le principe de ce test repose sur la capacité des tissus insulino-sensibles à capter le glucose. L'amplitude de la réponse hypoglycémique suite à l'injection intra-péritonéale d'insuline est un indice d'insulino-sensibilité. Pour un sujet non pathologique c'est-à-dire insulino-sensible,

la glycémie diminue rapidement et revient à une valeur normale en fin de test. A l'inverse, chez un sujet insulino-résistant où l'effet de l'insuline est diminué, la glycémie décroît faiblement.

Pour réaliser ce test, les souris ont été mises à jeun sur une période de 6 heures (8h-14h). Ensuite, la glycémie à jeun était mesurée par une incision sur la veine caudale puis à t= 10, 20, 30, 60, 90 et 120 minutes après une administration intra-péritonéale d'une dose d'insuline correspondant à 2 UI/kg. En cas de mesure d'une glycémie inférieure à 50 mg/dL, les souris étaient exclues du protocole et stabilisées par une injection intra-péritonéale de glucose à 2 g/kg.

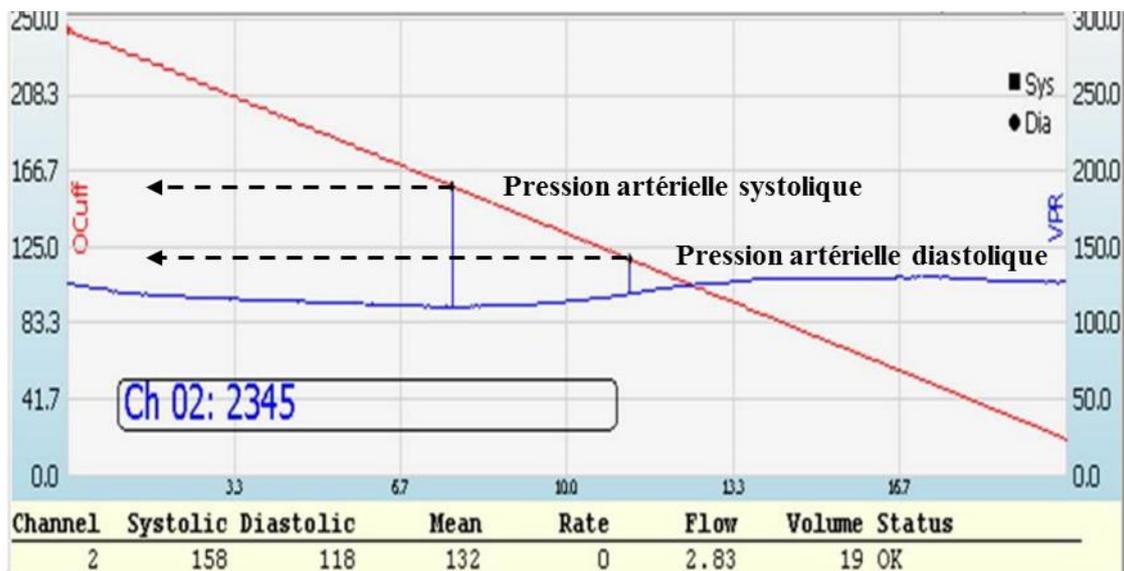
### 2.3.2. *Mesure de la pression artérielle*

La pression artérielle a été mesurée de manière non-invasive en début et en fin de régime par pléthysmographie, préservant ainsi l'intégrité des animaux durant l'étude chronique, sur un système CODA de mesure dite « Tailcuff » (CODA, Kent Scientific corporation, Torrington, CT, USA). La mesure de pression artérielle a été réalisée par la pose de deux brassards au niveau de la queue de la souris. Un premier brassard d'occlusion était placé à la base de la queue et gonflé à une pression supra-systolique pré-déterminée (250 mm Hg) permettant de stopper le flux sanguin au niveau de l'artère caudale et se dégonflant progressivement. Un second brassard était placé sur la partie distale de la queue évaluant les variations du flux sanguin. La pression systolique était déterminée et enregistrée automatiquement lorsque que la pression appliquée par le brassard d'occlusion n'était plus suffisante pour contenir le flux sanguin. La pression diastolique était déterminée lorsque l'augmentation du volume au niveau de la queue mesurée par le brassard distal était nulle (Figure 39). Pour finir, la pression moyenne était calculée par la formule suivante :

$$\text{Pression Artérielle Moyenne} = \text{Pression Diastolique} + \frac{1}{3} \times (\text{Pression Systolique} - \text{Pression Diastolique})$$

Afin d'obtenir une reproductibilité optimale, les mesures ont toutes été réalisées à la même heure (9h) évitant les potentielles variations journalières de pression artérielle. De plus, 2 cycles de mesures d'acclimatation étaient réalisés la semaine précédent les mesures afin de diminuer

l'influence du stress des animaux sur celles-ci. Trente minutes avant chaque mesure, les souris ont été placées dans une couveuse à 37 °C induisant une vasodilatation périphérique de l'artère caudale afin d'améliorer la qualité de la mesure. Ensuite, les souris ont été introduites dans des tubes de contention et déposées sur une plateforme chauffante réglée à 37 °C maintenant une température corporelle stable. Une fois les brassards placés, 25 cycles de mesures ont été réalisés en considérant les 10 premiers comme des cycles d'habituation non enregistrés et seuls les 15 suivants étaient enregistrés pour chaque animal. Pour chaque souris, les pressions artérielles systolique, diastolique et moyenne sont le résultat d'au moins 10 cycles moyennés.



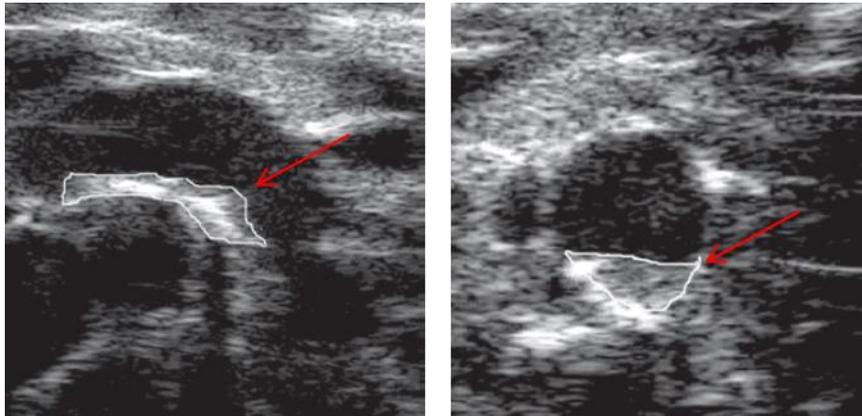
**Figure 39** : Rendu graphique d'un enregistrement sur un cycle de la pression artérielle par le système CODA.

### 2.3.3. Evaluation de la taille des plaques d'athérome in vivo par échographie

La formation de la plaque d'athérome a été évaluée en début et fin de régime par échographie avec le système d'imagerie Vevo 3100™ (Fujifilm VisualSonics, Toronto, Canada) équipé de la sonde MX550D™ à une fréquence de 40 MHz et d'une résolution de 40 µm au niveau de la crosse aortique.

Les souris ont été préalablement anesthésiées par l'inhalation d'un mélange à 4% d'isoflurane (IsoFlo™, Zoetis, Parsippany, États-Unis) dans de l'air médical (22% O<sub>2</sub>, 78% N<sub>2</sub>) (Air Liquide, Paris, France) ventilé à un débit d'1 L.min<sup>-1</sup>. L'anesthésie était maintenue au masque pendant toute la durée de l'examen par un mélange à 1,5% d'isoflurane dans l'air médical, ventilé à 1 L.min<sup>-1</sup>. L'animal était positionné en décubitus dorsal sur une plaque

chauffante permettant le maintien de sa température corporelle qui était suivie par sonde rectale. Le cou et la poitrine étaient soigneusement rasés en utilisant une crème dépilatoire (Veet, Reckitt Benckiser, Slough, Royaume-Uni). La fréquence respiratoire et l'électrocardiogramme étaient monitorées tout au long de l'examen grâce aux électrodes présentes au niveau des pattes sur la plaque. La crosse aortique était dégagée à partir d'une incidence parasternale longue axe (décalage à droite). Le post-traitement des images a été effectué à l'aide du logiciel VevoLab™ (Fujifilm VisualSonics, Toronto, Canada). La surface de la plaque a été mesurée en deux incidences à partir d'une coupe longitudinale et d'une coupe transversale de la crosse aortique (Li et al., 2011) (Figure 40). Les mesures ont été réalisées au pic du R lors du complexe QRS (contraction des ventricules), entre deux pics inspiratoires, et moyennées sur 3 cycles cardiaques.



**Figure 40** : Mesure de la plaque d'athérome en échographie (Li et al., 2011).

Contour de la plaque d'athérome en blanc. A gauche : coupe longitudinale. A droite : coupe transversale.

#### **2.4. Anesthésie et prélèvements tissulaires**

A la fin des 12 semaines de régime nutritionnel, les souris étaient mises à jeun la veille pour une période d'environ 15 heures (18h-9h). Le lendemain, les souris ont été anesthésiées par une injection intra-péritonéale de Pentobarbital Sodique® (120 mg/kg). Après une thoracotomie, un prélèvement sanguin intracardiaque au niveau du ventricule gauche a été réalisé. Le prélèvement sanguin était ensuite laissé 10 minutes à coaguler dans un tube eppendorf puis celui-ci était centrifugé 10 minutes à 300 g à 4 °C. Le bloc cœur-aorte était alors prélevé jusqu'à la bifurcation iliaque et plongé rapidement dans une solution de Krebs-Henseleit à 4 °C (NaCl

118 mM; KCl 4,7 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; Glucose 11 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM). Selon les animaux, les aortes ont été utilisées pour effectuer (1) soit les tests de vasoréactivité, (2) soit une coloration histologique par l'Oil-Red-O afin de visualiser le développement des plaques d'athérome, (3) soit des analyses biochimiques. Pour ces dernières, le tissu adipeux péri-vasculaire était soigneusement retiré, puis les échantillons étaient congelés dans l'azote liquide et conservés à -80 °C.

Enfin, la partie supérieure du cœur comprenant l'arche aortique (avec les valves aortiques) a été plongée dans de l'O.C.T. (*Optimal Cutting Temperature*) permettant leur fixation puis les échantillons étaient congelés dans l'azote liquide et conservés à -80 °C pour évaluer ultérieurement les caractéristiques des plaques d'athérome grâce à des coupes histologiques.

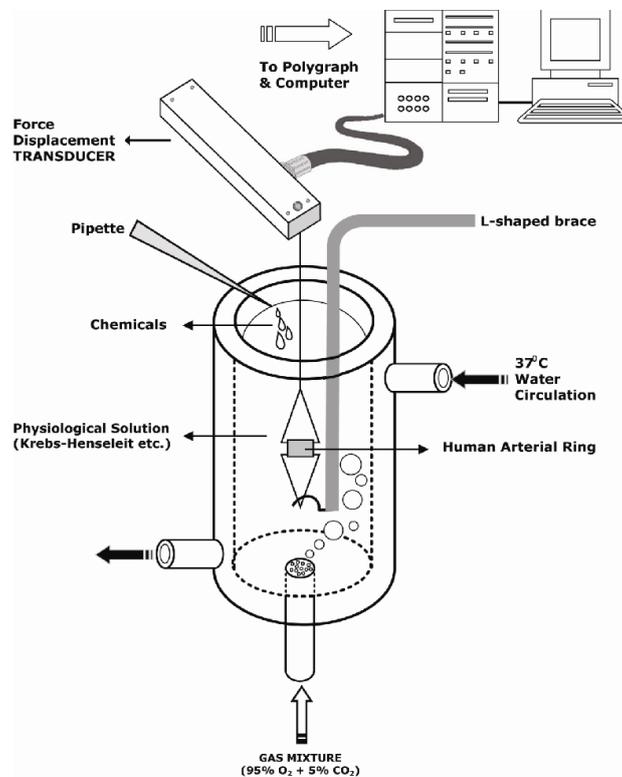
## **2.5. Evaluation de la dysfonction endothéliale par des tests de vasoréactivité aortique**

Lors du prélèvement le tissu adipeux périvasculaire était retiré, puis, l'aorte était coupée en anneaux d'environ 2 mm. Les anneaux étaient alors placés dans une cuve à organes contenant une solution de Krebs-Henseleit chauffée à 37 °C et bullée par du carbogène (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) assurant la stabilité du pH à 7,4 et une oxygénation suffisante. Dans la cuve à organes, les anneaux ont été montés entre deux crochets métalliques triangulaires, un fixe l'autre relié à un capteur de force isométrique EMKA (EMKA technologies, EMKA Paris, France). Le signal de la mesure était transmis à un amplificateur puis traité informatiquement par un logiciel d'acquisition (IOX, EMKA technologies Paris, France) (Figure 41). Une fois placés, une tension de 0,8 g était appliquée aux anneaux. Une période d'équilibration était alors réalisée durant 60 minutes avec un réajustement de la tension à 0,8 g à 15 et 45 minutes.

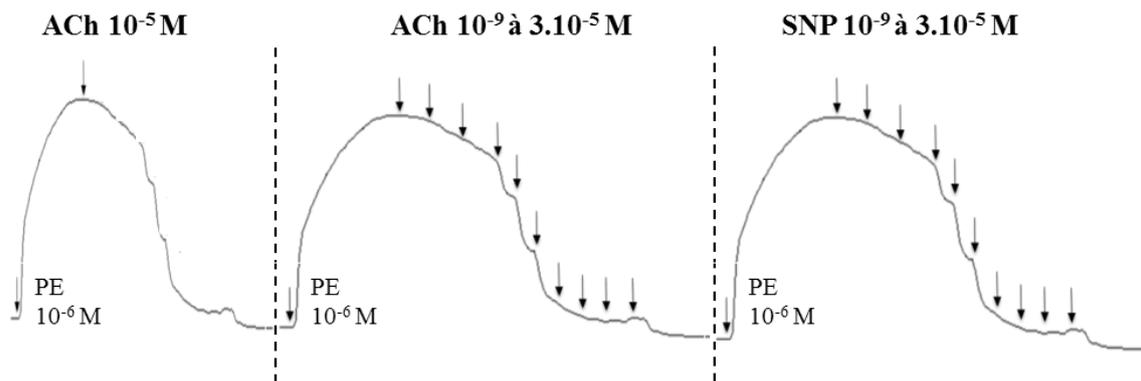
Après la période de stabilisation, un premier test était réalisé afin de vérifier l'intégrité de l'endothélium et que celui-ci n'avait pas été endommagé durant la dissection et le montage. Pour cela, les anneaux étaient contractés par une dose de phényléphrine (1 µM) puis relâchés par une dose d'acétylcholine (10 µM) (Figure 42).

Après 3 rincages de 5 min avec du Krebs-Henseleit, une dose réponse vasorelaxante à l'acétylcholine (1 nM à 30  $\mu$ M) était réalisée après avoir pré-contracté les anneaux à la phényléphrine (1  $\mu$ M) (Figure 42). La relaxation maximale ( $R_{max}$ ) et la sensibilité des anneaux à l'acétylcholine ( $DE_{50}$ ) ont été déterminées afin de caractériser la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium pour les différents groupes.

Les anneaux ont été de nouveau rincés 3 fois au Krebs-Henseleit puis pré-contractés à la phényléphrine (1  $\mu$ M) afin de réaliser une seconde dose réponse relaxante au nitroprussiate de sodium (1 nM à 30  $\mu$ M) (Figure 42). Ce dernier agit directement au niveau des CML et permet donc d'évaluer la relaxation vasculaire indépendante de l'endothélium.



**Figure 41** : Représentation du système de cuve à organe isolé (Oguzhan, 2013).



**Figure 42 :** Représentation du protocole de vasoréactivité.  
ACh : acétylcholine, SNP : Nitroprussiate de sodium, PE : phényléphrine

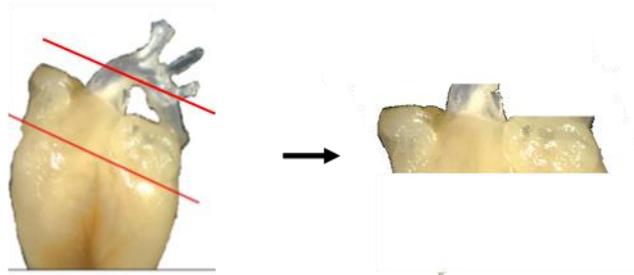
## 2.6. Mesure du développement des plaques d'athérome par coloration à l'Oil-Red-O

L'Oil-Red-O est utilisé pour visualiser les lipides en histologie. L'Oil-Red-O ( $C_{26}H_{24}N_4O$ ) est un colorant lysochrome (liposoluble) qui se lie de manière spécifique aux structures lipidiques permettant de visualiser les triglycérides neutres et les acides gras dans les tissus. Le lysochrome se déplace de la phase aqueuse dans laquelle il se trouve vers les lipides tissulaires par réaction physique (diffusion). Après une incubation, les lipides apparaissent en rouge vif.

Pour la préparation de la solution mère utilisée durant l'ensemble des mesures, 0,5 g d'Oil-Red-O (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) était dissout à chaud ( $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) dans 100 mL de propan-2-ol pendant 20 minutes. Chaque jour la solution de coloration était préparée en mélangeant par inversion 2 mL d'eau ultrapure avec 3 mL de la solution mère d'Oil-Red-O. La solution de coloration était alors filtrée grâce à du papier filtre Paperman ( $0,45\text{ }\mu\text{m}$ ). Après le prélèvement, les aortes étaient fixées dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 24 h à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Les aortes étaient ensuite plongées toute la nuit dans la solution de coloration à température ambiante, après avoir été rincées 3 fois dans une solution de Krebs-Henseleit. Pour finir, les aortes étaient incisées de façon longitudinale et photographiées sous loupe binoculaire (Motic Moticam 2300, Motic China group Co.) à l'aide du logiciel Motic Image 2.0 (Motic China group Co.). Le pourcentage du développement des plaques d'athérome était déterminé en réalisant le rapport des aires colorées en rouges sur l'aire totale de l'aorte en utilisant du logiciel image J<sup>®</sup> (Image J, NIH, USA).

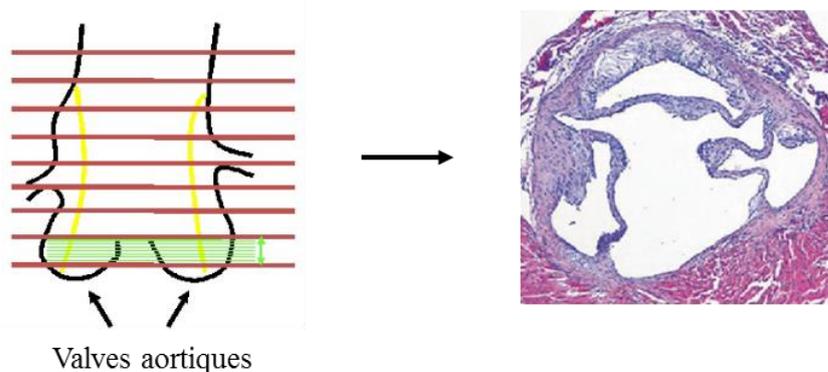
## 2.7. Caractérisation de la plaque d'athérome

Après le prélèvement du bloc cœur/aorte, avec l'aide d'un scalpel, le cœur était coupé à environ 3 mm de la base des ventricules (Figure 43). La partie supérieure du cœur, comprenant la racine aortique, était orientée de manière bien verticale vers le haut puis incluse dans un moule d'O.C.T. et rapidement congelée dans l'azote liquide et conservée à -80 °C.



**Figure 43 :** Représentation de la dissection du cœur/aorte avant l'inclusion dans l'O.C.T.

Les lames constituant les coupes histologiques de valves aortiques étaient réalisées sur cryostat (Leica CM1950, Leica systems, France). Les coupes aortiques ont été jetées avant d'atteindre le sinus aortique avec l'apparition des 3 valves aortiques (vérifié au microscope optique). Une fois bien orientées, les coupes étaient réalisées tous les 10  $\mu\text{m}$  avec une épaisseur de 8  $\mu\text{m}$ . Les coupes étaient réalisées jusqu'à la disparition des valves aortiques ou la réalisation de 50 lames (Figure 44). Les lames étaient ensuite conservées à -20 °C en attendant la réalisation des colorations.



**Figure 44 :** Représentation de la réalisation des coupes histologiques aux niveaux des valves aortiques.

Une même coloration été réalisée toutes les 10 lames (ex : 1, 10, 20, 30, 40) permettant de reconstruire une image en 3 dimensions de la plaque d'athérome. Deux colorations différentes ont été réalisées :

- **Coloration au Rouge Sirius** qui est un colorant acide hydrophile teintant en rouge les fibres de collagène et permettant d'évaluer la fibrose (indice de stabilité de la plaque d'athérome) au niveau de la chape fibreuse. Les lames étaient fixées par une incubation de 10 minutes dans une solution de paraformaldéhyde à 4% et rincées à l'eau ultra pure 3 fois pendant 5 minutes. Ensuite, les lames étaient placées dans un bain de rouge sirius (Labomoderne, Paris, France) pendant 15 minutes et rincées 2 fois rapidement 5 secondes dans une solution d'acide acétique à 10%. Pour finir, elles étaient déshydratées successivement dans des bains d'éthanol à 70° (1 minute), d'éthanol à 100° (3 fois une minute) et de xylène (3 fois 2 minutes) puis montées à l'Eukitt®.

- **Coloration Hématoxyline –éosine** qui est utilisée pour évaluer la taille de la plaque d'athérome et la taille du cœur nécrotique défini comme la zone acellulaire dans la plaque contenant les lipides. Les lames étaient incubées 10 minutes dans une solution de paraformaldéhyde à 4% puis rincées 3 fois 5 minutes à l'eau ultra pure. Une fois fixées, les lames étaient placées dans un bain d'éosine (Sigma-Aldrich) pendant 10 secondes puis rincées à l'eau. Les lames étaient ensuite colorées dans un bain d'hématéine (Sigma-Aldrich) filtrée pendant 15 minutes et rincées à l'eau puis déshydratées comme préalablement expliqué.

Pour finir, les lames étaient prises en photo grâce à une caméra numérique Baumer VCXU31C (Baumer SAS, France), possédant un objectif macro VS Technology 0513 (VS Technology Corporation, Japon), à l'aide du logiciel d'acquisition Baumer GAPI (Baumer SAS, France). L'analyse d'image des colorations a été réalisée grâce au logiciel image J® en mesurant l'aire en mm<sup>2</sup> des colorations ramenées au diamètre de l'aorte (taille de la plaque d'athérome et du cœur nécrotique) ou l'aire de la coloration à l'intérieur de la plaque sur l'aire totale de la plaque d'athérome en pourcentage (fibrose).

## 2.8. Analyses biochimiques

### 2.8.1. Préparation des échantillons et dosage des protéines

Les échantillons d'aortes conservées à -80 °C ont été broyés à l'aide d'un ultra-Turax® (IKA, T10 Basic) dans un tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM, pH 6,7, Sodium Dodécyl Sulfate (SDS, 1%), glycérol (10%)) à 4 °C contenant un inhibiteur de protéase (*Protease Inhibitor Cocktail*; Sigma Aldrich) et un inhibiteur de phosphatase (NaOV; Fisher Scientific). L'homogénat obtenu a ensuite été centrifugé à 17000 g pendant 15 min et à 4 °C. Le surnageant contenant les éléments cytosoliques a été conservé à -80 °C pour des analyses ultérieures.

L'évaluation de la quantité de protéines des échantillons a été réalisée via la méthode de dosage BCA (acide bicinchoninique) par l'intermédiaire d'un kit commercial (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Le principe de ce dosage repose sur la formation d'un complexe coloré, détectable à 562 nm, entre deux molécules d'acide bicinchoninique et des ions  $\text{Cu}^+$  provenant de la réduction des ions  $\text{Cu}^{2+}$  par les protéines en milieu alcalin. Pour cela, 100  $\mu\text{L}$  d'échantillon étaient incubés 30 minutes à 37 °C avec 2 mL de réactif BCA. La teneur en protéines de chaque échantillon a été mesurée par comparaison avec une gamme étalon de BSA (*Bovine Serum Albumin*) de concentration protéique de 0 à 2 mg/mL qui était préparée en parallèle.

### 2.8.2. Western Immunoblotting

La technique de *Western Immunoblotting* permet de déterminer le niveau d'expression d'une protéine d'intérêt dans un échantillon donné mais également certaines modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation.

Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse SDS-PAGE. Leur différence de charge est annihilée par le dodécylsulfate de sodium (SDS) présent dans le tampon d'extraction. Une solution de  $\beta$ -mercaptoéthanol (5%), permettant de dénaturer les protéines, ainsi que du bleu de bromophénol (0,2%), apportant une certaine densité à l'échantillon nécessaire à la migration, ont été ajoutés aux échantillons qui sont ensuite placés au bain marie à 95 °C pendant 5 minutes afin de dénaturer complètement les complexes

protéiques. Finalement, les échantillons ont été déposés sur le gel de polyacrylamide (7 à 12% suivant la protéine étudiée) en prenant soin de normaliser la quantité de protéines présente dans chacun des puits (entre 25 et 35 µg). Un marqueur de poids moléculaire était également déposé sur le gel (EZ-RUN™ Pre-Stained Rec Protein Ladder; Fisher Scientific).

Une fois la migration terminée, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF, Immobilion, Merck Millipore) à l'aide d'un appareil de transblot (Bio-Ras transfert apparatus, Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA). Après le transfert, les membranes ont été incubées sous-agitation, à température ambiante pendant 1 heure, dans une solution de blocage (lait 10% ou BSA 3%) préparé avec du TBS-T (Tris-Buffered saline, 0,05% Tween 20, pH=7,5), afin de saturer les sites non spécifiques. Une fois cette étape terminée, les membranes ont été rincées 3 fois pendant 5 minutes avec du TBS-T puis incubées toute une nuit (12 heures) sous agitation à 4 °C avec l'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Les anticorps primaires utilisés et leur facteur de dilution étaient : anti-eNOS (mouse, 1/1000, BD Biosciences), anti-eNOS-P<sup>Ser1177</sup> (mouse, 1/1000, BD Biosciences) et anti-glycéraldéhyde 3-phosphate (GAPDH) (rabbit, 1/5000, Santa Cruz Biotechnology).

Au terme de l'incubation avec l'anticorps primaire, les membranes ont été rincées avec du TBS-T 3 fois 5 minutes puis incubées pendant 1 heure sous agitation avec un anticorps secondaire (horse anti-mouse IgG, HRP linked antibody, Cell Signaling Technology) à température ambiante. Les membranes ont été rincées à nouveau (3 fois 5 minutes) puis immergées avec un réactif luminescent ECL (enhanced chemiluminescent, SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific) ou ECL+ (Luminata™ Forte Western HRP substrate, Millipore Corporation) qui au contact de l'enzyme HRP, contenu dans l'anticorps secondaire, produit une émission photonique. L'intensité de la réaction de la chimiluminescence était alors détectée sur un film radiographique, qui était ensuite scanné pour quantifier l'intensité du signal grâce au logiciel Image J®. Le niveau d'expression des protéines étudiées a été normalisé par le niveau d'expression de la GAPDH utilisée comme protéine de référence puisque son expression n'est pas altérée.

## 2.9. Profil lipidique sanguin

Le profil lipidique sanguin a été déterminé par mesure des teneurs plasmatiques en TG, en cholestérol total, en LDL-cholestérol, en HDL-cholestérol et en LDLox.

La teneur en TG a été déterminée avec le kit Triglycérides GPO-PAP (Biolabo SAS, France). Le principe de ce dosage repose sur la méthode de Fossati et Prencipe couplée à une réaction de Trinder. Brièvement, les TG étaient hydrolysés en glycérol par l'action d'une lipase puis en glycérol 3-phosphate par l'action de la glycérol kinase. Le glycérol 3-phosphate, en présence d'oxygène et par l'action de la GPO, formé une molécule de dihydroxyacétonephosphate et une molécule d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sous l'action d'une peroxydase, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîné la formation d'une quinoneimine entre la 4-amino-antipyrine et le 4-chlorophénol. L'absorbance du complexe coloré quinoneimine mesurée à 500 nm était proportionnelle à la concentration en TG qui était déterminée par comparaison avec une gamme étalon allant de 0,2 à 2 g/L.

Les teneurs plasmatiques en cholestérol des LDL et des HDL ont été déterminés via le kit enzymatique CHOD-PAP (Biolabo SAS, France). Après séparation des phases plasmatiques contenant les LDL et les HDL, la teneur en cholestérol total a été évaluée comme la somme des teneurs en cholestérol des LDL et des HDL. Brièvement, les esters de cholestérol sont hydrolysés en cholestérol libre par l'action de la cholestérol estérase. Le cholestérol était ensuite oxydé en cholest-4-èn-3-one par la cholestérol oxydase en présence d'oxygène avec production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sous l'action d'une peroxydase, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîné la formation d'une quinoneimine entre la 4-amino-antipyrine et le 4-chlorophénol, qui était mesurée à 500 nm. La quantité de cholestérol total était déterminée par comparaison avec une gamme étalon allant de 0,05 à 2 g/L.

La teneur en LDLox a été déterminée par une méthode immuno-enzymatique (Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for OxLDL, Cloud-clone, USA). Un échange par mail avec la société a permis de connaître la modification reconnue dans ce test ELISA (MDA-LDL). Brièvement, les échantillons étaient déposés dans une plaque préalablement pré-enduite avec un anticorps spécifique aux LDLox. Après une incubation à 37 °C et plusieurs lavages, une solution contenant un anticorps spécifique aux LDLox conjugué à la biotine et une solution contenant de la HPR (*Horseradish Peroxydase*) et un substrat (TMB ou 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) étaient ajoutées et incubées successivement. Après une dernière incubation à 37 °C pendant 30 min, la réaction était arrêtée par ajout d'acide sulfurique et

l'absorbance à 450 nm était mesurée. La concentration des LDLox a été déterminée par comparaison avec une gamme étalon allant de 0 à 2000 pg/mL.

## **2.10. Evaluation du stress oxydant par Résonance Paramagnétique Electronique**

Le niveau de production de stress oxydant (ERO) au niveau de l'aorte a été évalué par la technique de résonance paramagnétique électronique (RPE). Un électron non apparié sur les molécules radicalaires induit une propriété paramagnétique en présence d'un champ magnétique oscillant. Cette technique utilise deux champs magnétiques, le premier permet d'aligner les électrons suivant leur niveau d'énergie (haute et basse énergie), c'est l'effet Zeeman. Le second champ magnétique oscillant induit une transition de spin des espèces radicalaires entre les couches énergétiques électroniques provoquant ainsi leur résonance et générant des spectres RPE. Le spectre de résonance de RPE est caractérisé par le champ de résonance de l'échantillon (facteur  $g$ ), le nombre et position des raies. Le spectre est donc spécifique du composé évalué et son amplitude est proportionnelle à la concentration du radical évalué dans l'échantillon. Pour les tissus biologiques, la demi-vie très brève des radicaux libres rend leur détection difficile en RPE. Ceux-ci requiert donc une stabilisation au préalable. Cette stabilisation est réalisée par des piègeurs de radicaux libres : « les spin-trap » entraînant la formation d'un composé paramagnétiquement plus stable par liaison covalente avec une durée de vie plus longue, à savoir le spin-adduct (radicalaire), détectable en RPE par conservation de ses propriétés. L'amplitude des raies du spectre est alors proportionnelle au spin-adduct formé et donc à la concentration du radical évalué dans l'échantillon. Le spin trap spécifique de l'anion superoxyde utilisé pour cette évaluation est la 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tétraméthyl pyrrolidine ou CMH.

Brièvement, une solution à 1 mM de CMH dans un tampon Krebs-Hepes (pH=7,4) contenant 25  $\mu$ M de sel de chélation deferoxamine méthane-sulfonate a été préparée. Ensuite, 5  $\mu$ L de la solution de CMH et 50  $\mu$ L de l'échantillon (surnageant après broyage des aortes) ont été placés dans le capillaire RPE (Noxygen Science Transfer & Diagnostics, Germany). Pour finir, ce capillaire était placé dans la cavité du spectrophotomètre (e-scan spectromètre, Bruker Germany) pour l'acquisition des spectres. La méthode qui a été utilisée est identique à celle

décrite par Farah et al. (Farah et al., 2013). La production d'anion superoxyde exprimée en  $M \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de protéine, était normalisée à la concentration protéique de chaque échantillon.

## 2.11. Evaluation de l'accumulation du 4-HNE

L'accumulation du produit d'oxydation lipidique secondaire spécifique 4-HNE au niveau plasmatique et dans les fèces a été évaluée afin de valider l'hypothèse d'une oxydation lipidique induite lors de la digestion et suivie d'une absorption des produits d'oxydation lipidique.

- Au niveau sanguin : le 4-HNE sanguin était mesuré dans le plasma obtenu après centrifugation du sang. Brièvement, 70  $\mu\text{L}$  de plasma étaient mélangés avec 200  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile et 20  $\mu\text{L}$  de 4-HNE-D3 (50 ng/mL de méthanol, utilisé comme standard interne), pendant 5 minutes sous agitation. Ensuite, l'échantillon était centrifugé à 16000 g pendant 5 minutes à température ambiante puis séché sous azote jusqu'à l'obtention d'un volume résiduel de 20  $\mu\text{L}$ .

- Au niveau des fèces : les fèces ont été prélevées dans les 24 heures après le changement de nourriture en début, milieu et fin de régime. Une fois pesées, les fèces ont été broyées pendant 50 secondes à une fréquence de 30 Hz à l'aide d'un broyeur à bille (Reich 301). Le 4-HNE présent dans les fèces était ensuite extrait en ajoutant 500  $\mu\text{L}$  de méthanol contenant 50 ng/mL de 4-HNE-D3 suivi d'une agitation pendant 5 minutes. Après une centrifugation de 5 minute à 16000 g à température ambiante, le surnageant était récupéré puis séché sous azote jusqu'à l'obtention d'un volume résiduel de 20  $\mu\text{L}$ .

Pour finir, l'extrait était repris dans 50  $\mu\text{L}$  pour le plasma ou 200  $\mu\text{L}$  pour les fèces d'une solution de DNPH (2,5 mg/mL dans de l'acétonitrile acidifié) pour la réaction de dérivatisation puis les extraits étaient injectés en LC/MS/APCI (EVOQ triple quadrupole, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) avec une colonne ACQUITY HSS T3 (50 mm x 2,1 mm i.d., 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters). Les conditions de la chromatographie sont détaillées dans la section 1.4.1.6. Les conditions de spectrométrie de masse étaient les suivantes : courant d'ionisation 20  $\mu\text{A}$ , température du cône 300 °C, sonde chauffée à 300 °C, débit de gaz du cône : 20 psi, débit de gaz de la sonde : 20 psi, débit de gaz de nébulisation : 50 psi. Les spectres ont été enregistrés en mode MRM avec la détection du 4-HNE-D3 suivant la transition ion 338 en ion 167 (ion de quantification) et une énergie de collision de 13 eV au temps de rétention 3,5 minutes. Pour le

4-HNE, la transition suivie était : l'ion 335 en ion 167 avec une énergie de collision de 13 eV au temps de rétention de 3,5 minutes.

## **2.12. Analyses statistiques**

Tous les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM). L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad software, La Jolla Californie, USA). L'effet des différentes conditions expérimentales et leurs interactions ont été évalués par une analyse de la variance (ANOVA) à un ou plusieurs facteurs. En cas de significativité entre les différents facteurs, un test post-hoc PLSD de Fisher était réalisé. Pour la comparaison entre deux moyennes, le test *t* de Student pour des valeurs appariées était appliqué lorsque les conditions d'application étaient respectées (voir annexes). Pour l'ensemble des tests statistiques appliqués, le seuil de significativité était fixé à  $p < 0,05$ .



# **RESULTATS**

## Etude n°1

Lipid protection by polyphenol-rich apple matrices is modulated by  
pH and pepsin in *in vitro* gastric digestion.

---

La protection des lipides par des matrices de pomme riches en  
polyphénols est modulée par le pH et la pepsine au cours de la  
digestion gastrique *in vitro*.

Gaëtan Boléa, Christian Ginies, Marie-José Vallier, Claire Dufour

*(Soumis dans Food & Function)*

## **I. Etude n°1**

### **1. Contexte scientifique**

Le tractus gastrique a été proposé comme un site majeur du stress oxydatif post-prandial. L'ingestion d'un repas de type occidental caractérisé par sa richesse AGPI n-6, sensibles à l'oxydation induite par le fer héminique apporté par la viande rouge dans le tractus gastro-intestinal, est à l'origine de la formation de 4-HNE, un aldéhyde génotoxique et cytotoxique spécifique des AGPI n-6. L'incorporation de produits d'oxydation tels que le 4-HNE dans des lipoprotéines de basse densité (LDLox) est en outre corrélée au dysfonctionnement endothélial après absorption intestinale. A l'opposé, le tractus gastrique est également le lieu d'activité antioxydante des micronutriments d'origine végétale. En effet, des méta-analyses ont à plusieurs reprises indiqué une relation inverse entre une maladie coronarienne ou un accident vasculaire cérébral et la consommation de fruits et légumes. Lors d'essais contrôlés récents portant sur des fruits et légumes riches en flavonoïdes comme la pomme (comprenant 80% de PCs), la fonction vasculaire s'est améliorée, de même que le statut plasmatique du NO et les marqueurs liés à l'inflammation. La bioaccessibilité des polyphénols semble être modulée par la matrice végétale, la transformation des aliments et les composants de l'alimentation et des bolus. La forte affinité entre les polyphénols et les protéines ou les fibres alimentaires s'est révélée être le principal facteur affectant la bioaccessibilité *in vivo* des polyphénols dans le tractus gastrique.

### **2. Objectif**

**L'objectif de cette première étude sera d'évaluer l'oxydation lipidique d'origine alimentaire initiée par la méthyoglobine et son inhibition par les polyphénols de différentes matrices pomme (fruits frais, purée, extrait phénolique) dans des conditions de digestion gastrique *in vitro*. Au cours du processus de digestion gastrique *in vitro*, les facteurs pH et pepsine qui peuvent moduler l'oxydation lipidique ainsi que la capacité antioxydante des polyphénols de pomme ont été étudiés en détail.**

### 3. Résumé

*Méthodologie.* Dans cette étude, nous avons simulé l'état physique des lipides lors d'un repas de type occidental par une émulsion d'huile de tournesol dans l'eau à 10%. Ces émulsions ont été placées à différents pH (pH 5 pour le début de la digestion ou pH 3 pour le milieu de digestion) en présence ou non de pepsine (0,25 mg/mL) et supplémenté ou non avec les différentes matrices de pomme (100 µM éqv. polyphénols pour les matrices extrait phénolique et purée et 133 µM pour le fruit frais). Au cours de la simulation de digestion gastrique, le taux d'oxydation lipidique, la forme de l'initiateur de l'oxydation ainsi que la bioaccessibilité des polyphénols ont été évalués.

*Résultats majeurs.* Ce travail a permis de mettre en évidence une oxydation lipidique accélérée par la pepsine à pH 5 par la formation d'une forme de micro-méthyoglobine partiellement protéolysée présentant probablement un meilleur accès aux lipides. Les études spectroscopiques ont en outre mis en évidence la présence d'une forme de méthyoglobine dépliée de manière réversible à pH 3, qui s'avère plus pro-oxydante en l'absence de pepsine. En présence de pepsine et à pH 3, la forme du pro-oxydant pourrait être l'hématine comme le suggère un taux d'oxydation lipidique fortement réduit probablement dû à l'interaction entre hématine pepsine. Sur le plan nutritionnel, les trois matrices de pomme inhibaient moins efficacement l'accumulation de diènes conjugués et de 4-HNE à pH 5 en présence de pepsine, alors que, à pH 3, c'était l'inverse. Des bioaccessibilités initiales élevées des composés phénoliques monomériques ont été mises en évidence à la fois pour la purée (57-74%) et l'extrait phénolique (79-96%) par rapport aux pommes fraîches (1-14%), en accord avec leur plus grand pouvoir antioxydant. En revanche, la bioaccessibilité du dimère B2 était faible pour toutes les matrices, suggérant une liaison non covalente aux pectines de pomme ou aux protéines présentes dans l'émulsion. **Cette première étude a permis de mettre en évidence la complexité des interactions intervenant dans l'apparition des produits d'oxydation lipidiques (diènes conjugués et 4-HNE) au cours de la digestion gastrique. Néanmoins, la consommation de fruits riches en PCs pourrait avoir des effets bénéfiques sur la santé directement dans le tractus gastrique en limitant la formation de produits d'oxydation lipidique nocifs et absorbables.**

**Lipid protection by polyphenol-rich apple matrices is modulated by pH and pepsin in  
*in vitro* gastric digestion.**

G BOLEA<sup>1,2</sup>, C GINIES<sup>1</sup>, MJ VALLIER<sup>1</sup>, C DUFOUR<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UMR408 SQPOV “Safety and Quality of Plant Products”, INRA, University of Avignon,  
F-84000 Avignon, France.

<sup>2</sup>EA4278 LaPEC “Laboratory of Cardiovascular Pharm-ecology “, University of Avignon,  
F-84000 Avignon, France.

**Corresponding author**

C. DUFOUR

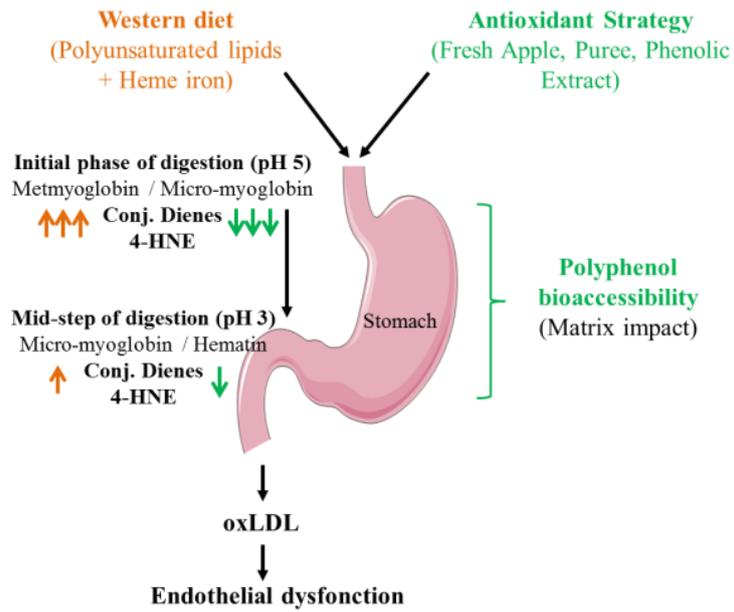
INRA, UMR408 SQPOV, 228 route de l'aérodrome, CS 40509 - 84914 Avignon Cedex 9

Phone: (+ 33) 4 32 72 25 15 /Fax: (+ 33) 4 32 72 24 92

E-mail: [claire.dufour@inra.fr](mailto:claire.dufour@inra.fr)

## Abstract

Lipid oxidation takes place in the gastric tract after the ingestion of a Western diet rich in n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) and red meat (heme iron). The incorporation of oxidation products such as 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) into low-density lipoproteins is further correlated to endothelial dysfunction. Gastric postprandial stress could thus be reduced by antioxidant phytonutrients. The aim of this study was to investigate dietary lipid oxidation and its inhibition by apple polyphenols under different matrix forms (fresh fruit, puree, extract) in *in vitro* gastric digestion conditions. A deep insight was given into the two factors pH and pepsin governing the metmyoglobin-initiated lipid oxidation of sunflower oil-in-water emulsions simulating the physical state of dietary lipids. Our results first showed that pepsin accelerated lipid oxidation at pH 5 through the formation of a micro-metmyoglobin form likely displaying a higher accessibility to lipids. Spectroscopic studies further highlighted the formation of a reversible unfolded metmyoglobin form at pH 3 which was shown to be more pro-oxidant in the absence of pepsin. At nutritional levels, the three apple matrices inhibited less efficiently the accumulation of lipid-derived conjugated dienes and 4-HNE at pH 5 when pepsin was present whereas at pH 3 the opposite was true. High initial bioaccessibilities of monomeric phenolic compounds were evidenced for both puree (57-74%) and the phenolic extract (79-96%) compared to fresh apple (1-14%) supporting their greater antioxidant capacity. By contrast, the bioaccessibility of dimer B2 was low for all matrices suggesting non-covalent binding to apple pectins.



**Keywords:** heme iron, lipid oxidation, 4-hydroxy-2-nonenal, antioxidant, apple, procyanidins.

## INTRODUCTION

The gastric tract has been proposed as a major site for diet-related oxidative stress and antioxidant activity of plant micronutrients (Gobert et al., 2014; Kanner and Lapidot, 2001). The Western diet brings elevated levels of n-6 polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA) which are markedly prone to oxidation. Indeed, the heme iron-initiated oxidation of oil-in water emulsions used to simulate the physical state of dietary lipids in gastric digestion has resulted in the production of lipid-derived conjugated dienes and short-chain aldehydes and alcohols (Lorrain et al., 2010; Lorrain et al., 2012). The ingestion of a Western type meal by minipigs further led to accumulating levels of TBARS in the gastric tract (Gobert et al., 2014). Lipid oxidation products are readily absorbed in the gastrointestinal tract (GIT) and incorporated into chylomicrons and then LDL as shown for humans, pigs and rats (Grootveld et al., 1998; Staprans et al., 1994; Suomela et al., 2005). Among lipid oxidation products, 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) is a genotoxic and cytotoxic  $\alpha,\beta$ -unsaturated hydroxyalkenal specifically generated from n-6 PUFA. 4-HNE administered to rats proved to be absorbable and largely metabolized as shown by the identification of 22 urinary metabolites (Keller et al., 2015). 4-HNE contributes to the atherogenicity of oxidized LDL (oxLDL) by forming 4-HNE-apoB adducts that deviate the LDL metabolism to the scavenger receptor pathway of macrophagic cells then leading to the formation of foam cells. oxLDL has been clearly identified as a risk factor for the endothelial function and a key step in the atheromatous plaque formation (Gargiulo et al., 2017; Staprans et al., 2005). Additionally, 4-HNE is more effective at modifying the affinity for the apoB receptor than smaller aldehydes like MDA (Negre-Salvayre et al., 2017).

On the other hand, meta-analyses have repeatedly indicated an inverse relationship between coronary artery disease or stroke and the consumption of fruit and vegetables (F&V) (Aune et al., 2017; He et al., 2006; Zhan et al., 2017). In recent controlled trials with apple, cocoa or other

flavonoid-rich F&V, the vascular function was improved along with the plasma NO status and inflammation-related markers (Hooper et al., 2012; Macready et al., 2014; Medina-Remon et al., 2017). Monomeric and oligomeric procyanidins appear as potential mediators in reducing blood pressure and improving endothelium mediated-dilation (Kay et al., 2012; Mangels and Mohler, 2017; Sansone et al., 2015). When their circulating metabolites were shown to reduce monocyte adhesion to endothelial cells through modulation of gene expression and TNF- $\alpha$  (Claude et al., 2014; Lee et al., 2017). Procyanidins represent the second polyphenol group in the French diet although this class is largely underestimated due to uncomplete extractability (Arranz et al., 2010; Perez-Jimenez et al., 2011). Apple is the major contributor to this class and its phenolic content can vary by a 5-fold factor depending upon apple variety and growth conditions (Andre et al., 2012; Ceymann et al., 2012; Wojdylo et al., 2008). Monomeric and oligomeric proacyanidins represent more than 80% of apple phenolic compounds followed by hydroxycinnamic acids, flavonols, dihydrochalcones and anthocyanins in decreasing order. After ingestion, native form of polyphenols may be released in the chyme. The bioaccessibility of polyphenols appears to be modulated by the vegetable matrix, food processing, and constituents from both the diet and bolus. The strong affinity between polyphenols and either dietary proteins or fibers was found to be the main factor affecting polyphenol *in vivo* bioaccessibility in the gastric tract (Alminger et al., 2014; Dufour et al., 2018). During gastric digestion, partial proteolysis and lipolysis take place under the action of pepsin and gastric lipase, respectively (Minekus et al., 2014). In addition, gastric pH sharply increases to values between 5 and 7 after meal intake before slowly returning to a basal pH close to 2 after gastric emptying (Sams et al., 2016; Tyssandier et al., 2003). The aim of this study is to evaluate the effect of pH and pepsin on the antioxidant capacity and bioaccessibility of apple polyphenols under different matrix forms in the *in vitro* digestion of an oil-in-water emulsion added with heme iron and simulating a Western type diet.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and Solvents

*Chemicals:* Horse heart myoglobin (M1882-type II), porcine hematin (hydroxyprotoporphyrin IX), egg yolk L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (P3556) (PL), porcine pepsin (P6887, 2828 U/mg), 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), and ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocopherol were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Polyphenol standards, (-)-epicatechin, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, and phloridzin dihydrate were from Sigma-Aldrich. Analysis of the PL showed the presence of phosphatidylcholine (33%), phosphatidylethanolamine (13%), sphingomyelin (3%), phosphatidylinositol (2%), and lysophosphatidylcholine (2%) along with a neutral fraction containing triacylglycerols (47%). Isoquercitrin was purchased from Extrasynthèse (Genay, France) and 4-hydroxy-2-nonenal from Bertin Pharma (Montigny le Bretonneux, France).

*Solvents:* HPLC-MS grade methanol, acetonitrile, acetone, hexane, toluene, 2-propanol were from Fisher Scientific (Illkirch, France), formic acid from Merck (Darmstadt, Germany), and hydrochloric acid from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Ultrapure water (resistivity 18.2 M $\Omega$ .cm<sup>-1</sup> at 25 °C) was obtained with a Millipore OPak 2 (Bedford, MA, USA).

### Characterization of sunflower oil

To determine the fatty acid composition of sunflower oil (Rustica from Leclerc, lot A21815), 15 mg of oil were solubilized in 200  $\mu$ L of toluene before transesterification at 100 °C during 1 h by addition of 2 mL of sulfuric acid/methanol (0.09/0.91, v/v). Then, 2 mL of water and 2 mL of hexane were added and homogenized before injection of 1  $\mu$ L of the organic phase onto a gas-chromatograph equipped with a flame ionization detector (Clarus 500 GC, Perkin Elmer) using a DB-225ms column (thickness 0.25  $\mu$ m, height 0.25  $\mu$ m, length 30 m, Agilent).

Chromatographic conditions were as follows: carrier gas was H<sub>2</sub> at 37 cm/s, injection temperature was 250 °C in the split mode (ratio 20), oven temperature was held at 60 °C for 1 minute and then ramped up at 20 °C/min to 180 °C and then at 3 °C/min to 230 °C. Fatty acid identification was made by comparing the retention time of FAME peaks from samples with standard solutions (FAMEs 37, Supelco). The results are expressed in relative percentage of each fatty acid, calculated by internal normalization of the chromatographic peak area. This sunflower oil contained 9.8% of saturated fatty acids (6.3% C16; 3.3% C18; 0.2% C20), 27.8% of monounsaturated fatty acids (0.1% C16:1; 27.0% C18:1n-9; 0.6% C18:1n-7; 0.1% C20:1) and 62.4% of polyunsaturated fatty acids (62.4% C18:2; 0.01% C18:3).  $\alpha$ -Tocopherol amounted to 665 ppm.

### **Preparation of the different apple matrices**

Fresh apples (*Reinette de Flandre*) were collected from an organic orchard in Northern France in autumn 2015. Apples were stored in a cold room at 4 °C before use.

The apple puree was obtained by first cutting the fresh apples into 12 pieces with concomitant removal of the core (skin preserved). The apple pieces were further halved for puree preparation or quick-freezing followed by freeze drying for extraction. The apple pieces (2396 g) dispersed in 550 mL of water were rapidly cooked in a saucepan to avoid oxidation on an induction cooker set at 2000 W and 120 °C during 20 min keeping the temperature at the heart of the puree at 80 °C. After cooking, the puree was homogenized in a blender for 5 seconds. The puree was poured into 250 g-jam jars before thermal treatment in an autoclave at 100 °C for 20 min. The jars were stored at 4 °C until use. The apple polyphenol extract was obtained by extraction of the homogenized freeze-dried apple powder (200 g by blender) by hexane (600 mL) once followed by acetone/water (60/40, v/v, 1.3 L) three times under magnetic

stirring during 15 min at room temperature. Between each extraction, the apple powder was filtered on Whatman filter paper (grade 40) using a vacuum pump. The pooled acetone/water phases containing polyphenols were concentrated on a rotary evaporator prior to freeze-drying. The phenolic extract containing soluble sugars was stored at -20 °C before use.

### **Qualitative analyses of apple phenolic compounds by UPLC/DAD/ESI-MS**

Separation and identification of apple phenolic compounds were performed by using a Waters ACQUITY UPLC chromatograph (Milford, MA) coupled to an UV-vis diode-array detector and a HTC ultra ion trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an electrospray ionization source. Separation was carried out using a reverse-phase Acquity BEH C18 column (100 mm x 2.4 mm i.d., 1.7 µm; Waters) at 35 °C. The mobile phase was constituted by a binary solvent system with water/formic acid (99.95/0.05, v/v, solvent A) and acetonitrile (solvent B) at a flow rate of 0.4 mL/min. The elution gradient was as follows: 0-3 min isocratic 3% B; 3-7 min, linear 3-6% B; 7-13 min, linear 6-10% B; 13-20 min, linear 10-30% B; 20-22 min, linear 30-100% B; 22-23 min, isocratic 100% B; 23-23.5, linear 100-3% B; 23.5-25 min, isocratic 3% B. The volume injected was 2 µL of aqueous solutions of freeze-dried apple (10 mg/mL). Mass detection was conducted in the negative ionization mode from  $m/z$  100 to 1400. Mass spectrometry conditions were as follows: capillary voltage of 4 kV, nitrogen flow rate at 12 L/min, desolvation temperature at 365 °C and nebulization pressure at 60 psi.

### **Analysis of procyanidins by thioacidolysis and polyphenol quantification**

Quantification of (+)-catechin, (-)-epicatechin, phloretin glycosides, quercetin glycosides was performed before thioacidolysis as follows. Freeze-dried apple matrices (50 mg) were

dissolved in 800  $\mu\text{L}$  of anhydrous methanol and 400  $\mu\text{L}$  of 1% acetic acid in anhydrous methanol. Extraction was conducted at 40  $^{\circ}\text{C}$  during 18 min in an ultrasound bath with vortexing every 5 min. The supernatant was filtered at 0.45  $\mu\text{m}$  before injection onto an Ultra Fast LC Prominence system (Shimadzu, Kyoto, Japan). Separation conditions were as in (Le Bourvellec et al., 2011). (+)-catechin, (-)-epicatechin, quercetin and phloridzin were used as standards and response factors were obtained from 6 independent 40 mg/L solutions. Procyanidin analysis was achieved after thioacidolysis. For this, freeze-dried apple matrices (50 mg) were dissolved in 800  $\mu\text{L}$  of a 5% solution of toluene- $\alpha$ -thiol in anhydrous methanol then added with 400  $\mu\text{L}$  of 0.4 N HCl in anhydrous methanol. The reaction was conducted as above (no ultrasound) during 30 min before cooling on ice, filtration and injection. 5-Caffeoylquinic acid and 4-*p*-coumaroylquinic acid were more accurately quantified as their methylated derivatives in the thiolysis experiment at 320 nm using 5-caffeoylquinic acid and *p*-coumaric acid as standards. Epicatechin benzylthioether was expressed as epicatechin at 280 nm. Procyanidins were characterized by their subunit composition and average degree of polymerization (mDP). The mDP was calculated as the molar ratio of all the flavanol units (thioether adducts plus terminal units) to (-)-epicatechin and (+)-catechin corresponding to terminal units. Analyses were run in triplicate for each matrix.

### **Preparation of gastric model emulsions**

The physical state of the gastric content was modeled by 10% oil-in-water emulsions stabilized by egg yolk phospholipids (PL). In a 60 mL short-necked glass bottle, 100 mg of PL were dispersed in 36 mL of either acetate-phosphate buffer at pH 3 (10 mM citric acid and 20 mM sodium hydrogenphosphate) or an acetate buffer at pH 5 (10 mM) using a rotor stator homogenizer (SilentCrusher M-01, Heidolph) at 24000 rpm for 2 min at room temperature.

Then, 4 g of sunflower oil were added and the biphasic mixture was homogenized again at 24000 rpm for 2 min. The resulting emulsion was sonicated for 8 periods of 30 s with a rest interval of 30 s and an amplitude of 40% on ice (Q700, QSonica, 20 kHz). For the study of lipid oxidation, 13.5 mL (13.35 mL in the presence of pepsin) of the fine emulsion were transferred in a 50 mL round-bottom flask. Pepsin was diluted in the appropriate buffer at a concentration of 25 mg/mL prior to use. When needed, 150  $\mu$ L of pepsin were added to the emulsion to obtain final concentrations of 0.0625, 0.25, and 1 mg/mL (2828 U/mg, pepsin activity measured as in Minekus et al., 2014). For antioxidant evaluation, 150  $\mu$ L of a 10 mM (-)-epicatechin solution in methanol were added to the emulsion (100  $\mu$ M final) or replaced by 150  $\mu$ L of methanol in control experiments. For the phenolic extract, 111 mg of the dry extract were first solubilized in 1 mL of the appropriate buffer (10 mM in total phenolic compounds) before the addition of 150  $\mu$ L to the emulsion. Puree (125 mg) was directly added in the emulsion to reach 100  $\mu$ M final in phenolic compounds. Mastication of fresh apple as in the oral phase was obtained by grinding during 3 seconds 60 g of 2 apples freshly cut in 24 pieces as described above in a domestic grinder (Valentin, Seb) in the presence of the appropriate buffer (30 g). A final concentration of 133  $\mu$ M in phenolic compounds was obtained by adding 215 mg of this mixture to the emulsion. Lipid oxidation was next initiated by adding 1.5 mL of a 200  $\mu$ M solution of metmyoglobin (MbFe<sup>III</sup>) ( $\epsilon = 7700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 525 nm) (Mikkelsen and Skibsted, 1995) prepared in ultrapure water leading to a 20  $\mu$ M final concentration. Round-bottom flasks were protected by punched parafilm and incubated in an oven at 37 °C under constant magnetic agitation at 280 rpm. All the experiments were run at least in triplicate.

### **Measurement of lipid-derived conjugated dienes**

Every hour, emulsion samples (200  $\mu$ L) were diluted in 2-propanol (1000  $\mu$ L) before centrifugation (5 min at 16200 g, 4 °C). After further dilution of the supernatant (200, 100 or

50  $\mu\text{L}$ ) in *i*PrOH (2 mL), the concentration in conjugated dienes (CD) was determined by measuring the absorbance at 234 nm (HP 8453 diode-array spectrometer; optical path length 1 cm). The molar absorption coefficient used for conjugated linoleyl hydroperoxides was 27000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (Pryor and Castle, 1984).

### **Measurement of 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)**

Emulsion samples (200  $\mu\text{L}$ ) were diluted in 2-propanol (400  $\mu\text{L}$ ) before centrifugation (5 min at 16200 *g*, 4 °C) and stored at -20 °C until analysis of 4-HNE, (-)-epicatechin and  $\alpha$ -tocopherol. Derivatization with DNPH was conducted as follows: equal volumes (400  $\mu\text{L}$ ) of the reagent (50 mg DNPH in 20 mL of acetonitrile and 0.4 mL of formic acid) and the supernatant were mixed in a 1.5 mL HPLC vial and incubated for 1 h at room temperature under stirring. Separation and quantification of derivatized 4-HNE was performed by using the UPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup> system described above for apple phenolics with the same column at 40 °C. For chromatographic separation, the mobile phase was constituted by a binary solvent system with water/formic acid (99.95/0.05, v/v, solvent A) and acetonitrile (solvent B) at the flow rate of 0.4 mL/min. The volume injected was 2  $\mu\text{L}$ . The elution gradient was as follows: 0-1 min isocratic 50% B; 1-9 min, linear 50-98% B; 9-10 min, isocratic 98% B; 10-10.1 min, linear 98-50% B and 10.1-11 min, isocratic 50% B. MS conditions were: capillary voltage of 4 kV, end plate offset -500 V, dry gas flow rate at 12 L/min; desolvation temperature at 360 °C and nebulization pressure at 55 psi. Quantification was performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. Quantification was based on the transition between parent ion at *m/z* 335 and fragment ion at *m/z* 167 (retention time 3.96 min) for derivatized 4-HNE. Five point-calibrations (1.02  $\mu\text{M}$  to 0.064  $\mu\text{M}$ ) were run with 4-HNE diluted in acetonitrile and reacted with DNPH as described above. The stability of the adduct between DNPH and 4-HNE was

evaluated by injection of the same sample every hour during 6 hours. The variation was less than 5% (data not shown). All analyses were run in triplicate.

### **Analyses of $\alpha$ -tocopherol and (-)-epicatechin**

Separation and quantification were performed by using an ACQUITY UPLC system coupled to a DAD and a fluorescence detector (Waters, Milford, MA). Separation was carried out using an Acquity BEH C18 column (50 mm x 2,1 mm i.d., 1.7  $\mu$ m; Waters) at 35 °C. Mobile phase was constituted by a binary solvent system with water/formic acid (99.95/0.05, v/v, solvent A) and methanol (solvent B) at a flow rate of 0.2 mL/min. The volume injected was 2  $\mu$ L. The elution gradient was as follows: 0-5 min, linear 5-60% B; 5-6.5 min, linear 60-100% B; 6.5-11.5 min, isocratic 100% B; 11.5-12 min, linear 100-5% B and 12-16 min, isocratic 5% B. (-)-Epicatechin was detected by absorption at 280 nm,  $\alpha$ -tocopherol by fluorometry (excitation 290 nm; emission 330 nm) and both were quantified after calibration with the appropriate standards.

### **Determination of polyphenol bioaccessibility**

Polyphenol bioaccessibility was determined as the content in free phenolic compounds in the aqueous phase of the emulsions at the beginning of the simulated gastric digestion. A 500  $\mu$ L aliquot of the emulsion was centrifuged at 16000 g for 5 min at 4 °C. The aqueous phase was removed via syringe, filtered (Phenex RC 0.45  $\mu$ m) and stored at -20 °C until analysis of the phenolic compounds as described above. For quantification, 5 point-calibrations were run in UPLC/DAD/MS with phenolic standards in methanol. Monomeric and dimeric procyanidins were quantified as epicatechin equiv. (280 nm); chlorogenic acid at 320 nm; *p*-coumaroyl derivatives as *p*-coumaric acid equiv. (320 nm); dihydrochalcones as phloridzin equiv. (280 nm) and flavonols as isoquercitrin equiv. (350 nm).

### **Impact of pH, pepsin and (-)-epicatechin on the stability of metmyoglobin**

The impact of pH on the stability of metmyoglobin was investigated using UV-vis spectroscopy in the kinetic mode with spectral recording every 30 s (HP 8453 diode-array spectrometer with optical path length 1 cm). In 1950  $\mu\text{L}$  of a 10 mM citrate / 20 mM phosphate buffer at pH 7 placed in a quartz cell were added 50  $\mu\text{L}$  of 200  $\mu\text{M}$  metmyoglobin prepared in the same buffer (5  $\mu\text{M}$  final). A Mettler Toledo microelectrode was introduced in the solution at a corner of the cell. After warming at 37 °C under stirring, acidification was conducted from pH 7 to 3 by stepwise addition of small volumes of 1 N HCl (0.8-10  $\mu\text{L}$ ). When pH was at 3 for 6 or 30 min, incremental volumes of 1 N NaOH were added to increase pH to 6.25. Stability was reached at 400 nm (Soret band) before the next HCl or NaOH addition. Measured pH values at 37 °C were lower by 0.05 pH unit from values at 25 °C.

To evaluate the effect of pepsin and (-)-epicatechin on the metmyoglobin stability, pepsin (0.0625 mg/mL final in phosphate buffer) in the absence or presence of (-)-epicatechin (25  $\mu\text{M}$  final, 15.3  $\mu\text{L}$  of a 3.33 mM solution in MeOH) was added to 5  $\mu\text{M}$  MbFe<sup>III</sup> in the appropriate buffer at different pH (5, 4.75, 4.5, and 4.25). All experiments were run under constant magnetic stirring at 1200 rpm and at 37 °C.

### **Statistical Analyses**

All the results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to test the effect of variation factors. If significant effects were found at a 95% confidence level, ANOVA was followed by a Tukey-Kramer post hoc test to identify differences among groups (XLStat software, version 2013, Addinsoft SARL, Paris, France).

## RESULTS

### Characterization of the different apple matrices

A total of 46 compounds was identified by UPLC/DAD/ESI-MS (Suppl. Table 1) and found to belong to the main four phenolic classes usually present in dessert apples: flavan-3-ols, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and flavonols. The quantification of the major compounds, including oligomeric procyanidins with the use of thioacidolysis, points to a rather similar distribution for all three matrices (Table 1). Monomeric and oligomeric procyanidins account for 5-7% and 70% of all the phenolic compounds, respectively. Only epicatechin was identified as extension units in oligomeric procyanidins whereas both catechin and epicatechin appeared as terminal units. This constitution and a relatively low mean degree of polymerization (mDP = 5) are classically observed in dessert apple (Guyot et al., 2002). The UPLC separation conducted on the apple matrix allowed the identification of various B-type oligomers up to heptamers. Hydroxycinnamic acids, the second most abundant class, are represented by 5-caffeoylquinic acid (19-20%) and 4-*p*-coumaroylquinic acid as a minor compound (0.5-0.8%). 5-*p*-Coumaroylquinic acid was also found in half the amount compared to 4-*p*-coumaroylquinic acid (data not shown). Dihydrochalcones were present as phloretin-2'-O-glucoside (1.8-2.3%) and phloretin-2'-O-xyloglucoside (0.6-0.9%). Flavonols, constituted mainly by quercetin monohexosides, were weak contributors (1.4-1.9%). This composition is in agreement with the average composition for dessert apples and location of flavonols in apple skin only (Le Bourvellec et al., 2011). Additionally, the occurrence of taxifolin hexoside (**10**) and cinchonains I, II, and III (**5**, **32**, **40**) was demonstrated for the first time in an apple genotype. Moreover, the total polyphenol content was markedly high for the cultivar *Reinette de Flandre* used in this study (4.3 g per kg FM) compared to Golden, Braeburn, and Granny Smith (1 g max per kg) (Guyot et al., 2002) and is closer to contents evidenced in cider apple (Sanoner et al., 199).

**Table 1.** Relative composition (% weight) for main phenolic compounds and classes, characterization of flavan-3-ols and overall polyphenol content for the different apple matrices.

Matrix	Monomeric procyanidins		Oligomeric procyanidins	mDP	Procyanidin characterization				Hydroxycinnamic acids		Dihydrochalcones		Flavonols	Overall content in g/kg (mmol/kg)
	CAT	EPI			Term. units (%)		Ext. units (%)		5-CQ	4-pCou	Phln	Phlx		
					CAT	EPI	CAT	EPI						
<b>Fresh Apple</b>	1.2 ± 0.2	5.6 ± 0.2	70.0 ± 2.2	5.4 ± 0.1	2.6 ± 0.4	8.0 ± 0.2	-	89.4 ± 0.6	18.9 ± 1.0	0.52 ± 0.01	1.8 ± 0.4	0.75 ± 0.03	1.4 ± 0.1	4.31 ± 0.1 (14.2 ± 0.4)
<b>Puree</b>	1.2 ± 0.2	3.8 ± 0.6	70.6 ± 4.1	5.3 ± 0.2	1.9 ± 0.3	11.1 ± 0.9	-	86.9 ± 1.2	18.8 ± 0.4	0.66 ± 0.01	2.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	3.75 ± 0.1 (12.2 ± 0.5)
<b>Phenolic extract</b>	0.43 ± 0.04	4.3 ± 0.4	70.2 ± 3.3	4.7 ± 0.1	3.7 ± 0.1	12.5 ± 0.3	-	83.7 ± 0.3	19.8 ± 0.7	0.76 ± 0.03	2.3 ± 0.2	0.55 ± 0.05	1.7 ± 0.2	27.2 ± 1.2 (88.9 ± 4.0)

CAT: (+)-catechin, EPI: (-)-epicatechin, flavonols in equivalent quercetin, mDP: mean degree of polymerization of monomeric and oligomeric procyanidins, 5-CQ: 5-caffeoylquinic acid, 4-pCou: 4-*p*-coumaroylquinic acid, Phln: Phloretin-2'-O-glucoside, Phlx: Phloretin-2'-O-xyloglucoside. Term. units: Terminal units, Ext. units: Extension units. Overall content in g or mmol/kg FM for apple fruit and puree and in g or mmol/kg DM for the extract. Values represent Mean ± SD (*n* = 3).

## **Impact of pH, pepsin and apple matrices on lipid peroxidation**

Metmyoglobin-initiated lipid oxidation of 10% oil-in-water emulsions stabilized by egg yolk phospholipids was investigated at pH 5 and pH 3 in the absence and presence of pepsin. An insight was then given into the antioxidant capacity of different apple matrices with polyphenol concentration higher for fresh apple (133  $\mu\text{M}$  total polyphenols) than for puree or phenolic extract (100  $\mu\text{M}$ ) to account for an expected lower bioaccessibility. Apple matrices were also compared with epicatechin (100  $\mu\text{M}$ ), the main constitutive unit of monomeric and oligomeric procyanidins.

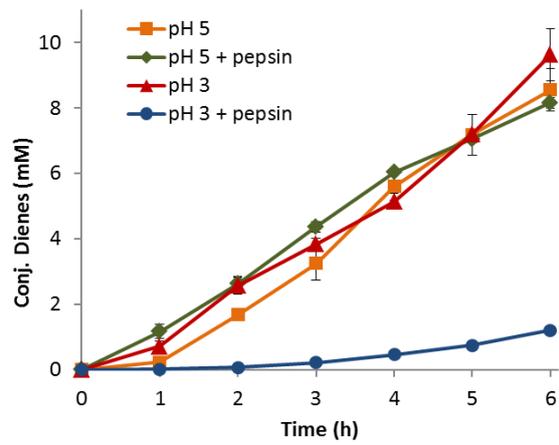
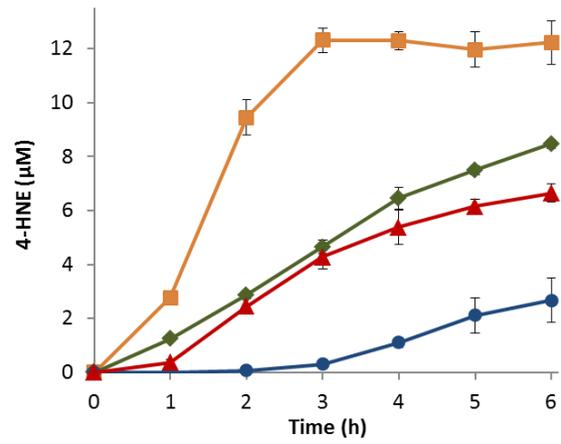
At pH 5 in the absence of pepsin and antioxidant, lipid-derived conjugated dienes (CD) accumulated in an almost linear pattern whereas the secondary lipid oxidation marker 4-HNE tended to plateau after 3 h (Fig. 1A-B).  $\alpha$ -Tocopherol was consumed within 15 min (Suppl. Fig. 1D) in agreement with the observed slower rates for CD and 4-HNE formations during the first hour. Epicatechin appeared by far as the best inhibitor, totally inhibiting the accumulation of both CD and 4-HNE for 3 h (Fig. 2A-B). In addition, epicatechin increased the lifetime of  $\alpha$ -tocopherol from 15 min to 3 h (Suppl. Fig. 1E) and was finally consumed within 4 h at which stage lipid oxidation initiated. With apple products, the lag-phase durations were the same considering both lipid oxidation markers, ranging from 1 h for fresh apple to 2 h for puree and the phenolic extract. The phenolic extract appeared more efficient than puree and fresh apple during the first 3 h. In the second half of the kinetics, the protective capacities of fresh apple and puree may appear opposite when addressing both lipid oxidation markers. Marker 4-HNE should be more reliable as it is specifically quantified by mass spectrometry. By contrast, CD were quantified at 234 nm in the presence of residual substances absorbing at this wavelength such as amino acids and sugars which may have diffused from puree during the 6-h long digestion. Although fresh apple brought 33% more phenolic compounds it proved to be the least efficient matrix for preventing the formation of 4-HNE.

The addition of pepsin at the levels of 1, 0.25 and 0.0625 mg/mL (2800, 700 and 175 U/mL) significantly enhanced the early accumulation of CD for non-inhibited lipid oxidation ( $p < 0.05$ ) (Suppl. Fig. 1A). No lag-phase could be observed suggesting the presence of a different initiating myoglobin form. While a sustained increase of CD accumulation was observed with the lowest pepsin concentrations 0.25 and 0.0625 mg/mL, lipid oxidation tended to level off after 3 h in the presence of 1 mg pepsin/mL. A pepsin concentration of 0.25 mg/mL, simulating mid-digestion conditions was further used to study the antioxidant capacity of the various apple products and the stability of epicatechin and  $\alpha$ -tocopherol. In the presence of pepsin,  $\alpha$ -tocopherol disappeared in less than 15 min as rapidly as in the absence of pepsin (Suppl. Fig. 1D). By contrast, the 4-HNE formation rate was halved in the presence of pepsin (Fig. 1B). Apple matrices showed a rather similar pattern with total and significantly high inhibitions of CD and 4-HNE accumulations after 1 and 2 h, respectively (Fig. 3). Puree and the phenolic extract proved to be better inhibitors than fresh apple when addressing 4-HNE. After 2 h, lipid oxidation proceeded at a faster rate leading rapidly to an inhibition loss for 4-HNE and apparently higher CD amounts compared to the pepsin control. Epicatechin displayed contrasting effects. While as weakly efficient as apple products for CD inhibition, it markedly retarded the appearance of 4-HNE (up to 3 h) and increased the lifetime of  $\alpha$ -tocopherol from 15 to 45 min (Suppl Fig. 1E). By contrast, no protection was afforded to  $\alpha$ -tocopherol by apple products. Additionally, epicatechin was more rapidly degraded in the presence (3 h) than in the absence of pepsin (4 h) (Fig.1A and 2A).

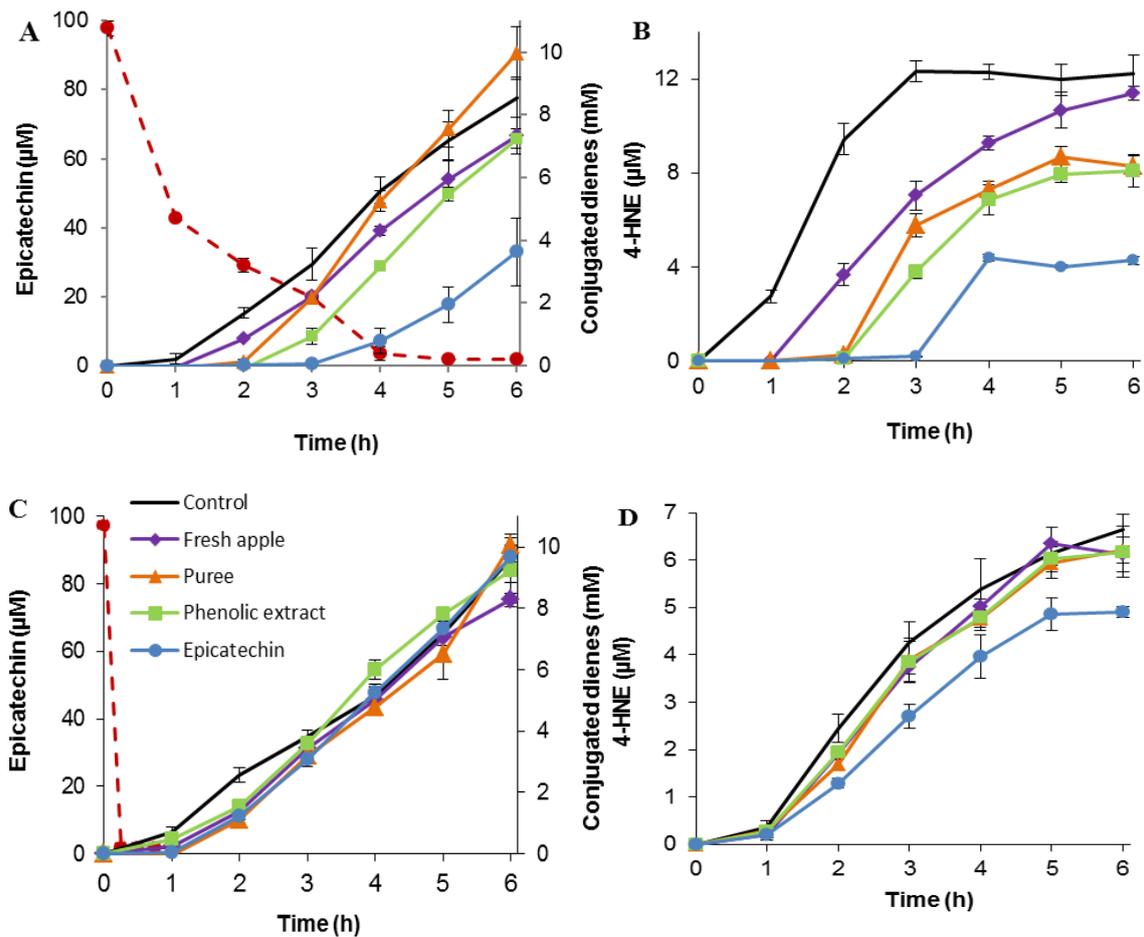
During human gastric digestion, pH almost linearly decreases from 5 to 3 at a rate depending on the consistency of food (Alminger et al., 2014). Interestingly, the pattern for CD accumulation at pH 3 superimposed rather closely with that observed at pH 5 in the presence of pepsin (Fig. 1A). As stated earlier, there was no lag-phase and significantly higher amounts of CD were observed during the first 3 hours compared to lipid oxidation at pH 5. Furthermore,

the patterns for 4-HNE production were also markedly similar between pH 3 and pH 5 with pepsin (Fig. 1B). Although epicatechin was found to totally inhibit lipid oxidation for 3 hours at pH 5, it appeared poorly efficient at pH 3 with a 50% decrease in CD at 2 h followed by a major loss of the activity at 3 hours (Fig. 2C). Epicatechin retained only a partial activity when focusing on 4-HNE (Fig. 2D). Whereas no 4-HNE was produced until 3 h of lipid oxidation at pH 5, epicatechin reduced by ca. 37% the extent of 4-HNE formation at pH 3. Fresh apple, puree and the phenolic extract behaved more or less as epicatechin displaying a weak antioxidant capacity towards CD formation while almost no inhibition of 4-HNE formation. Last,  $\alpha$ -tocopherol lifetime was not extended by any of the antioxidant studied.

At pH 3, the addition of pepsin (0.25 mg/mL) had a marked impact on the formation of both markers (Fig. 1). Lipid oxidation only started after 2 h of incubation and its extent was largely reduced with concentrations of only 1.2 mM for CD and 2.7  $\mu$ M for 4-HNE after 6 h. At pH 3, in the absence of pepsin, the CD and 4-HNE levels were 9.6 mM and 6.6  $\mu$ M, respectively. Epicatechin, apple puree and the phenolic extract inhibited almost totally the formation of both CD and 4-HNE during the 6 h-long kinetics. By contrast, fresh apple proved to be rather inefficient. The lifetime of  $\alpha$ -tocopherol was found to be less than 15 min for all conditions at pH 3 with pepsin. Finally, epicatechin disappeared in 15 min as already observed in the absence of pepsin.

**A****B**

**Figure 1.** Metmyoglobin-initiated lipid oxidation of phospholipid-stabilized emulsions in the absence or presence of pepsin (0.25 mg/mL) at pH 5 and 3. Accumulation of conjugated dienes (A) and 4-HNE (B). Values represent mean  $\pm$  SD ( $n = 4 - 5$ ).



**Figure 2.** Metmyoglobin-initiated lipid oxidation and its inhibition by different apple matrices in phospholipid-stabilized emulsions. Accumulation of conjugated dienes (A) and 4-HNE (B) at pH 5. Accumulation of conjugated dienes (C) and 4-HNE (D) at pH 3. Dotted red lines are for the consumption of epicatechin. Polyphenol concentration = 100  $\mu\text{M}$  for puree, phenolic extract, epicatechin and 133  $\mu\text{M}$  for fresh apple. Values represent mean  $\pm$  SD ( $n = 4 - 5$ ).

### Effect of the matrix on the bioaccessibility of apple phenolic compounds

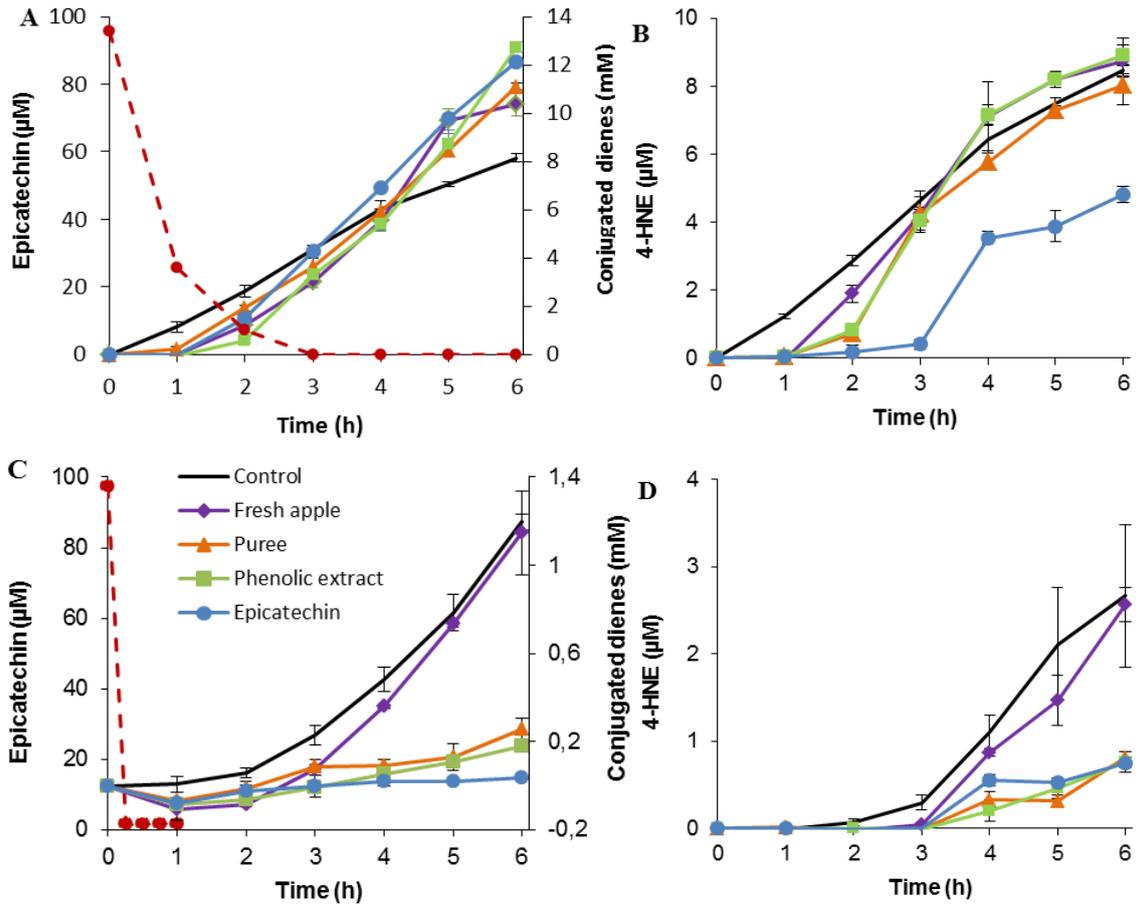
The bioaccessibility of apple phenolic compounds was evaluated for fresh apple, puree, and the phenolic extract at the initial time of the simulated gastric digestion before addition of metmyoglobin to prevent oxidation (Table 2). Bioaccessible phenolic compounds are the molecules freely present in the aqueous phase after separation of the aqueous and lipid phases of the emulsion. When monomeric flavanols, flavonols, hydroxycinnamic acids and

dihydrochalcones were brought as a hydroacetic extract, they were recovered in high yields (Table 2). Recoveries of 96 and 95% were obtained at pH 5 in the absence and presence of pepsin while these values were 89 and 79% at pH 3, respectively. Chlorogenic acid, phloretin-2'-xyloglucoside and epicatechin proved to be more highly bioaccessible than 4-*p*-coumaroylquinic acid, phloretin-2'-glucoside and flavonols. Additionally, dimer B2, the major procyanidin oligomer in apple, was found to be present in the range 14-19% whatever the conditions. When puree was probed for antioxidant capacity, the recovery of phenolic compounds appeared lower, 74 and 60% at pH 5 while 57 and 60% at pH 3 in the absence and presence of pepsin, respectively. The three more highly bioaccessible compounds were chlorogenic acid, phloretin-2'-xyloglucoside and 4-*p*-coumaroylquinic acid. Dimer B2 was recovered in yields ranging between 7 and 23%. With fresh fruit, the bioaccessibility of phenolic compounds markedly decreased, being 14 and 3% at pH 5 while 1 and 12% at pH 3, without and with pepsin, respectively. Surprisingly, phloretin-2'-xyloglucoside, whose content is commonly higher in apple skin than flesh, was relatively more bioaccessible than chlorogenic acid for which the favored location site is reversed (Guyot et al., 2002; Le Bourvellec et al., 2011).

**Table 2.** Initial bioaccessibility of apple phenolic compounds for the different matrices in phospholipid-stabilized emulsions at pH 5 and 3 in the absence or presence of pepsin (0.25 mg/mL). Recovery yields given at T0 in %. Polyphenol concentration = 100  $\mu$ M for puree, phenolic extract, epicatechin and 133  $\mu$ M for fresh apple.

Matrix	Conditions	Flavanols		Hydroxycinnamic acids		Dihydrochalcones		Flavonols	Total polyphenols
		Epi	Dimer B2	5-CQ	4-pCou	Phln	Phlx		
Fresh Apple	pH 5	0.5 $\pm$ 0.4	34 $\pm$ 7	21 $\pm$ 0	5 $\pm$ 3	6 $\pm$ 3	19 $\pm$ 9	-	14 $\pm$ 0
	pH 5 + pepsin	6 $\pm$ 2	13 $\pm$ 3	-	5 $\pm$ 2	27 $\pm$ 1	-	-	3 $\pm$ 0.4
	pH 3	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	-	4 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	10 $\pm$ 1	-	1 $\pm$ 0.3
	pH 3 + pepsin	1 $\pm$ 0	47 $\pm$ 10	17 $\pm$ 2	8 $\pm$ 6	5 $\pm$ 2	29 $\pm$ 3	-	12 $\pm$ 1
Puree	pH 5	44 $\pm$ 4	23 $\pm$ 13	95 $\pm$ 6	50 $\pm$ 2	32 $\pm$ 14	48 $\pm$ 3	47 $\pm$ 11	74 $\pm$ 3
	pH 5 + pepsin	13 $\pm$ 3	7 $\pm$ 1	85 $\pm$ 3	43 $\pm$ 8	15 $\pm$ 3	27 $\pm$ 3	22 $\pm$ 3	60 $\pm$ 6
	pH 3	25 $\pm$ 9	15 $\pm$ 7	107 $\pm$ 6	39 $\pm$ 5	18 $\pm$ 1	43 $\pm$ 5	23 $\pm$ 6	57 $\pm$ 3
	pH 3 + pepsin	29 $\pm$ 19	10 $\pm$ 2	68 $\pm$ 6	40 $\pm$ 8	15 $\pm$ 2	41 $\pm$ 2	21 $\pm$ 18	60 $\pm$ 6
Phenolic extract	pH 5	40 $\pm$ 26	19 $\pm$ 4	125 $\pm$ 2	57 $\pm$ 20	30 $\pm$ 3	87 $\pm$ 5	41 $\pm$ 15	96 $\pm$ 4
	pH 5 + pepsin	82 $\pm$ 5	16 $\pm$ 1	115 $\pm$ 2	51 $\pm$ 2	31 $\pm$ 0	70 $\pm$ 6	43 $\pm$ 9	95 $\pm$ 1
	pH 3	76 $\pm$ 7	17 $\pm$ 0	104 $\pm$ 4	49 $\pm$ 4	28 $\pm$ 1	116 $\pm$ 1	65 $\pm$ 28	89 $\pm$ 2
	pH 3 + pepsin	47 $\pm$ 27	14 $\pm$ 2	96 $\pm$ 0	40 $\pm$ 6	28 $\pm$ 0	108 $\pm$ 5	51 $\pm$ 16	79 $\pm$ 4

Abbreviations Epi, 5-CQ, 4-pCou, Phln and Phlx are defined in Table 1. Values represented mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

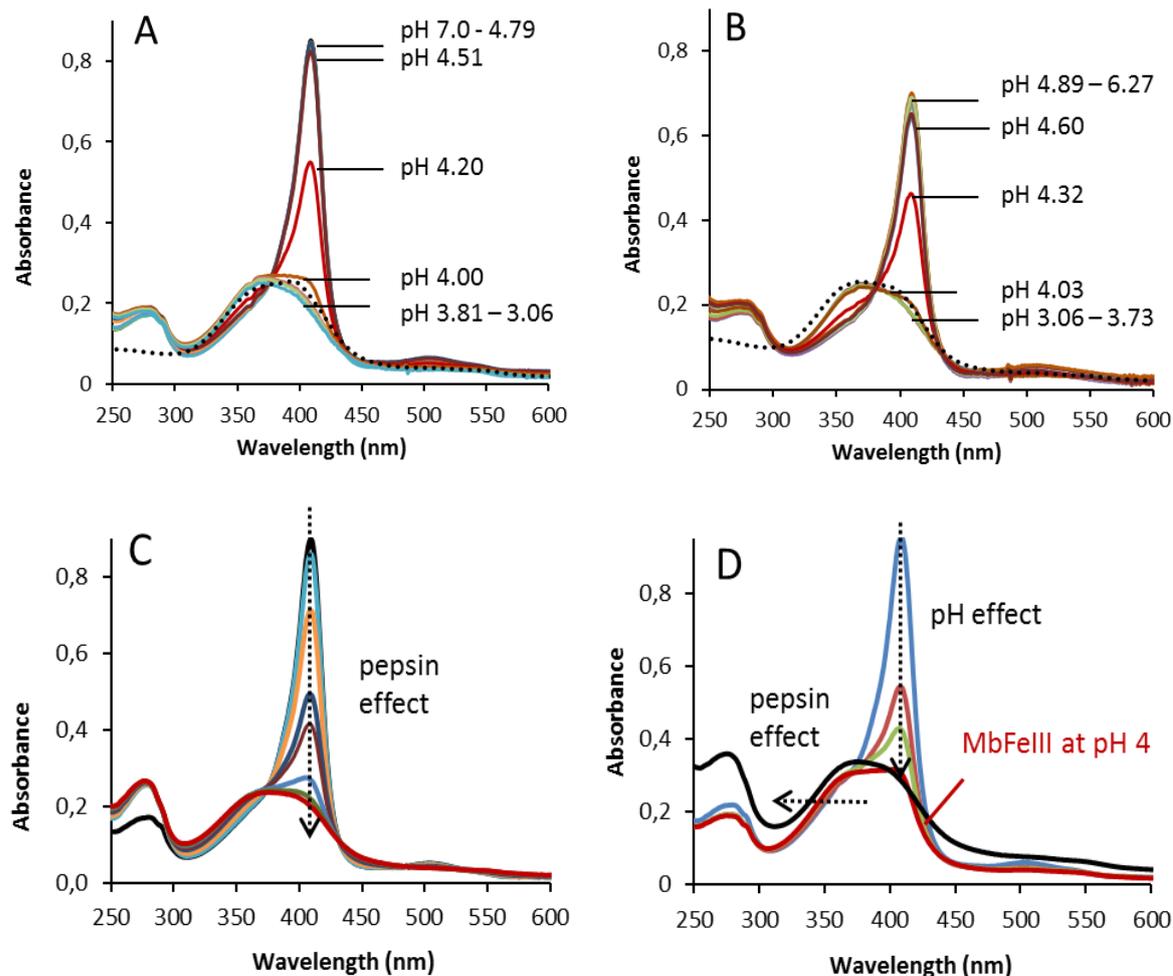


**Figure 3.** Metmyoglobin-initiated lipid oxidation and its inhibition by different apple matrices in phospholipid-stabilized emulsions in the presence of pepsin (0.25 mg/mL). Accumulation of conjugated dienes (A) and 4-HNE (B) at pH 5. Accumulation of conjugated dienes (C) and 4-HNE (D) at pH 3. Dotted red lines are for the consumption of epicatechin. Polyphenol concentration = 100 μM for puree, phenolic extract, epicatechin and 133 μM for fresh apple. Values represent mean  $\pm$  SD ( $n = 4 - 5$ ).

### **Impact of pH and pepsin on the structure of metmyoglobin**

The structure of metmyoglobin was examined between pH 7 and 3 using visible spectroscopy (Fig. 4A). No spectral change was recorded for metmyoglobin between pH 7 and 4.79. However, a drastic decay of the Soret band absorption peaking at 409 nm was evidenced for pH lower than 4.5. At pH 4.2, the intensity of the Soret band is reduced by half while a further pH decrease to 4.0 led to a loss of the Soret band with the flattening of the absorption band between 370 and 410 nm. Between 3.8 and 3.0, the absorption spectrum slightly evolved towards a band peaking at 370 nm. Isobestic points at 380 and 433 nm suggest the appearance of a single new form only. Although this last form had a spectrum more closely related to that of hematin at pH 5 than 3, it proved to be reversible. Indeed, when small increments of a NaOH solution were added, the Soret band was slowly restored (Fig. 4B). Intermediate spectra at pH 4.0, 4.3 and 4.6 were observed as in the first part devoted to pH decrease. Further NaOH addition and long equilibration time did not allow to fully recover the initial metmyoglobin spectrum. As a matter of fact, 15 to 18% of the initial structure were lost when the time spent at pH 3 was between 5 min (Fig. 4B) and 30 min (data not shown).

Pepsin addition to metmyoglobin at pH between 5 and 4 led to a pseudo-first order decrease of the Soret band yielding a hematin-like band peaking at 370 nm (Fig. 4 CD). The presence of epicatechin at pH 5 slightly changed the pattern of this new band towards a more flat one while being without any visible effect at pH 4 (Suppl. Fig. 2). Epicatechin appears to slow down pepsinolysis by 10-20% at pH 5, 4.75 and 4.5 when this process is still slow (Suppl. Table 2 and Suppl. Fig. 3).



**Figure 4.** Effect of pH and pepsin on the structure of metmyoglobin (5 μM). (A) Stepwise pH decrease from pH 7.0 to 3.0; dotted lines are hematin at pH 3.0. (B) Stepwise pH increase from pH 3.0 to 6.27; dotted lines are hematin at pH 5.0 (C) Addition of pepsin (0.0625 mg/mL) on metmyoglobin at pH 5. (D) Addition of pepsin (0.0625 mg/mL) on metmyoglobin at pH 4.

## DISCUSSION

In this study, we first gave an insight into the two main factors influencing lipid oxidation in gastric digestion, *i.e.* pH and pepsin. In Western countries, fat daily consumption comprises 100-150 g of triacylglycerols and 2-10 g of phospholipids. In the presence of dietary emulsifiers and following gastric antral contractions, triacylglycerols are recovered as lipid droplets with 50% (initial) and 30% (after 4 h) of the particles in the 1-10  $\mu\text{m}$  diameter range (Armand et al., 1994). Thus, 10% sunflower oil-in-water emulsions stabilized by 0.25% (w/w) phospholipids were designed to model the physical state of lipids during gastric digestion. Particle size characterization by laser light scattering gave a mode of  $11.6 \pm 1.1 \mu\text{m}$  (data not shown). The oxidative stress was brought by addition of metmyoglobin to the emulsion at the 20  $\mu\text{M}$  level that corresponds to the consumption of 57 g of steak (ca. 20  $\mu\text{g}$  heme iron/g cooked meat) (Gobert et al., 2014; Min et al., 2008) and a chyme volume of 1 L.  $\alpha$ -Tocopherol, the main antioxidant in sunflower oil, slowed down lipid oxidation during the first hour when compared to the same reaction with sunflower oil stripped of  $\alpha$ -tocopherol (Lorrain et al., 2012).  $\alpha$ -tocopherol, which is located in the lipid droplets, rather acts as an inhibitor of the propagation step. Low concentrations (0.5 mM) of conjugated dienes (CD), involving lipid-derived hydroperoxides, were initially found in the emulsion. The latter are required to activate metmyoglobin ( $\text{MbFe}^{\text{III}}$ ) into perferrylmyoglobin which auto-reduces to ferrylmyoglobin ( $\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ), the prooxidant species involved in the propagation step through the production of lipid-derived peroxy radicals (Baron and Andersen, 2002). This reaction likely takes place at the droplet interface between the lipid and aqueous phases. Besides, the above-described mechanism has been mainly described at pH 5.8 for meat in post-mortem conditions. In gastric digestion, metmyoglobin will face a decrease in pH from 6-5 to 2 and pepsin secretion and these two factors can affect the metmyoglobin-initiated oxidation of dietary lipids (Tyssandier et al., 2003).

## **Metmyoglobin structures involved in lipid oxidation**

Using kinetic monitoring by spectroscopy, it was possible to investigate the effect of pH on metmyoglobin stability and to give an insight into its three dimensional structure. No major structural change could be observed between pH 7 and 4.5. However, the Soret band with a  $\lambda_{\max}$  at 409 nm typical of the myoglobin structure largely decayed between pH 4.25 and 4, indicating an exposure of the porphyrin ring to a different surrounding environment. Between pH 3.75 and 3 a larger and more flat absorption band has formed displaying a high analogy with that for hematin. At this stage, the bond between the proximal histidine nitrogen and the iron center could be disrupted. It is worth noting that reversibility to the initial metmyoglobin structure can be obtained upon pH increase. This process requires more time for full structure recovery when compared to the pH decrease process. Unfolding of the protein may result from the change in protonation status (pI ca. 7). A high reversibility (> 82%) was observed when metmyoglobin was left at pH 3 for periods shorter than 30 min. This is of particular interest as these unfolded forms may move to the duodenum upon gastric emptying. The pH in duodenum is ca. 6.5 and metmyoglobin could still play a role as a prooxidant. In our study, lipid oxidation, which was rather initiated by this open form of metmyoglobin than by hematin, proved to be faster at pH 3 compared to pH 5 as shown by the 3-fold excess in CD after 1 h (Fig. 1). By contrast, 4-HNE accumulated more slowly at low pH.

Upon addition of pepsin, the initial structure of metmyoglobin was lost as shown by the pH-dependent first-order decay of the Soret band (Suppl. Fig. 3). It is worth noting that pepsin is active at pH 5 although proteolysis appears quite slow at the beginning of the digestion. Decreasing the pH to 4.75, 4.5 then 4.25 speeds proteolysis by factors in the range 5-7, 3-5 and finally 2-4, respectively (Suppl. Table 2). As a matter of fact, the activity of pepsin was calculated to increase ca. 72 times between pH 5 and pH 4.25. Recently, Sayd et al. identified 15 different peptides from myoglobin in the *in vivo* digestion of beef meat by minipigs (Sayd

et al., 2018). These peptides mainly mapped the C- and N-terminal regions and one central region not implicated in the binding site of the porphyrin ring. In particular, the bonding between the porphyrin iron center and both His 64 and 93 could be preserved in the remaining non-digested peptide. These results are consistent with data from Schwarzsinger and coll. who named micro-myoglobin A the peptide Ile 20-Phe 106 principally obtained from pepsinolysis of sperm whale myoglobin (Schwarzsinger et al., 2000). Additionally, this peptide exhibited heme-binding activity as demonstrated by the shift for the Soret band from 385 nm to 404 nm attributed to the coordination of the fifth and sixth coordination sites of iron. Whether hematin is ultimately released after prolonged pepsinolysis is still unclear in our study. However, the formation of a micro-metmyoglobin form may no doubt increase the accessibility of surrounding lipids to the iron center. This would result in a higher catalytic activity of MbFe<sup>III</sup> as observed through the faster rate for CD accumulation. As a matter of fact, the CD level was 5-fold higher after 1 h in the presence of pepsin at pH 5. Carlsen et al. similarly observed faster oxidation rates in methyl linoleate emulsions stabilized by Tween 20 after the addition of MbFe<sup>III</sup> proteolyzed by pepsin at pH 3.9 (Carlsen and Skibsted, 2004). The prooxidant species also retained partly the initial Soret band in agreement with a heme-peptide structure. By contrast, no accelerated 4-HNE formation could be observed. This  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde is highly susceptible to the nucleophilic addition of amino acids such as cysteine, lysine and histidine. Indeed, LC-MS evidenced the coupling of 4-HNE to up to seven histidine residues in myoglobin (Suman et al., 2007).

### **A role for apple phenolic compounds as antioxidants in gastric digestion**

The 100 and 133  $\mu$ M polyphenol concentrations used in this study correspond to the respective intake of only 8 and 9 g of puree and fresh apple per liter of chyme, which is

nutritionally relevant. The metmyoglobin-initiated lipid oxidation of phospholipid-stabilized emulsions with pH set at 5 and no pepsin closely simulates the initial stage of gastric digestion when pepsin has not already diffused from the stomach wall into the chyme. Polyunsaturated lipids are totally protected from oxidation by epicatechin and the three studied apple matrices as shown by lag-phases between 1 and 3 h for both CD and 4-HNE markers (Fig. 2AB). Epicatechin, or any other antioxidant phenolic compound located at the interface or in the aqueous phase of the emulsion can interact with heme iron reducing the  $\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$  to the  $\text{MbFe}^{\text{III}}$  form, thus inhibiting the initiation step of the radical chain mechanism of lipid oxidation. Furthermore, the presence of epicatechin was found to reduce by ca. 10-20% the proteolysis rate of metmyoglobin at pH 5 and 4.75. Phenolic compounds displaying an affinity for pepsin and/or metmyoglobin could thus slow down lipid oxidation in the initial stage of gastric digestion through a non-antioxidant mechanism.

During gastric digestion, pepsinogen and HCl are respectively secreted by chief and parietal cells located in the stomach body and fundus. Upon acidic hydrolysis, pepsinogen releases pepsin which diffuses into the chyme following antral contractions. A physiological pepsin level has been suggested to be 2000 U/mL digesta at mid-digestion (Minekus et al., 2014). In our work, the addition of pepsin at 175, 700, and 2800 U/mL was found to boost initial lipid oxidation by factors 3 to 5. This was ascribed to the formation of a more active micro-metmyoglobin form after partial globin pepsinolysis. In the presence of pepsin (700 U/mL) at pH 5, the antioxidant capacity of the various apple matrices was partly retained (Fig. 3 AB). Polyphenol may bind to pepsin or have a decreased affinity for micro-metmyoglobin, which may prevent them to reduce efficiently ferrylmyoglobin. Despite lipid protection is limited to 3 h in our model system, it remains relevant in human gastric digestion.

Decreasing the pH to 3 to simulate mid-digestion was found to influence lipid oxidation and its inhibition by apple matrices rather similarly to pepsin addition at pH 5. Indeed, lipid

oxidation initiated faster as shown by increased CD contents after 1 and 2 h (Fig. 2AB). In addition, apple matrices only weakly retarded the formation of CD while having no effect on 4-HNE formation. Actually, digestion conditions with a low pH and no pepsin are not physiologically relevant due to the concomitant secretion of pH and pepsinogen by the same stomach areas. More interesting for human digestion, lipid oxidation was drastically reduced at pH 3 in the presence of pepsin. A reversible unfolding of globin is expected at this pH. However, pepsinolysis of this open form may be extremely fast likely leading to the release of heme. Although heme- and metmyoglobin-initiated lipid oxidations were found earlier to proceed at comparable rates at both pH 4 and pH 5.8 in phospholipid-stabilized emulsions (Lorrain et al., 2010) this is clearly not the case in this work in the presence of pepsin. This difference could be accounted by heme binding to pepsin. The resulting heme-pepsin complex may be unable to interact with polyunsaturated lipids owing to its conformation or location in the three-phase emulsion system. Inactivation of iron forms may only be partial as lipid oxidation could start after 3 h. It is worth noting that epicatechin, puree and the phenolic extract strongly inhibited the accumulation of CD and 4-HNE while fresh apple was inactive.

Actually, our results obtained *in vitro* by decomposing gastric digestion stages are fully consistent with results obtained *in vivo* with minipigs (Gobert et al., 2014). Indeed, CD were found to accumulate following a bell-shaped kinetics and this is supported by the higher oxidizability of PUFA at pH 5 compared to pH 3 in the presence of pepsin. Furthermore, TBARS, as secondary lipid oxidation markers, only slowed down at the end of the digestion as does 4-HNE. Artichoke, plum and apple, added to a meal containing sunflower oil and beef meat, played a protective role by totally and largely inhibiting CD and TBARS formation, respectively. These defrosted or cooked fruit and vegetables are structurally related to puree displaying a loss of plant cell integrity and release of phenolic compounds.

Our study finally outlined a considerable effect of the matrix on the bioaccessibility of phenolic compounds. Indeed, phenolic compounds were almost fully bioaccessible when provided as an extract (79-96%) and only slightly less bioaccessible when brought as puree (57-74%). Polyphenols may noncovalently bind apple proteins and cell wall polysaccharides (Le Bourvellec et al., 2011). As a matter of fact, higher affinities are exhibited by procyanidins as shown here with dimer B2 whose bioaccessibility remains below 20%. By contrast, almost no phenolic compounds were recovered in the aqueous phase for fresh apple (1-14%) suggesting that mastication is by far less efficient than thermal processing for cell membrane breakdown. Our bioaccessibility data are in line with the general trend observed for the antioxidant capacity of the three matrices, i.e., the phenolic extract and puree similarly inhibited lipid oxidation and, as a matter of fact, more efficiently than does fresh apple.

## **CONCLUSION**

The present study shed some light on the role of pH and pepsin on heme iron-initiated lipid oxidation taking place in the gastric tract after the ingestion of a Western type diet. In particular, it evidenced the formation of two reversibly unfolded or partly proteolyzed forms of metmyoglobin retaining pro-oxidant activities. Because these forms can move forward to the intestinal tract along with PUFA, more work should be done to assess their activity towards mixed micelles of bile salts, free fatty acids and monoacylglycerols after the action of intestinal lipase. The role of trypsin or chymotrypsin on newly formed heme-iron forms should also be evaluated.

Although most apple dessert brings 3 to 4 times less polyphenols, the consumption of an apple associated to a Western type diet could provide health benefits directly in the gastrointestinal tract by limiting the formation of deleterious and absorbable lipid oxidation

products. Procyanidins are also known to be metabolized by the colon microbiota providing circulating metabolites endowed with the capacity to protect the vascular endothelium. Hence, the reintroduction of such healthy fruits into the Western diet should be encouraged for a better protection towards cardiovascular diseases.

### **Acknowledgements**

Gaetan Boléa acknowledges the Foundation of Avignon University for a PhD grant. We gratefully thank Mrs Christine Boutin (Bio verger, Ambricourt, 62310, France) for the kind gift of Reinette de Flandre.

### **Conflicts of interest**

There are no conflicts of interest to declare.

### **REFERENCES**

- J. Kanner and T. Lapidot, *Free Radical Biology and Medicine* 2001, **31**, 1388-1395.
- M. Gobert, D. Remond, M. Loonis, C. Buffiere, V. Sante-Lhoutellier and C. Dufour, *Food Funct*, 2014, **5**, 2166-2174.
- B. Lorrain, O. Dangles, C. Genot and C. Dufour, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, **58**, 676-683.
- B. Lorrain, O. Dangles, M. Loonis, M. Armand and C. Dufour, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, **60**, 9074-9081.
- J. P. Suomela, M. Ahotupa and H. Kallio, *Lipids*, 2005, **40**, 437-444.
- I. Staprans, J. H. Rapp, X. M. Pan, K. Y. Kim and K. R. Feingold, *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 1994, **14**, 1900-1905.
- M. Grootveld, M. D. Atherton, A. N. Sheerin, J. Hawkes, D. R. Blake, T. E. Richens, C. J. Silwood, E. Lynch and A. W. Claxson, *J Clin Invest*, 1998, **101**, 1210-1218.
- J. Keller, M. Baradat, I. Jouanin, L. Debrauwer and F. Gueraud, *Redox Biology*, 2015, **4**, 136-148.

- I. Staprans, X. M. Pan, J. H. Rapp and K. R. Feingold, *Mol Nutr Food Res*, 2005, **49**, 1075-1082.
- S. Gargiulo, G. Testa, P. Gamba, E. Staurenghi, G. Poli and G. Leonarduzzi, *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, **111**, 140-150.
- A. Negre-Salvayre, S. Garoby-Salom, A. Swiader, M. Rouahi, M. Pucelle and R. Salvayre, *Free Radic Biol Med*, 2017, **111**, 127-139.
- D. Aune, E. Giovannucci, P. Boffetta, L. T. Fadnes, N. Keum, T. Norat, D. C. Greenwood, E. Riboli, L. J. Vatten and S. Tonstad, *International Journal of Epidemiology*, 2017, **46**, 1029-1056.
- J. Zhan, Y. J. Liu, L. B. Cai, F. R. Xu, T. Xie and Q. Q. He, *Crit Rev Food Sci*, 2017, **57**, 1650-1663.
- F. J. He, C. A. Nowson and G. A. MacGregor, *Lancet*, 2006, **367**, 320-326.
- A. L. Macready, T. W. George, M. F. Chong, D. S. Alimbetov, Y. Jin, A. Vidal, J. P. Spencer, O. B. Kennedy, K. M. Tuohy, A. M. Minihane, M. H. Gordon and J. A. Lovegrove, *Am J Clin Nutr*, 2014, **99**, 479-489.
- L. Hooper, C. Kay, A. Abdelhamid, P. A. Kroon, J. S. Cohn, E. B. Rimm and A. Cassidy, *Am J Clin Nutr*, 2012, **95**, 740-751.
- A. Medina-Rejon, R. Casas, A. Tresserra-Rimbau, E. Ros, M. A. Martinez-Gonzalez, M. Fito, D. Corella, J. Salas-Salvado, R. M. Lamuela-Raventos and R. Estruch, *Br J Clin Pharmacol*, 2017, **83**, 114-128.
- C. D. Kay, L. Hooper, P. A. Kroon, E. B. Rimm and A. Cassidy, *Mol Nutr Food Res*, 2012, **56**, 1605-1616.
- R. Sansone, A. Rodriguez-Mateos, J. Heuel, D. Falk, D. Schuler, R. Wagstaff, G. G. C. Kuhnle, J. P. E. Spencer, H. Schroeter, M. W. Merx, M. Kelm, C. Heiss and F. C. European, *British Journal of Nutrition*, 2015, **114**, 1246-1255.
- D. R. Mangels and E. R. Mohler, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2017, **37**, 757-763.
- S. Claude, C. Bobby, A. Rodriguez-Mateos, J. P. E. Spencer, N. Gerard, C. Morand and D. Milenkovic, *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, **58**, 1016-1027.
- C. C. Lee, J. H. Kim, J. S. Kim, Y. S. Oh, S. M. Han, J. H. Y. Park, K. W. Lee and C. Y. Lee, *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, **18**.
- J. Perez-Jimenez, L. Fezeu, M. Touvier, N. Arnault, C. Manach, S. Hercberg, P. Galan and A. Scalbert, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2011, **93**, 1220-1228.
- S. Arranz, J. Manuel Silvan and F. Saura-Calixto, *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, **54**, 1646-1658.
- A. Wojdylo, J. Oszmianski and P. Laskowski, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, **56**, 6520-6530.
- M. Ceymann, E. Arrigoni, H. Scharer, A. B. Nising and R. F. Hurrell, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2012, **26**, 128-135.
- C. M. Andre, J. M. Greenwood, E. G. Walker, M. Rassam, M. Sullivan, D. Evers, N. B. Perry and W. A. Laing, *J Agric Food Chem*, 2012, **60**, 10546-10554.
- C. Dufour, M. Loonis, M. Delosiere, C. Buffiere, N. Hafnaoui, V. Sante-Lhoutellier and D. Remond, *Food Chem*, 2018, **240**, 314-322.

M. Alminger, A. M. Aura, T. Bohn, C. Dufour, S. N. El, A. Gomes, S. Karakaya, M. C. Martinez-Cuesta, G. J. McDougall, T. Requena and C. N. Santos, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, **13**, 413-436.

M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carriere, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D. J. McClements, O. Menard, I. Recio, C. N. Santos, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies and A. Brodkorb, *Food & Function*, 2014, **5**, 1113-1124.

V. Tyssandier, E. Reboul, J. F. Dumas, C. Bouteloup-Demange, M. Armand, J. Marcand, M. Sallas and P. Borel, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2003, **284**, G913-G923.

L. Sams, J. Paume, J. Giallo and F. Carriere, *Food & Function*, 2016, **7**, 30-45.

C. Le Bourvellec, K. Bouzerzour, C. Ginies, S. Regis, Y. Ple and C. M. G. C. Renard, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, **24**, 537-547.

A. Mikkelsen and L. H. Skibsted, *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 1995, **200**, 171-177.

W. A. Pryor and L. Castle, in *Oxygen Radicals in Biological Systems*, ed. L. Packer, Academic Press, Orlando, 1984, pp. 293-295.

S. Guyot, C. Le Bourvellec, N. Marnet and J. F. Drilleau, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 2002, **35**, 289-291.

P. Sanoner, S. Guyot, N. Marnet, D. Molle and J. F. Drilleau, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, **47**, 4847-4853.

M. Armand, P. Borel, C. Dubois, M. Senft, J. Peyrot, J. Salducci, H. Lafont and D. Lairon, *American Journal of Physiology*, 1994, **266**, G372-G381.

B. Min, K. C. Nam, J. Cordray and D. U. Ahn, *Journal of Food Science*, 2008, **73**, C439-C446.

C. P. Baron and H. J. Andersen, *J Agric Food Chem*, 2002, **50**, 3887-3897.

T. Sayd, C. Dufour, C. Chambon, C. Buffiere, D. Remond and V. Sante-Lhoutellier, *Food Chemistry*, 2018, **249**, 111-118.

S. Schwarzing, W. Ahrer and N. Muller, *Monatshefte Fur Chemie*, 2000, **131**, 409-416.

C. U. Carlsen and L. H. Skibsted, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, **52**, 1675-1681.

S. P. Suman, C. Faustman, S. L. Stamer and D. C. Liebler, *Proteomics*, 2007, **7**, 628-640.

## Supplementary data

### Composition data of Reinette apple

Reinette apple contained 3.15 g of glucose, 5.85 g of fructose, 1.09 g of saccharose, 0.04 g of citric acid and 1.61 g of malic acid per 100 g of fresh fruit. Dehydroascorbic acid (17.7 mg per 100 g FM) was markedly higher than ascorbic acid (5.9 mg per 100 g).

**Table 1.** Phenolic compounds identified by UPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup> in apple (*Reinette de Flandre*).

No.	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> fragments (m/z)	Proposed structure
1	6.6	280	577	559, 451, <b>425</b> , 407, 299, 289, 273, 245	B-Type dimer
2	7.0	280	289	271, <b>245</b> , 231, 205, 179	(+)-Catechin
3	7.4	326, 259sh	353	191	5-Caffeoylquinic acid <sup>a</sup> (chlorogenic acid)
4	8.0	316, 290sh	325	265, 235, 205, 187, 163, <b>145</b> , 119	Coumaroylhexoside
5	8.25	280	451	<b>289</b> , 245, 161	Cinchonain I <sup>b</sup>
6	8.6		865	847, 739, 713, <b>695</b> , 577, 575, 451, 407, 287	B-Type trimer
7			353	191, 179, <b>173</b>	4-Caffeoylquinic acid <sup>a</sup> (cryptochlorogenic acid)
8	8.85	280	1153	<b>1027</b> , 1001, 983, 907, 865, 863, 577, 575, 500, <b>491</b> , 451, 449, 425, 413, 407, 288, 286	B-Type tetramer
9			865	847, 739, 713, <b>695</b> , 577, 575, 451, 407, 287	B-Type trimer
10	9.05	284, 320sh	465	<b>303</b> , 285	Taxifolin hexoside
11	9.85	280	577	559, 451, <b>425</b> , 407, 299, 289, 245	B-Type dimer
12			865	847, 739, 713, <b>695</b> , 577, 575, 453, 451, 407, 287	B-Type trimer
13	9.95	285sh, 331	355	295, 265, 235, 216, <b>193</b> , 175, 160, 135	Feruloylhexoside
14	10.3	290sh, 313	337	<b>191</b> , 163	5- <i>p</i> -coumaroylquinic acid ( <i>trans</i> ) <sup>a</sup>
15	10.5	280	720 <sup>c</sup>	701, 643, <b>635</b> , 577, 575, 451, 407, 288, 286	B-Type pentamer
16	10.9	279	289	271, <b>245</b> , 231, 205, 179	(-)-Epicatechin
17			1153		B-Type tetramer
18	11.1	312, 285sh	337	<b>173</b> , 163	4- <i>p</i> -coumaroylquinic acid ( <i>trans</i> ) <sup>a</sup>

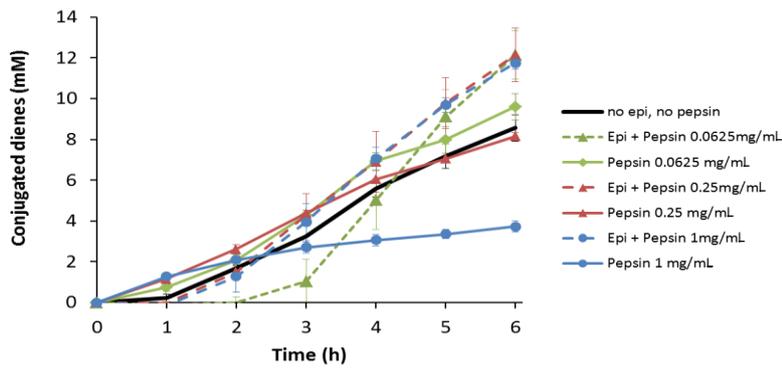
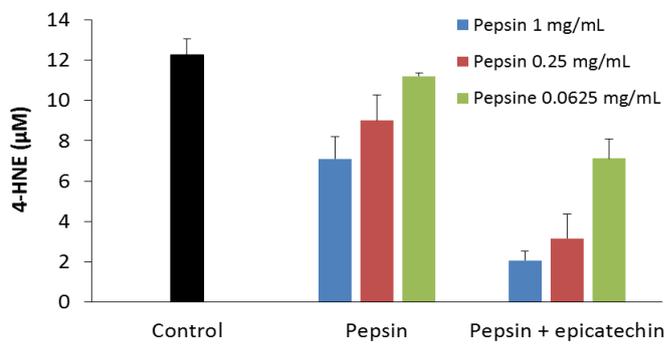
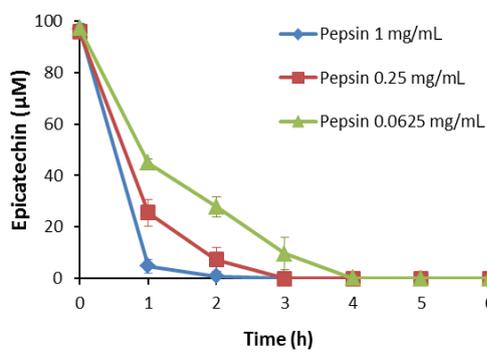
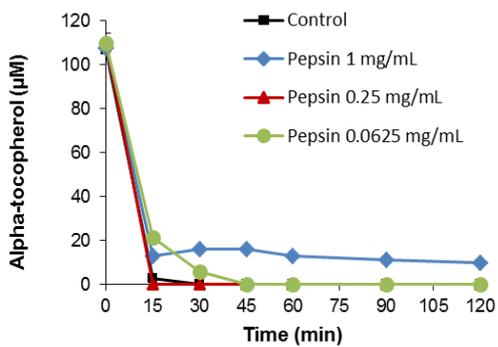
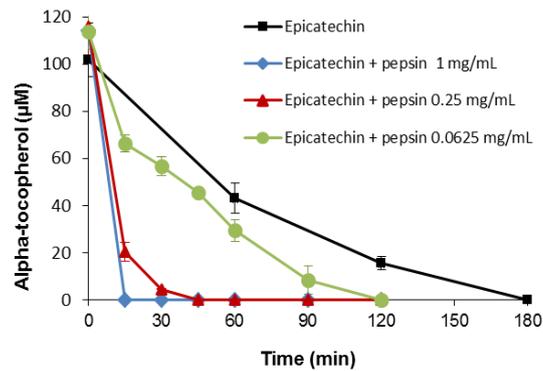
No.	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> fragments (m/z)	Proposed structure
19	11.4	280	1153	1135, 1027, 1001, 984, 865, <b>863</b> , 739, 701, 577, 575, 425	B-Type tetramer
20	11.5		720 <sup>c</sup>	701, <b>635</b> , 577, 575, 451, 425, 289, 287	B-Type pentamer
21	12.55	280	864 <sup>c</sup>	779, 719, 695, 577, 575, 449, 407, 288, 286	B-Type hexamer
22	13.25	280	720 <sup>c</sup>	711, 644, <b>635</b> , 577, 575, 559, 451, 407, 289, 287	B-Type pentamer
23	13.45	280	865	847, 739, 713, <b>695</b> , 577, 575, 543, 425, 407, 287	B-Type trimer
24	14.35	280	1153	1135, 1027, 1001, 983, <b>865</b> , 863, 739, 701, 577, 575, 449, 407	B-Type tetramer
25	14.55	280	1153	1135, 1027, 1001, 983, <b>865</b> , 863, 739, 701, 577, 575, 449, 407	B-Type tetramer
26	14.75	280	720 <sup>c</sup>	701, <b>635</b> , 577, 575, 451, 425, 407, 289, 287	B-Type pentamer
27		280	865	847, 739, 713, <b>695</b> , 577, 575, 543, 425, 407, 287	B-Type trimer
28	15.0	280	864 <sup>c</sup>	779, 719, 711, 695, 577, <b>575</b> , 449, 407, 289, 287	B-Type hexamer
29			720 <sup>c</sup>	709, <b>643</b> , 634, 577, 575, 558, 449, 288	B-Type pentamer
30	15.15	280	1153	1135, 1027, 1001, 983, 865, <b>863</b> , 739, 701, 577, 575	B-Type tetramer
31			864 <sup>c</sup>	779, 719, 695, <b>577</b> , 575, 449, 413, 287	B-Type hexamer
32	15.3	280	739	721, 629, <b>587</b> , 569, 449, 435, 417, 339, 289	Cinchonain II <sup>b</sup>
33	15.45	280	1008 <sup>c</sup>	932, <b>914</b> , 737, 576,	B-Type heptamer
34	15.55	280	1153	1143, 1067, 1008, <b>863</b> , 629, 577, 449	B-Type tetramer
35	15.85	265, 356	463	300	Quercetin-3-O-hexoside
36	15.90		609	<b>300</b> , 270	Quercetin-3-O-rhamnoglucoside (rutin)
37	16.1	356	463	300	Quercetin-3-O-hexoside
38	16.4	356	433	300	Quercetin-3-O-pentoside
39	16.6	356	433	300	Quercetin-3-O-pentoside
40	16.7	280	1027	875, 857, <b>737</b> , 585, 575, 449, 407	Cinchonain III <sup>b</sup>

No.	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> fragments (m/z)	Proposed structure
41	16.8	354	433	300	Quercetin-3-O-pentoside
42	17.0	354	433	300	Quercetin-3-O-pentoside
43	17.1	354	447	300	Quercetin-3-O-deoxyhexose
44	17.25	284, 300sh	567	273	Phloretin-2-O'-xyloglucoside
45	17.9		447	314	Tamarixetin- or isorhamnetin-3-O-pentoside
46	18.0	284, 300sh	435	273	Phloretin-2-O'-glucoside

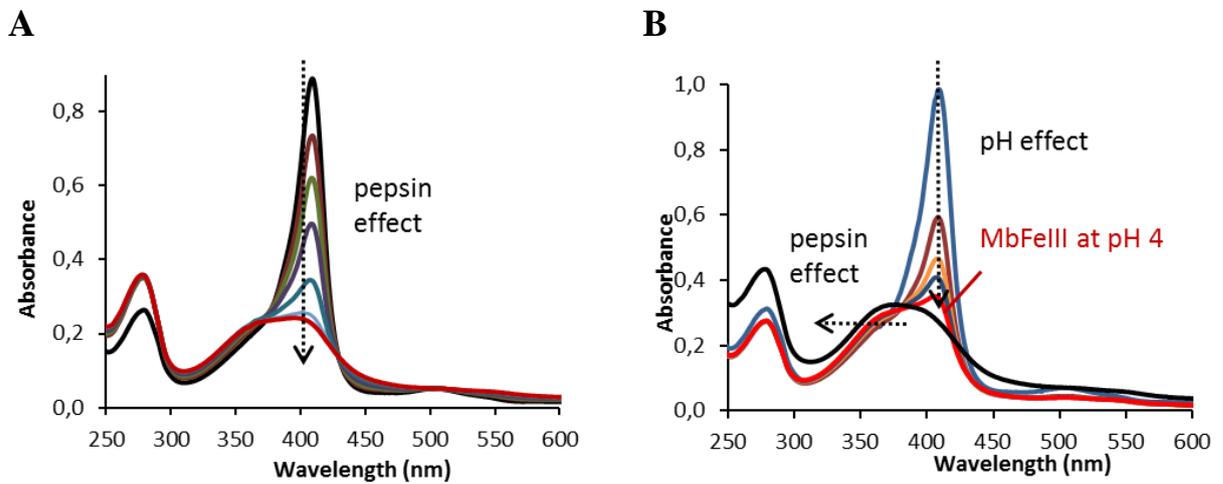
sh: shoulder. Fragment in bold is major ion. <sup>a</sup>Identified according to Clifford et al. (2003), <sup>b</sup>Hokkanen et al. (2009), <sup>c</sup>doubly-charged ion.

M. N. Clifford, K. L. Johnston, S. Knight and N. Kuhnert, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 2900-2911.

- J. Hokkanen, S. Mattila, L. Jaakola, A. M. Pirttila and A. Tolonen, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57, 9437-9447.

**A****B****C****D****E**

**Figure 1.** Metmyoglobin-initiated lipid oxidation at different pepsin concentrations (1, 0.25, and 0.0625 mg/mL) and inhibition by epicatechin in phospholipid-stabilized emulsions at pH 5. Accumulation of conjugated dienes (A) and 4-HNE at 6 hours (B). Degradation of epicatechin (C) and  $\alpha$ -tocopherol without and with epicatechin at different pepsin concentrations (D-E). Epicatechin concentration = 100  $\mu$ M. Values represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).



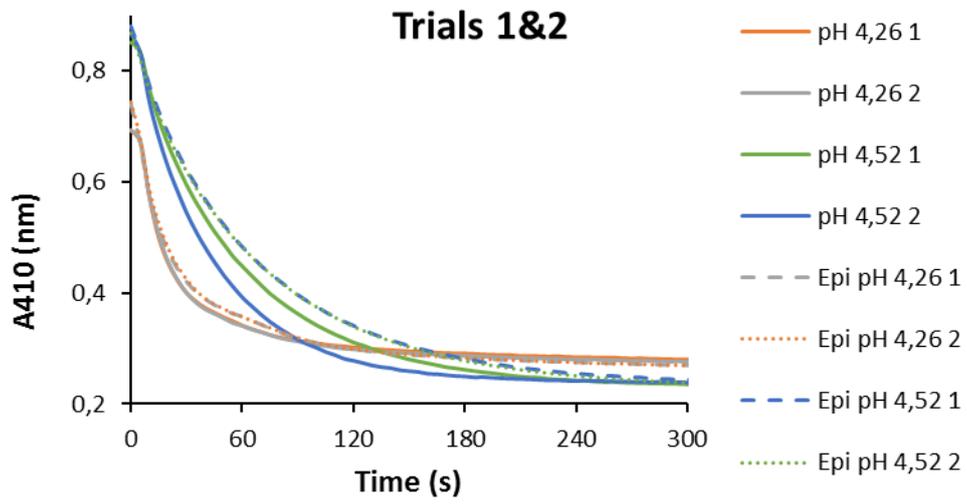
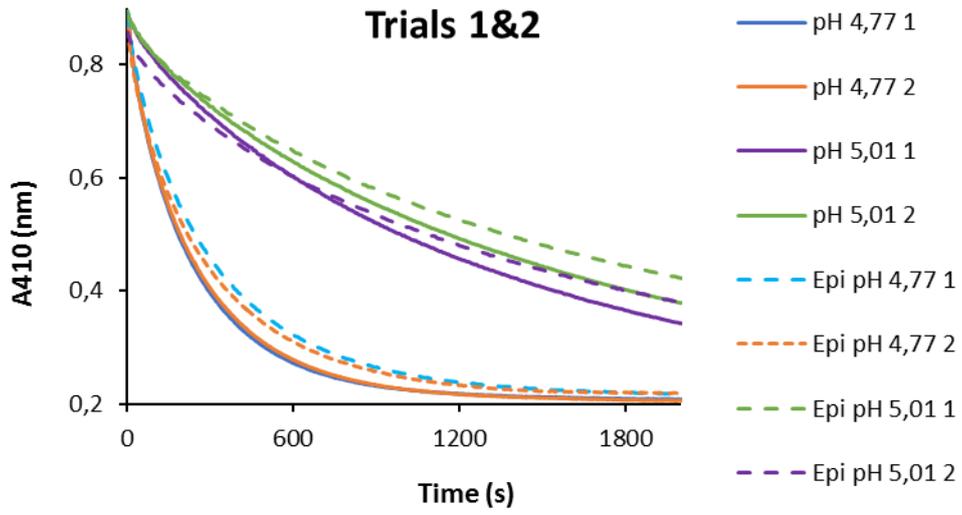
**Figure 2.** Effect of pepsin on the structure of metmyoglobin (5  $\mu$ M) in the presence of epicatechin (25  $\mu$ M). (A) Addition of pepsin (0.0625 mg/mL) onto metmyoglobin at pH 5. (B) Addition of pepsin (0.0625 mg/mL) onto metmyoglobin at pH 4.

**Table 2 & Figure 3.** Kinetics for the decay of the Soret band of metmyoglobin (5  $\mu\text{M}$ ) at 410 nm upon addition of pepsin (0.0625 mg/mL) at different pH, in the absence or presence of epicatechin (25  $\mu\text{M}$ ). Data are reported as first-order rate constants ( $k$ ) and standard deviations between measured absorbances and calculated values.

**Three trials with same epicatechin, pepsin, metmyoglobin solutions per trial.**

	Without (-)-Epicatechin				With (-)-Epicatechin			
	Trial 1				Trial 2			
	$k$ ( $\text{s}^{-1}$ )	SD ( $\text{s}^{-1}$ )	$k$ ( $\text{s}^{-1}$ )	SD ( $\text{s}^{-1}$ )	$k$ ( $\text{s}^{-1}$ )	SD ( $\text{s}^{-1}$ )	$k$ ( $\text{s}^{-1}$ )	SD ( $\text{s}^{-1}$ )
<b>pH 5.01</b>	$9.54 \times 10^{-4}$	$0.29 \times 10^{-4}$	$8.79 \times 10^{-4}$	$0.35 \times 10^{-4}$	$7.02 \times 10^{-4}$	$0.17 \times 10^{-4}$	$7.93 \times 10^{-4}$	$0.20 \times 10^{-4}$
<b>pH 4.77</b>	$5.13 \times 10^{-3}$	$0.10 \times 10^{-3}$	$4.85 \times 10^{-3}$	$0.10 \times 10^{-3}$	$3.92 \times 10^{-3}$	$0.09 \times 10^{-3}$	$4.14 \times 10^{-3}$	$0.08 \times 10^{-3}$
<b>pH 4.52</b>	$1.69 \times 10^{-2}$	$0.10 \times 10^{-2}$	$2.29 \times 10^{-2}$	$0.11 \times 10^{-2}$	$1.66 \times 10^{-2}$	$0.03 \times 10^{-2}$	$1.61 \times 10^{-2}$	$0.03 \times 10^{-2}$
<b>pH 4.26</b>	$3.92 \times 10^{-2}$	$0.48 \times 10^{-2}$	$3.75 \times 10^{-2}$	$0.49 \times 10^{-2}$	$4.38 \times 10^{-2}$	$0.20 \times 10^{-2}$	$4.13 \times 10^{-2}$	$0.23 \times 10^{-2}$

	Without (-)-Epicatechin				With (-)-Epicatechin	
	Trial 3				Trial 3	
	$k$ ( $\text{s}^{-1}$ )	SD ( $\text{s}^{-1}$ )	$(k_{\text{epi}} - k_{\text{no epi}}) / k_{\text{no epi}}$	$k_{\text{pH low}} / k_{\text{pH high}}$	$k$ ( $\text{s}^{-1}$ )	SD ( $\text{s}^{-1}$ )
<b>pH 5.01</b>	$6.45 \times 10^{-4}$	$0.22 \times 10^{-4}$	10%	7.0	$5.81 \times 10^{-4}$	$0.14 \times 10^{-4}$
<b>pH 4.77</b>	$4.50 \times 10^{-3}$	$0.10 \times 10^{-3}$	25%	2.6	$3.37 \times 10^{-3}$	$0.06 \times 10^{-3}$
<b>pH 4.52</b>	$1.18 \times 10^{-2}$	$0.02 \times 10^{-2}$	7%	3.7	$1.10 \times 10^{-2}$	$0.02 \times 10^{-2}$
<b>pH 4.26</b>	$4.31 \times 10^{-2}$	$0.07 \times 10^{-2}$			$4.92 \times 10^{-2}$	$0.10 \times 10^{-2}$



#### 4. Résultats complémentaires

Au cours de cette étude, notre objectif était d'évaluer l'influence de la lipolyse sur le taux de l'oxydation lipidique aux deux pH de digestion gastrique (pH 5 et pH 3) afin de compléter notre caractérisation des phénomènes pouvant se produire lors de la digestion gastrique. Ces résultats étant préliminaires, ils sont présentés en tant que résultats complémentaires à l'étude n°1.

##### 4.1. Mise au point de la détection en spectrométrie de masse des lipides présents dans l'huile de tournesol.

Le tableau 5 représente les paramètres MS qui ont permis l'identification des lipides présents au cours du modèle de digestion gastrique.

**Tableau 5 :** Molécules identifiées dans les extraits isopropanoliques d'émulsions à base d'huile de tournesol en présence de la lipase fongique (*Aspergillus Niger*, lipase A d'Amano).

Temps de rétention (min)	Masse molaire	MS [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup> [M+H] <sup>+</sup>	Fragment	Perte de neutre	Identification
<b>Acides gras libres (mode négatif [M-H]<sup>-</sup>)</b>						
0,83	280		279			<b>L</b>
1,0	256		255			<b>P</b>
1,1	282		281			<b>O</b>
1,55	284		283			<b>S</b>
<b>Diacylglycérols (mode positif)</b>						
7,5	616	634,3	617,3	337	280 (L)	<b>LL</b>
8,9	618	636,3	619,3	339 337	280 (L) 282 (O)	<b>LO</b>
8,9	592	610,3	593,3	337 313	256 (P) 280 (L)	<b>PL</b>
<b>Triacylglycérols (mode positif)</b>						
13,6	878,5	896,5	879,5	599	280 (L)	<b>LLL</b>
14,4	880,5	898,5	881,5	601 599	280 (L) 282 (O)	<b>OLL, LOL, LLO</b>
14,5	854	872	855	599 575	256 (P) 282(O)	<b>POO</b>

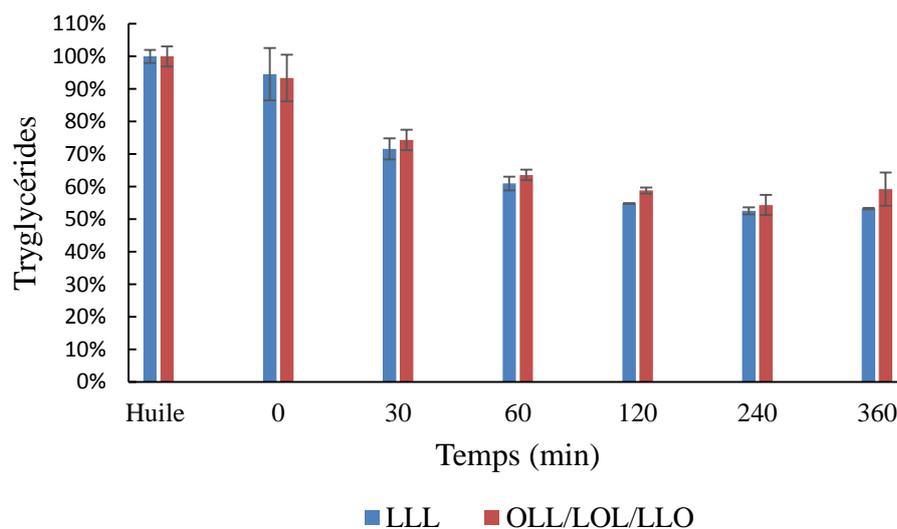
14,9	882	900,6	883	601 603	280 (L) 282 (O)	<b>OOL, OLO, LOO</b>
15	856	874,5	857	601 577 575	256 (P) 280 (L) 282 (O)	<b>POL</b>
15,4	884	902,6	885	605 603 601	280 (L) 282 (O) 284 (S)	<b>LOS</b>
15,5	884	902,6	885	603	280 (L)	<b>OOO</b>

**L** : acide linoléique, **O** : acide oléique, **P** : acide palmitique, **S** : acide stéarique. **POO**, **OOO**, **LOS**, **POL**, **OOL**, **OLO**, **LOO**, **LLL**, **OLL**, **LOL**, **LLO**, **LL**, **LO**, **PL** : combinaison des acides gras libres en di- ou triglycérides.

Cette méthode d'identification nous permet de suivre l'hydrolyse des TG (LLL, OLL, LOL, LLO, POO, OOL, OLO, LOO, POL, LOS, OOO, POO) par la lipase ainsi que l'apparition de certains diacylglycérol (LL, LO, PL) et des acides gras correspondant (L, O, P, S). Cependant, aucun monoacylglycérol n'a pu être détecté indiquant que seuls les TG ont pu être hydrolysés.

#### **4.2. Cinétique d'hydrolyse des TG de l'huile de tournesol en absence de pepsine.**

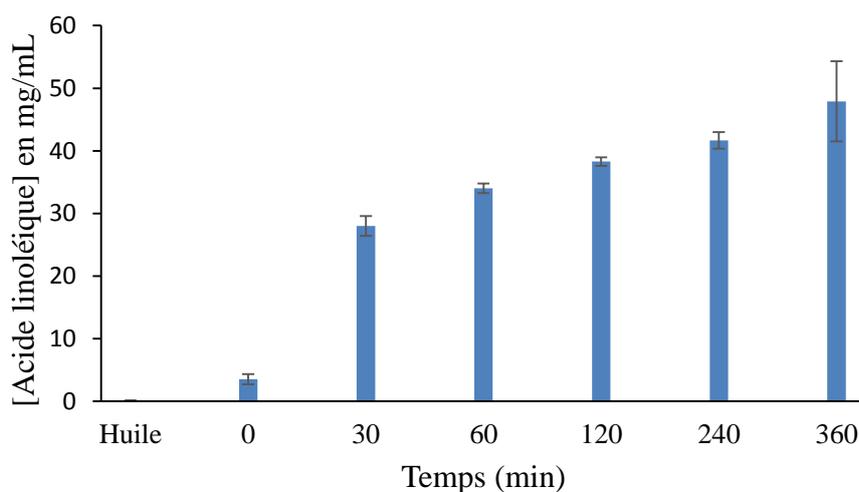
Afin de caractériser l'action de la lipase fongique utilisée dans ce modèle, nous avons suivi l'hydrolyse, à pH 5 et à pH 3 au cours du temps lors de la simulation de la digestion gastrique, des TG majoritaires de l'huile de tournesol (98-99 % de LLL et de LLO/LOL/OLL) (Figure 45).



**Figure 45 :** Taux résiduel des TG de l’huile de tournesol au cours de la simulation de digestion gastrique en présence de la lipase fongique à pH 5.

L : acide linoléique. O : acide oléique.

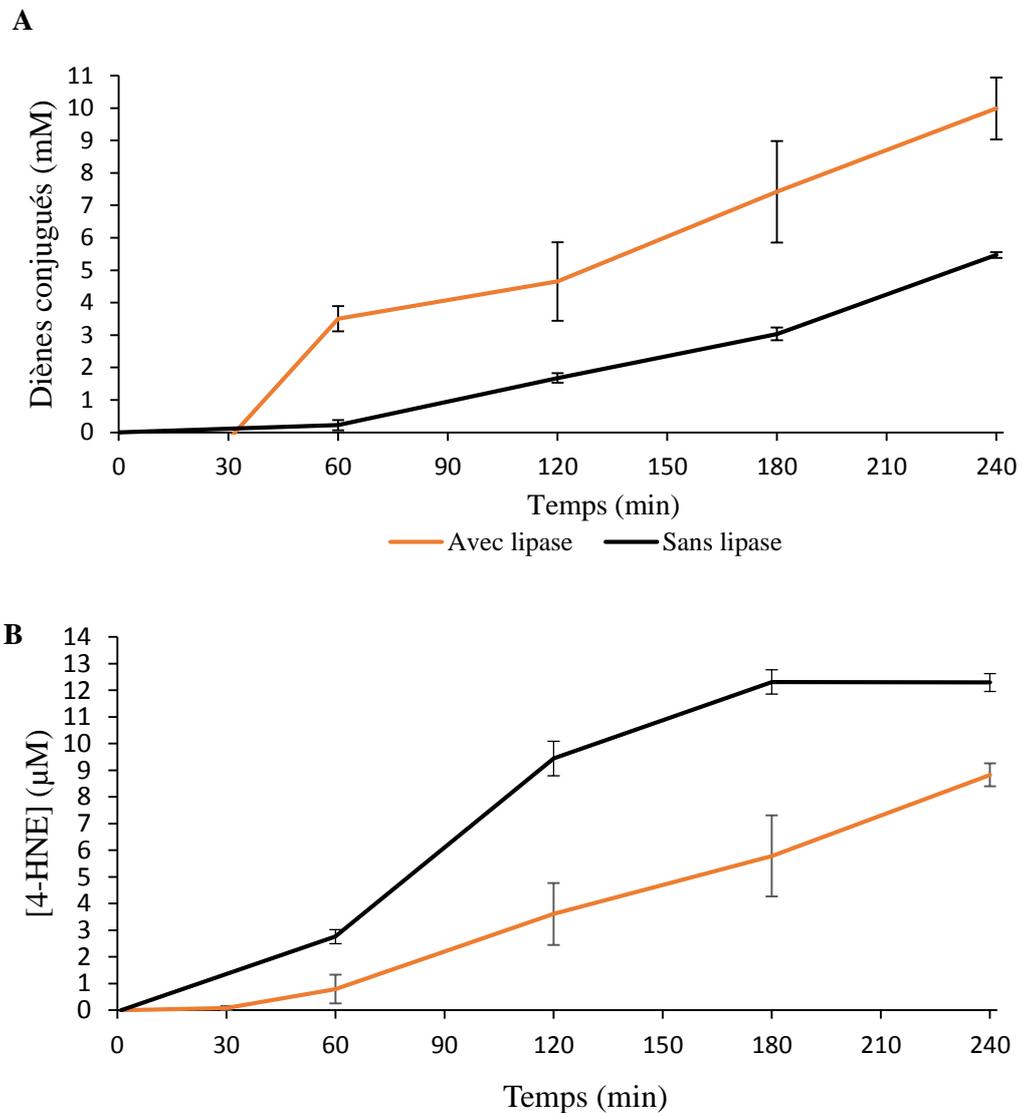
Les résultats indiquent une initiation rapide de l’hydrolyse des TG (temps 0 vs. 30 minutes). De plus, aucune différence n’a été observée sur le taux d’hydrolyse entre les émulsions à pH 5 et à pH 3 (données non montrées). Le taux résiduel des TG apparaissait se stabiliser après 120 min de digestion à 55% pour le LLL et à 59% pour LLO/LOL/OLL (Figure 45). La majorité de l’acide linoléique apparaît durant les 30 premières minutes (Figure 46).



**Figure 46 :** Apparition de l’acide linoléique au cours de la simulation de digestion gastrique en présence de la lipase fongique.

### 4.3. Effet de la lipase sur le taux d'oxydation lipidique dans le modèle de digestion gastrique en absence de pepsine.

✓ A pH 5



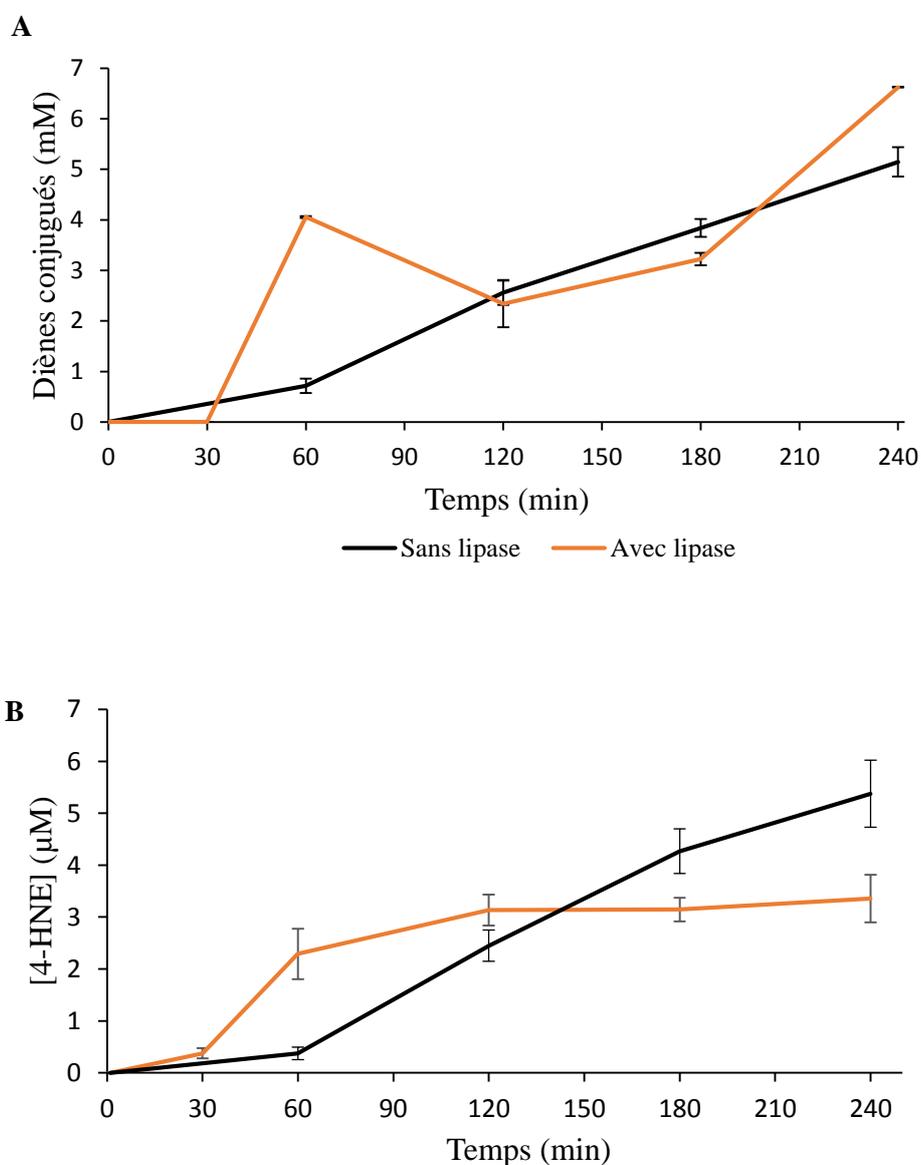
**Figure 47** : Evaluation de l'oxydation lipidique en modèle d'émulsion gastrique à pH 5 en présence ou non de la lipase.

(A) Diènes conjugués; (B) 4-HNE.

Dans le cas d'une simulation de digestion simple contenant uniquement le pro-oxydant sous forme de métmyoglobine à pH 5, nos résultats montrent qu'en présence de lipase, à un pH proche de son pH optimum d'activité de 6,5, la concentration en diènes conjugués après une

phase de latence de 30 minutes était supérieure à celle de l'expérience témoin (sans lipase, Figure 47A). Il est à noter qu'en présence de lipase, la concentration des diènes conjugués est néanmoins sous-estimée car nous avons pu observer par spectroscopie à 210 nm qu'à partir de 180 minutes de digestion la quantité de lipides totaux présents dans le prélèvement était divisée par 2. A l'inverse, l'accumulation de 4-HNE était inférieure à celle de l'expérience témoin (Figure 47B). La forte réactivité du 4-HNE avec les protéines conduit probablement à sous-estimer l'apparition de ce marqueur et pourrait expliquer en partie l'inversion des courbes entre les deux marqueurs d'oxydation lipidique. Ce même comportement apparemment contradictoire avait été observé après ajout d'une autre protéine, la pepsine, qui augmente le caractère pro-oxydant de la méthyoglobine. A pH 5, l'hydrolyse rapide des TG pourrait entraîner le positionnement des acides gras libérés, du fait de leur plus faible hydrophobicité, à la surface de la gouttelette lipidique. Ainsi, la phase d'initiation de l'oxydation lipidique pourrait être facilitée par une meilleure interaction de l'acide gras libre avec le pro-oxydant présent à l'interface.

✓ A pH 3



**Figure 48** : Evaluation de l'oxydation lipidique en modèle d'émulsion gastrique à pH 3 en présence ou non de la lipase.

(A) Diènes conjugués; (B) 4-HNE.

Dans le cas d'une émulsion à pH 3, la concentration en diènes conjugués et en 4-HNE est supérieure en début de digestion (60 minutes) en présence de lipase indiquant également une oxydabilité supérieure des lipides émulsionnés. L'accumulation chaotique des diènes conjugués est expliquée par le déphasage de l'émulsion et des prélèvements très appauvris en lipides dès

120 min. Ainsi, la formation des deux marqueurs apparaît largement sous-estimée puisqu'ils ont été analysés à partir du même échantillon (Figure 48B).

D'autres études s'avèrent nécessaires pour comprendre l'impact de la lipase sur l'oxydation de lipides émulsifiés lors d'une simulation de digestion gastrique. Si les émulsions démixent, un design différent de l'expérimentation est nécessaire, en particulier à travers l'utilisation d'un milieu par temps de cinétique qui serait complètement traité à l'isopropanol pour doser de manière quantitative les lipides totaux, les diènes conjugués et le 4-HNE. Lorsque de cette mise au point, des essais pourront être envisagés avec la lipase gastrique humaine régiosélective pour la position sn-3 (lipase fongique régiosélective en sn-1,3) ou la lipase gastrique de lapin, très proche, devenue récemment commercialement disponible et qui serait aussi plus adaptée qu'une lipase fongique (Sams et al. 2016).

## Etude n°2

Apple polyphenols decrease post-prandial oxidative stress in the *in vitro* digestion of a Western-type diet.

---

Les polyphénols de pomme (*Reinette de Flandre*) réduisent l'oxydation lipidique au cours de la digestion gastro-intestinale *in vitro* d'un repas occidental.

Gaëtan Boléa, Christian Ginies, Claire Dufour

*(En préparation)*

## I. Etude n°2

### 1. Contexte scientifique

Un repas de type occidental est caractérisé par une surconsommation de AGPI n-6 qui sont sensibles à l'oxydation initiée par le fer héminique apporté par la viande rouge au niveau du tractus gastro-intestinal. Cette oxydation est à l'origine de la formation d'un aldéhyde  $\alpha,\beta$ -insaturé, spécifique des AGPI n-6, le 4-HNE. Ce dernier, qui est génotoxique et cytotoxique, est retrouvé dans de nombreuses pathologies présentant un stress oxydant ou une inflammation chronique (neurodégénérative, cardiovasculaire ou cancer). Après absorption rapide au niveau intestinal, l'incorporation de produits d'oxydation comme le 4-HNE dans des lipoprotéines de basse densité pour former les LDLox est associé à un dysfonctionnement endothélial et au développement de l'athérosclérose. Limiter la formation de ces produits d'oxydation dans le tractus gastro-intestinal apparaît essentiel et une des stratégies pourrait être une supplémentation alimentaire riche en antioxydants. En effet, des méta-analyses ont à plusieurs reprises indiqué une relation inverse entre une maladie coronarienne ou un accident vasculaire cérébral et la consommation de fruits et légumes. Les PCs contribuent pour plus de 80% aux polyphénols de la pomme et ont été montrées comme capables de réduire le stress oxydant, le taux de LDLox, les maladies coronariennes et de protéger la fonction vasculaire. Par ailleurs, il existe une forte affinité des PCs pour les protéines et les fibres alimentaires, ce qui peut être un facteur affectant la bioaccessibilité de ces polyphénols *in vivo*.

### 2. Objectif

**L'objectif de cette seconde étude sera dans un premier temps d'évaluer l'oxydation lipidique d'origine alimentaire initiée par la métmyoglobine dans un modèle de digestion gastro-intestinale *in vitro* à partir d'un repas de type occidental. Dans un second temps, le potentiel antioxydant d'une supplémentation riche en PCs sous différentes formes de matrice (fruit frais, purée ou extrait phénolique) comme stratégie de prévention contre l'oxydation lipidique durant la digestion sera évalué.**

### 3. Résumé

*Méthodologie.* Dans cette étude, nous avons simulé la digestion gastro-intestinale d'un repas de type occidental par la co-digestion d'une émulsion à 10% d'huile de tournesol dans l'eau en présence d'un pro-oxydant, la myoglobine (20  $\mu\text{M}$  au final) dans des conditions mimant au mieux la physiologie de la digestion. Ces émulsions ont été supplémentées ou non avec les différentes matrices de pomme (100  $\mu\text{M}$  équiv. polyphénols pour les matrices extrait phénolique et purée et 133  $\mu\text{M}$  pour le fruit frais). Afin de mimer le transport plus ou moins rapide de l'aliment vers le duodénum, deux conditions de digestion gastrique ont été mises en œuvre : 2 h à pH 5 en présence de pepsine (1000 U/mL) et un abaissement du pH de 5 vers 3 après 1 h de simulation de digestion. Le passage en phase intestinale a été réalisé par ajout de bile (10 mM en sels biliaires) et de pancréatine (100 U de trypsine/mL) et un ajustement du pH à 6,5. Durant ces digestions *in vitro*, l'ampleur de l'oxydation lipidique ainsi que la bioaccessibilité des polyphénols ont été évaluées.

*Résultats majeurs.* Ce travail a permis de mettre en évidence que la diminution de pH de 5 vers 3 au cours de la digestion gastrique réduisait fortement l'accumulation du marqueur primaire de l'oxydation lipidique (diènes conjugués lipidiques). En phase intestinale, la formation des diènes conjugués se poursuit à des vitesses relativement proches. Cependant, aucune différence d'accumulation du marqueur secondaire (4-HNE), libre et potentiellement absorbable, n'a été observée à la fin des phases gastrique et intestinale. Ceci est potentiellement dû à une réactivité différente du 4-HNE libre avec les protéines (enzymes de digestion, myoglobine) qui conduit par ailleurs à sous-estimer de manière générale sa formation. Sur le plan antioxydant, les trois matrices de pomme inhibaient totalement l'accumulation des diènes conjugués en phase gastrique et très efficacement celle du 4-HNE en fin de phase gastrique (73-96%) et intestinale (60-95%). De même, l'épicatéchine choisie comme PC de référence semblait plus efficace sur la réduction de l'accumulation de 4-HNE en fin de phase gastrique (96-97%) qu'en fin de phase intestinale (36-44%). En outre, la bioaccessibilité initiale des composés phénoliques monomériques a été évaluée montrant une grande similarité entre les matrices purée (67%) et extrait phénolique (89%) par rapport aux pommes fraîches (34%). En revanche, la bioaccessibilité du dimère B2 était généralement inférieure à la bioaccessibilité moyenne dans les différentes matrices, ce qui suggère une liaison non-covalente aux pectines de pomme ou aux protéines. **Cette seconde étude a permis de mettre en évidence que l'oxydation lipidique pouvait avoir lieu dans les deux compartiments digestifs entraînant l'apparition de 4-HNE. De plus, une supplémentation riche en PCs pourrait limiter la formation de**

**produits d'oxydation lipidique nocifs et absorbables (4-HNE) directement dans le tractus digestif, protégeant à long terme la fonction vasculaire.**

## **Apple polyphenols decrease post-prandial oxidative stress in the in vitro digestion of a Western-type diet.**

G. BOLEA<sup>1,2</sup>, C. GINIES<sup>1</sup> C. DUFOUR<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UMR408 SQPOV “Safety and Quality of Plant Products”, INRA, University of Avignon, F-84000 Avignon, France.

<sup>2</sup>EA4278 LaPEC “Laboratory of Cardiovascular Pharm-ecology”, University of Avignon, F-84000 Avignon France.

### **Financial support**

The study was granted by the Foundation of Avignon University.

### **Acknowledgments**

Gaëtan Boléa acknowledges the Foundation of Avignon University for PhD grant. We gratefully thank Mrs Christine Boutin (Bio verger, Ambricourt, France) for the kind gift of apple *Reinette de Flandre*.

### **Disclosures**

No author reports conflict of interest and no competing financial interest

### **Corresponding author:**

\*C. DUFOUR

UMR408 SQPOV “Safety and Quality of Plant Products”

INRA,

228, route de l'aérodrome, CS 40509 - 84914 Avignon cedex 9

Phone: (+ 33) 4 32 72 25 15 /Fax: (+ 33) 4 32 72 24 92

E-mail : [claire.dufour@inra.fr](mailto:claire.dufour@inra.fr)

## Abstract

The Western diet brings elevated levels of n-6 polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA) which are markedly prone to oxidation by heme iron of red meat. Lipid oxidation products such 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), a specific genotoxic and cytotoxic  $\alpha,\beta$ -unsaturated hydroxyalkenal generated from n-6 PUFA, are readily absorbed in the gastrointestinal tract and incorporated into low density lipoproteins (LDL). LDL oxidation is a key step in the endothelial dysfunction and atheromatous plaque formation. Limiting the formation of this oxidation product in the gastrointestinal tract appears essential and the enrichment of the diet in antioxidant phytochemicals could be a strategy. The aim of this study is to evaluate lipid oxidation and its inhibition by a supplementation in procyanidins under various apple forms (fresh apple, puree, polyphenol extract) to a Western-type diet in simulated gastrointestinal digestion. Our results showed that the decrease in pH, from 5 to 3, during gastric digestion strongly reduced the accumulation of lipid-derived conjugated dienes (CD) before the restart in intestinal phase. However, no difference regarding the accumulation of free and potentially absorbable 4-HNE was observed between the end of the gastric and intestinal phases probably due to the reaction of 4-HNE with proteins (pancreatic enzymes). By contrast, the three apple matrices totally inhibited the accumulation of CD in the gastric phase and very effectively that of 4-HNE at the end of the gastric (73-96%) and intestinal (60-95%) phases. Similarly, epicatechin, chosen as a procyanidin reference, was more effective at reducing the 4-HNE accumulation at the end of the gastric step (96-97%) than that at the end of the intestinal phase (36-44%). In addition, the initial average bioaccessibilities for phenolic compounds appeared closer for puree (67%) and the phenolic extract (89%) than for fresh apple (34%). Besides, the bioaccessibility of dimer B2 was generally lower than the corresponding overall bioaccessibility for each matrix, suggesting a non-covalent interaction between B2 and pectins or proteins.

These results, which should be confirmed *in vivo*, provide a dietary strategy for the protection of the endothelial function and against atherosclerosis development, simply by increasing the consumption of plant products rich in phenolic compounds.

**Keywords:** lipid oxidation, 4-hydroxy-2-nonenal, *in vitro* gastrointestinal digestion, apple, antioxidant, procyanidin.

## INTRODUCTION

The Western diet brings elevated levels of n-6 polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA) which are sensitive to heme iron-initiated oxidation in the gastric tract where food is exposed to postprandial stress (Baron and Andersen, 2002; Lorrain et al., 2012; Vulcain et al., 2005). In a previous study, Gobert et al. reported an increased concentration of MDA (as TBARS) in the gastric tract of minipigs fed with a Western-type diet (Gobert et al., 2014). Lipid oxidation products are readily absorbed in the gastrointestinal tract and incorporated into chylomicrons and then low density lipoproteins (LDL) (Staprans et al., 1994). Among lipid oxidation products, 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), a specific genotoxic and cytotoxic  $\alpha,\beta$ -unsaturated hydroxyalkenal generated from n-6 PUFA, was found in some diseases with chronic oxidative stress and inflammation (cardiovascular, cancer and neurodegeneration) (Chapple et al., 2013). Moreover, [ $^3\text{H}$ ]-4-HNE administered by intra-gastric gavage to rats proved to be absorbable and further metabolized as shown by the identification of 22 urinary metabolites (Keller et al., 2015). In vascular pathology, this reactive aldehyde contributes to the atherogenicity of oxidized LDL (oxLDL) by forming 4-HNE-apoB adducts through Michael addition or Schiff base with free amino acids (cysteine, lysine, histidine) (Negre-Salvayre et al., 2017). LDL oxidation is a key step in the atheromatous plaque formation by activation of the scavenger receptor pathway of macrophagic cells that leads to the formation of foam cells (Staprans et al., 2005). Limiting the formation of oxidation products in the gastrointestinal tract appears as a major challenge and one strategy could be the co-ingestion of food antioxidants. Polyphenols are secondary metabolites largely distributed in fruits, vegetables and cereals and appear to be the most abundant antioxidants in the human diet (Arts and Hollman, 2005). Meta-analyses have repeatedly indicated an inverse relationship between coronary artery disease or stroke and the consumption of fruit and vegetables (Aune et al., 2017; He et al., 2006; Zhan et al., 2017). Part of this cardiovascular health benefit could be attributed to flavonoids, the major class of phytochemicals in fruit and vegetables (Hooper et al., 2008; Kay et al., 2012). Apple is the most consumed fruit in Western countries and display markedly high contents in procyanidins (PCs) (Ceymann et al., 2012; Wojdylo et al., 2008). Although hydroxycinnamic acids, flavonols, dihydrochalcones are present in varying levels, monomeric and oligomeric PCs contribute for more than 80% to the phenolic pool. PCs are known to reduce oxidative stress, LDLox as well as coronary diseases and protect vascular function (Dauchet et al., 2006). Their catechol subunit can reduce hypervalent heme iron form of myoglobin ( $\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) as well as chelate free iron thus protecting oil-in-water emulsions against lipid oxidation in the gastric tract

(Lorrain et al., 2012). However, lipid oxidation and its inhibition by the simultaneous ingestion of polyphenol-rich fruits during both gastric and intestinal phases have to be established. The primary aim of this study is to evaluate the extent of lipid oxidation in both simulated digestion phases using an oil-in-water emulsion as food model. Then, the antioxidant potential of apple polyphenols added under various matrix forms (fresh apple, puree, polyphenol extract) to a Western-type diet will be assessed along with their bioaccessibility to shed some light on the underlying mechanisms.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals and Solvents**

*Chemicals:* Horse heart myoglobin (M1882, type II), (-)-epicatechin, porcine pepsin (P6887, 2829 U/mg), 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), porcine pancreatin (P7545, trypsin activity 2.8 U/mg), porcine bile extract (B8631) and ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocopherol (T-3251) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Polyphenol standards, (-)-epicatechin, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, phloridzin dihydrate and isoquercitrin were from Sigma-Aldrich. 4-Hydroxy-2-nonenal (32100) was purchased from Bertin pharma (Montigny le Bretonneux, France). *Trans*-2-octenal (W32, 150-8-K) and pentanal (42272) were purchased from Sigma-Aldrich. Hexanal (21520), *trans*-2-heptenal (00502), egg yolk L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (P3556, PL), were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Analysis of the PL showed the presence of phosphatidylcholine (33%), phosphatidylethanolamine (13%), sphingomyelin (3%), phosphatidylinositol (2%), and lysophosphatidylcholine (2%) along with a neutral fraction containing triacylglycerols (47%).

*Solvents:* HPLC-MS grade methanol, acetonitrile, acetone, hexane, toluene, 2-propanol were from Fisher Scientific (Illkirch, France); formic acid from Merck (Darmstadt, Germany), and hydrochloric acid from Sigma-Aldrich. Ultrapure water (resistivity 18.2 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup> at 25 °C) was obtained with a Millipore OPak 2 (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA).

## Characterization of sunflower oil

Sunflower oil (Leclerc, lotA21815, 2015) was used as a source of dietary lipids. Characterization of sunflower oil was carried by GC-FID as in Bolea et al. (Submitted 2019) (Bolea et al., Submitted 2019). Briefly, this sunflower oil contained 9.8% of saturated fatty acids (6.3% C16; 3.3% C18; 0.2% C20), 27.8% of monounsaturated fatty acids (0.1% C16:1; 27.0% C18:1n-9; 0.6% C18:1n-7; 0.1% C20:1) and 62.4% of polyunsaturated fatty acids (62.4% C18:2; 0.01% C18:3). ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocopherol was detected by UPLC coupled to a fluorometric detector (excitation 290 nm; emission 330 nm) and found to amount to 665 ppm.

## Apple polyphenols

Fresh apples (*Reinette de Flandre*) were collected from an organic orchard in Ambricourt in Northern France in autumn 2015. Apples were stored in a cold room at 4 °C before use. Polyphenol identification in fresh apple as well as preparation and characterization of matrices puree and phenolic extract were previously described by Bolea et al. (Submitted 2019) (Bolea et al., Submitted 2019). Contents in main phenolic classes and characterization of flavan-3-ols for the different apple matrices are presented in Table 1.

## Preparation of simulated digestion fluids and oil-in-water-emulsions

The composition of simulated digestion fluids, Simulated Salivary Fluid (SSF, oral phase), Simulated Gastric Fluid (SGF, gastric phase) and Simulated Intestinal Fluid (SIF, intestinal phase) is given below. This composition is based on human *in vivo* data as reported by Minekus et al. (2014).  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  at 0.1 M is not added to the other electrolytes because a precipitation may occur.

Electrolytes	SSF (pH 7) mmol.L <sup>-1</sup>	SGF (pH 5) mmol.L <sup>-1</sup>	SIF (pH 6.5) mmol.L <sup>-1</sup>
KCl	15.1	6.9	6.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.7	0.9	0.8
NaHCO <sub>3</sub>	13.6	25	85
NaCl	-	42.2	38.4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0.15	0.1	0.33
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0.06	0.5	-

All the solutions of simulated digestion fluids were prepared in ultrapure water. The physical state of lipids during digestion (triacylglycerols) was simulated by a 10% oil-in-water emulsion stabilized by egg yolk L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PL). In a 60 mL short-necked glass bottle, 4 g of sunflower oil were added to 100 mg of PL previously dispersed in 36 mL of SGF. The PL dispersion was achieved using a rotor stator homogenizer (SilentCrusher M-01, Heidolph) at 24000 rpm for 2 min at room temperature. The mixed oil and aqueous phases were then homogenized at 24000 rpm for 2 min. The resulting emulsion was sonicated for 8 periods of 30 s with a rest interval of 30 s and an amplitude of 40% on ice (Q700, QSonica, 20 kHz).

### ***In vitro* gastrointestinal digestion**

*Gastric Phase.* Two different pH conditions were evaluated for the gastric digestion phase: 1) 1 h at pH 5 to simulate the early gastric digestion step, and 1 h at pH 3 for the mid-course of digestion, or 2) 2 h at pH 5 to simulate the part of food rapidly emptied into the duodenum. For the digestion, 12.5 ml of the fine emulsion were transferred into a 50 mL round-bottom flask. One mL of pepsin, initially prepared as a 5.35 mg/mL solution in SGF, was added to ensure a final concentration of 1000 U/mL, followed by 112.5  $\mu$ L of a 0.1 M solution of CaCl<sub>2</sub>. Lipid oxidation was started by the addition of 1.5 mL of a 200  $\mu$ M metmyoglobin solution prepared in ultrapure water ( $\epsilon= 7700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 525 nm) (Mikkelsen and Skibsted, 1995). The pH was adjusted to 5 by addition of 1 N HCl before metmyoglobin was added. After the first hour, the pH was adjusted to 3 by addition of 1 M HCl (19  $\mu$ L) or left at 5 for one more hour. Punched Parafilm was used to protect the digestion system during the incubation in an oven at 37 °C under constant magnetic stirring at 280 rpm. To evaluate the effect of antioxidants, epicatechin (100  $\mu$ M), puree or phenolic extract (100  $\mu$ M eq. polyphenols), fresh apple (133  $\mu$ M eq. polyphenols) were added in the digestion system before metmyoglobin. For antioxidant evaluation, 150  $\mu$ L of a 10 mM (-)-epicatechin solution in methanol were added to the emulsion (100  $\mu$ M final) or replaced by 150  $\mu$ L of methanol in control experiments. For the phenolic extract, 111 mg of the dry extract were first solubilized in 1 mL of the appropriate buffer (10 mM in total phenolic compounds) before the addition of 150  $\mu$ L to the emulsion. Puree (124 mg) was directly added in the emulsion to reach 100  $\mu$ M final in phenolic compounds. Mastication of fresh apple as in the oral phase was obtained by grinding in a domestic grinder (Valentin, Seb), during 3 seconds, 60 g of 3 apples freshly cut in 24 pieces in the presence of SSF (30 g). A final concentration of 133  $\mu$ M in phenolic compounds was obtained by adding 215 mg of this mixture to the emulsion. During the two hours of gastric digestion, 200  $\mu$ L of

the gastric mixture were sampled at t=0, 30, 60, 90, 120 min and diluted in 2-propanol (1:6). Then, samples were centrifuged at 16200 g for 5 min (4 °C). Supernatant was used to assess lipid oxidation (CD, 4-HNE only in end of phase), (-)-epicatechin and (±)- $\alpha$ -tocopherol. At each time point, another aliquot of 700  $\mu$ L was sampled and directly centrifuged (16200 g, 5 min, 4 °C). Supernatant was filtered and stored at -80 °C before analysis of the bioaccessibility of apple polyphenols.

*Intestinal Phase.* The remaining 10.5 mL of the gastric mixture were diluted with 10.5 mL of intestinal fluids (1:1 dilution). The intestinal fluids were constituted by 5 mL of a porcine bile extract in SIF (21 mg/mL, final concentration of ca. 10 mM in bile salts) and 5.5 mL of a porcine pancreatin solution in SIF (138 mg/mL, [pancreatin]<sub>final</sub> = 100 U trypsin/mL) and 63  $\mu$ L of 0.1 M CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>. The pH of the intestinal phase was adjusted to 6.5 by addition of 1 N HCl (250-300  $\mu$ L). Incubation and sampling were kept as before for another two hours.

### **Determination of lipid oxidation products**

The accumulation of lipid-derived conjugated dienes was followed for 4 hours (2 h in gastric phase and 2 h in intestinal phase). Briefly, after an appropriate dilution of the supernatant by a factor 11, 21 or 41 in 2-propanol (2 mL), the concentration in conjugated dienes (CD) was determined by measuring the absorbance at 234 nm (HP 8453 diode-array spectrometer; optical path length 1 cm for quartz cuve). The molar absorption coefficient used for CD was 27000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> as for conjugated linoleyl hydroperoxides (Pryor and Castle, 1984). The secondary oxidation product 4-HNE and other aldehydes formed during simulated digestion were quantified in the supernatant after derivatization with DNPH, separation in an UPLC/DAD/ESI-MSn system and quantification by MRM as previously described by Bolea et al. (Submitted 2019) (Bolea et al., Submitted 2019). Pentanal, ion 265 fragmented to 163 (retention time 4.36 min). Hexanal, ion 279 fragmented to ion 163 (retention time 5.15 min). 2-heptenal, ion 291 fragmented to ion 163 (retention time 5.60 min). 2-octenal, ion 305 fragmented to ion 163 (retention time 6.30 min). All samples were injected in triplicate.

To evaluate the influence of the matrix on the absorbance at 234 nm, experiments were conducted without oil for the puree and phenolic extract matrices (fresh apple no longer available). The oil was replaced by SGF and the experiment run as previously described. Indeed, the matrix contributed to the absorbance leading to an almost linear build-up at 234 nm

in the intestinal phase only. Data for conjugated dienes are presented corrected from the blank without oil for puree and phenolic extract (no correction for fresh fruit).

### **Determination of polyphenol bioaccessibility**

Polyphenol bioaccessibility was determined as the content in phenolic compounds in the aqueous phase of the emulsions at the beginning of the simulated gastric digestion. A 500  $\mu$ L aliquot of the emulsion was centrifuged at 16000 g for 5 min at 4 °C. The supernatant was stored at -20 °C before analysis of the phenolic compounds as described by Bolea et al. (Submitted 2019) (Bolea et al., Submitted 2019). For quantification, a 5 point-calibration was run in UPLC/DAD with phenolic standards in methanol. Monomeric (epicatechin and catechin) and oligomeric procyanidins were quantified as epicatechin equivalent (280 nm), chlorogenic acid (320 nm), *p*-coumaroyl derivatives as *p*-coumaric acid equivalent (320 nm), dihydrochalcones as phloridzin equivalent (280 nm) and flavonols as isoquercitrin equivalent (350 nm). All samples were injected in triplicate.

### **Analyses of ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocopherol and (-)-epicatechin**

The remaining supernatant for CD measurement stored at -20 °C was used for analysis of ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocopherol and (-)-epicatechin. Separation and quantification were performed by UPLC as described by Bolea et al. (Submitted 2019) (Bolea et al., Submitted 2019). (-)-Epicatechin was detected by absorption at 280 nm and ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocopherol by fluorometry (excitation 290 nm; emission 330 nm). All analyses were run at least in triplicate.

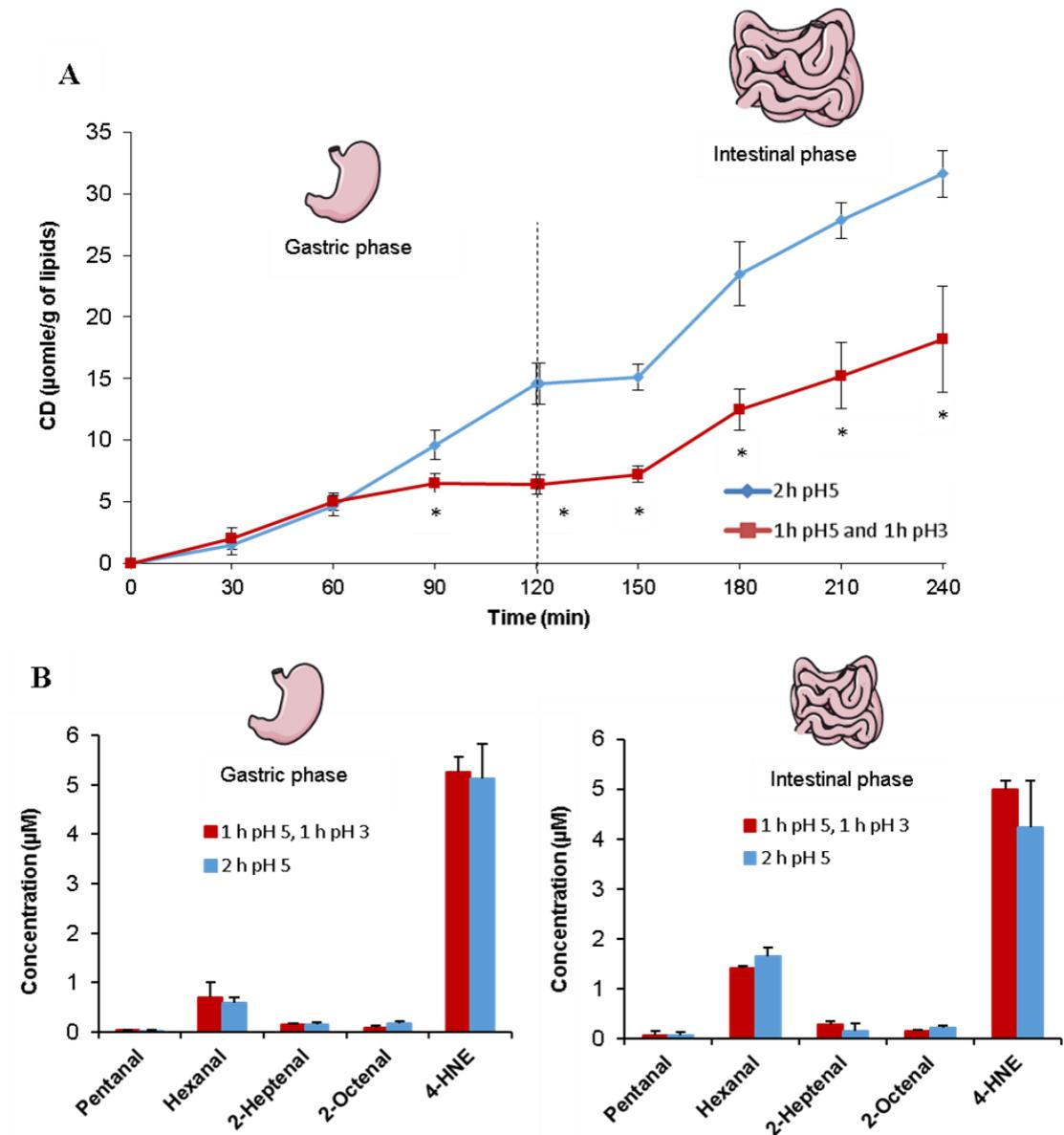
### **Statistical Analyses**

All the results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to test the effect of variation factors. If significant effects were found, ANOVA at a 95% confidence level, ANOVA was followed by a Tukey-Kramer post hoc test to identify differences among groups (XLStat software, version 2013, Addinsoft SARL, Paris, France).

## RESULTS

### **Lipid oxidation during gastrointestinal digestion.**

Lipid-derived CD are primary markers of lipid oxidation consisting mainly of highly reactive lipid-derived hydroperoxides formed in the propagation step of the lipid oxidation process. They were kinetically assessed in two different conditions for the gastric step (1 h at pH 5 then 1 h at pH 3 vs. 2 h at pH 5) and one single intestinal condition (2 h at pH 6.5). In the gastric phase, lipid oxidation readily started without any lag phase and CD accumulated in a linear manner during the first hour at pH 5 (Fig. 1A). The decrease in pH from pH 5 to 3 nearly stopped lipid oxidation. In the intestinal phase, a 30 min-long lag phase was observed after which lipid oxidation resumed at almost similar rates whatever the conditions for the gastric step. Then, we evaluated several lipid-derived aldehydes as secondary lipid oxidation products. The major aldehydes detected at the end of both gastric and intestinal phases were 4-HNE followed by hexanal (Fig. 1B). Pentanal, 2-heptenal and 2-octenal were very only formed in limited amounts and evaluated at the limit of the detection threshold in UPLC/MS. The final 4-HNE concentration in the intestinal phase was expressed at the same dilution level as in the gastric step (x2) to allow comparison. No significant difference was observed between aldehyde contents after both gastric conditions although CD formation patterns were significantly different (Fig. 1B). In addition, aldehydes appeared not to be formed in the intestinal phase except hexanal.



**Figure 1.** Lipid oxidation during simulated gastrointestinal digestion. Follow-up of accumulating conjugated dienes (CD) during digestion process (A) and aldehyde concentrations at the end of the gastric and intestinal phases (B) in phospholipid-stabilized emulsions in both gastric conditions (2 h pH 5 vs. 1 h pH 5 and 1 h pH 3). \* $P < 0.05$ . Values represented mean  $\pm$  SD ( $n = 4 - 5$ ).

### **Bioaccessibility of apple phenolic compounds in various matrices**

The three different matrices (fresh apple, puree, phenolic extract) present similar composition in phenolic compounds (Table 1). The bioaccessibility of apple phenolic compounds was evaluated at the initial time of the simulated digestion (Table 2). Bioaccessible phenolic compounds are the molecules freely present in the aqueous phase after separation of the aqueous and lipid phases of the emulsion. Overall recovery yields were 89%, 67% and 34% for the phenolic extract, puree and fresh apple, respectively. Chlorogenic acid, phloretin-2'-xyloglucoside and 4-*p*-coumaroylquinic acid proved to be highly bioaccessible compared to epicatechin and phloretin-2'-glucoside. Additionally, dimer B2, which is the major PC dimer in apple, has lower bioaccessibilities (1-40%) than the epicatechin monomer (20-89%) in the different matrices.

**Table 1.** Relative composition (% weight) for main phenolic compounds and classes, characterization of flavan-3-ols and overall polyphenol content for the different apple matrices determined by HPLC following thioacidolysis.

Matrix	Monomeric procyanidins		Oligomeric procyanidins	mDP	Procyanidin characterization				Hydroxycinnamic acids		Dihydrochalcones		Flavonols	Overall content in g/kg (mmol/kg)
	CAT	EPI			Term. units (%)		Ext. units (%)		5-CQ	4-pCou	Phln	Phlx		
<b>Fresh Apple</b>	1.2 ± 0.2	5.6 ± 0.2	70.0 ± 2.2	5.4 ± 0.1	2.6 ± 0.4	8.0 ± 0.2	-	89.4 ± 0.6	18.9 ± 1.0	0.52 ± 0.01	1.8 ± 0.4	0.75 ± 0.03	1.4 ± 0.1	4.31 ± 0.1 (14.2 ± 0.4)
<b>Puree</b>	1.2 ± 0.2	3.8 ± 0.6	70.6 ± 4.1	5.3 ± 0.2	1.9 ± 0.3	11.1 ± 0.9	-	86.9 ± 1.2	18.8 ± 0.4	0.66 ± 0.01	2.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	3.75 ± 0.1 (12.2 ± 0.5)
<b>Phenolic extract</b>	0.43 ± 0.04	4.3 ± 0.4	70.2 ± 3.3	4.7 ± 0.1	3.7 ± 0.1	12.5 ± 0.3	-	83.7 ± 0.3	19.8 ± 0.7	0.76 ± 0.03	2.3 ± 0.2	0.55 ± 0.05	1.7 ± 0.2	27.2 ± 1.2 (88.9 ± 4.0)

CAT: (+)-catechin, EPI: (-)-epicatechin, flavonols in equivalent quercetin, mDP: mean degree of polymerization of monomeric and oligomeric procyanidins, 5-CQ: 5-caffeoylquinic acid, 4-pCou: 4-*p*-coumaroylquinic acid, Phln: Phloretin-2'-O-glucoside, Phlx: Phloretin-2'-O-xyloglucoside. Term. units: Terminal units, Ext. units: Extension units. Overall content in g or mmol/kg FM for apple fruit and puree and in g or mmol/kg DM for the extract. Values represent Mean ± SD (*n* = 3).

**Table 2.** Initial bioaccessibility of apple phenolic compounds for the different matrices in phospholipid-stabilized emulsions. Recovery yields given at T0 in %. Polyphenol concentration = 100  $\mu$ M for puree, phenolic extract, epicatechin and 133  $\mu$ M for fresh apple.

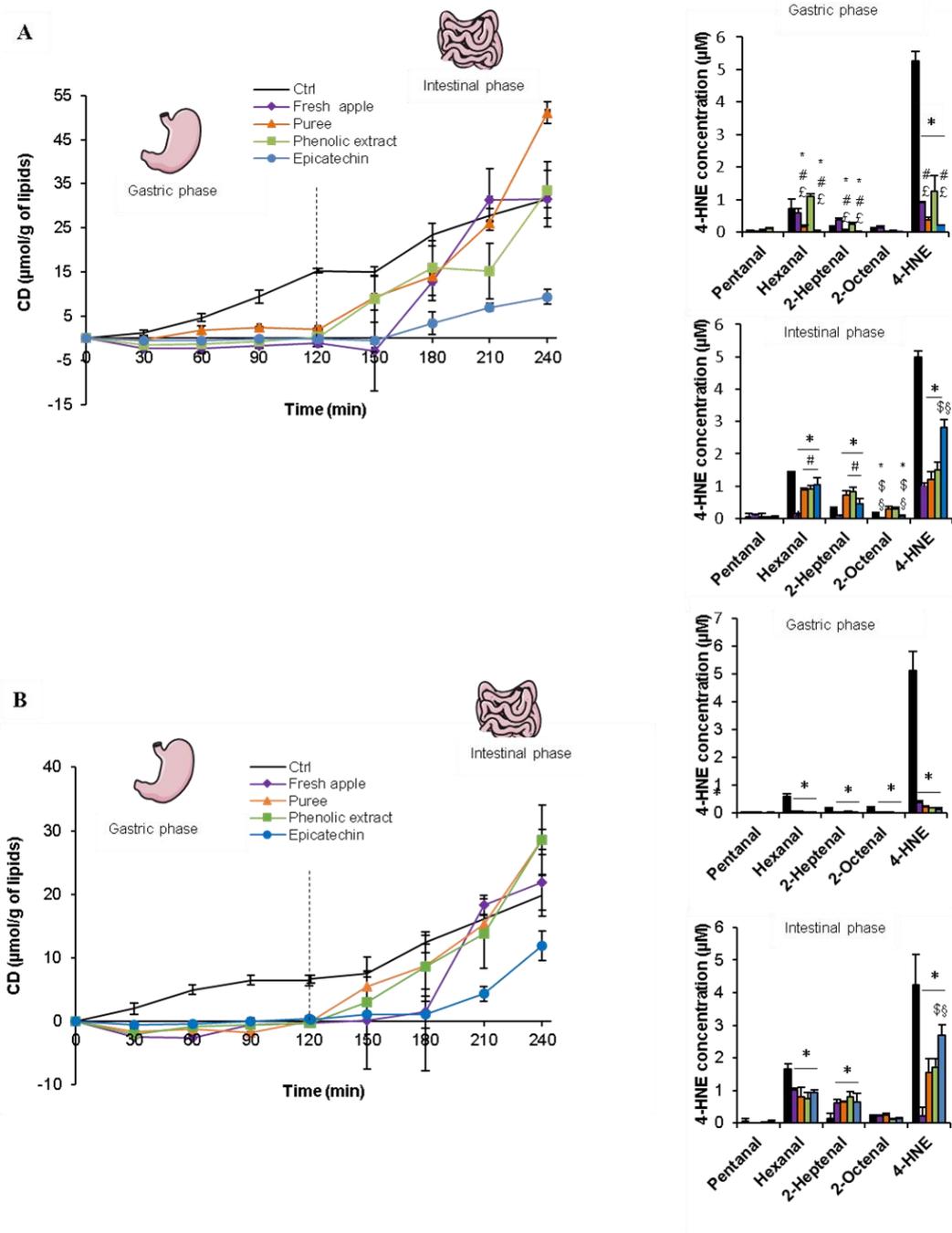
Matrix	Flavanols		Hydroxycinnamic Acids		Dihydrochalcones		Flavonols	Total Polyphenols (%)
	Epicatechin	Dimer B2	5-CQ	4-pCou	Phln	Phlx		
<b>Fresh Apple</b>	20 $\pm$ 17	1 $\pm$ 0	47 $\pm$ 20	12 $\pm$ 7	2 $\pm$ 1	41 $\pm$ 16	-	34 $\pm$ 16
<b>Puree</b>	32 $\pm$ 15	14 $\pm$ 1	87 $\pm$ 1	54 $\pm$ 2	22 $\pm$ 4	54 $\pm$ 10	46 $\pm$ 6	67 $\pm$ 2
<b>Phenolic extract</b>	89 $\pm$ 29	40 $\pm$ 11	102 $\pm$ 6	49 $\pm$ 5	35 $\pm$ 3	138 $\pm$ 10	67 $\pm$ 11	89 $\pm$ 9

5-CQ: 5-caffeoylquinic acid, 4-pCou: 4-paracoumaroylquinic acid, Phln: Phloretin-O-glucoside, Phlx: Phloretin-O-xyloglucoside Values represented mean  $\pm$  SD ( $n = 4 - 6$ ).

### **Antioxidant capacity of apple polyphenols in lipid oxidation**

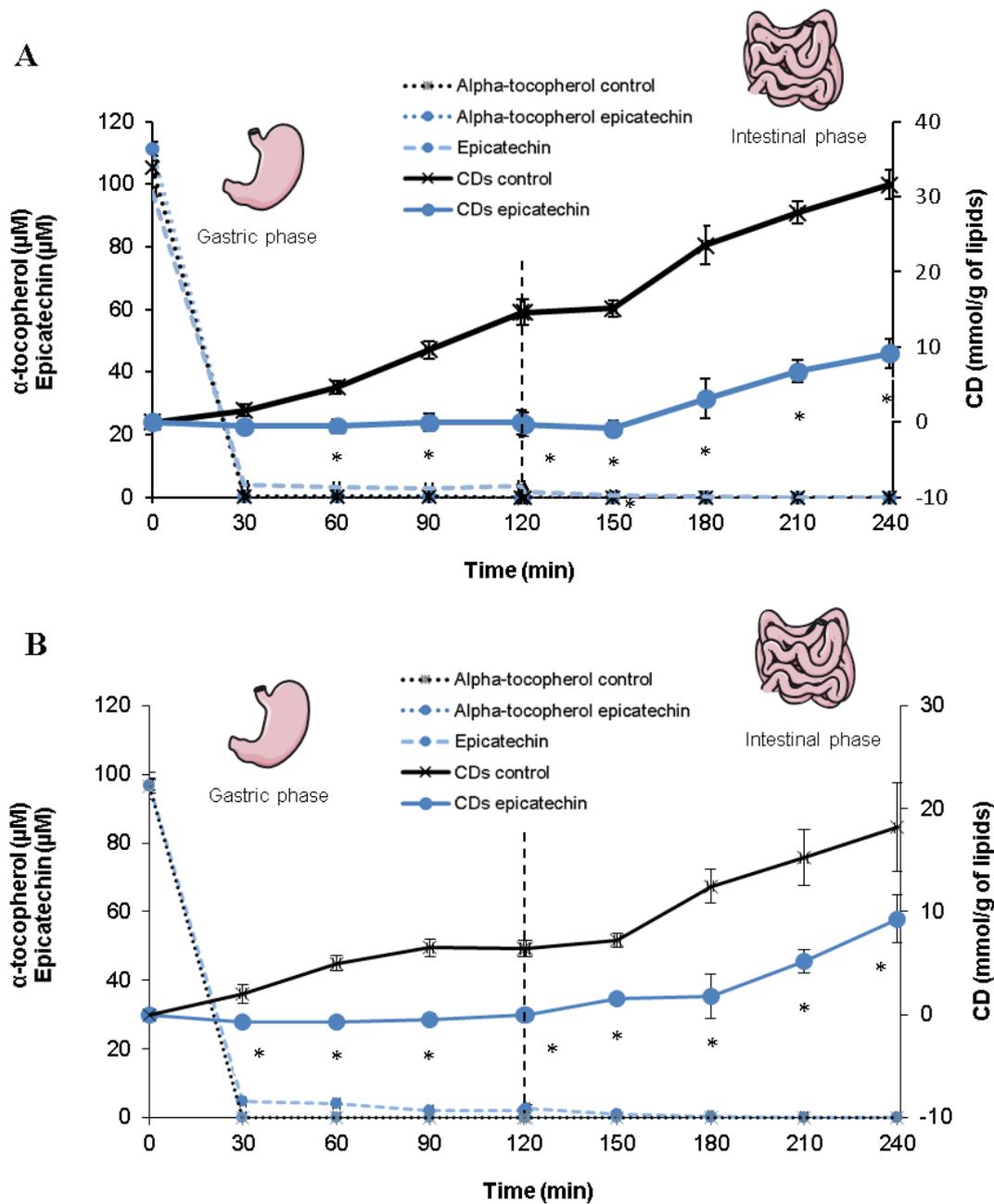
The antioxidant capacity of apple polyphenols was next assessed during the gastrointestinal digestion of the phospholipid-stabilized emulsion in the presence of metmyoglobin. In the gastric phase, the three apple matrices and (-)-epicatechin totally inhibited the accumulation of CD whatever the pH conditions (Fig. 2 AB). As to aldehydes, they displayed rather contradictory behaviors. After 2 h of gastric digestion at pH 5, all the matrices highly decreased the contents in 4-HNE with puree and (-)-epicatechin being significantly better inhibitors (93-96% inhibition) than fresh apple and the phenolic extract (76-83% inhibition) (Fig. 2A). This order of reactivity was similar for hexanal and 2-heptenal although the fresh apple and the phenolic extract were no longer inhibitory. With pH change from 5 to 3, the patterns are similar for all the aldehydes (Fig. 2B). Inhibition rates for 4-HNE are similar for puree, the phenolic extract and (-)-epicatechin (96-97%) and significantly higher than for fresh apple (93%) agreeing well with data for CD. No difference could be outlined between the various matrices for hexanal (94-98%).

Surprisingly when CD were evaluated in the intestinal phase, puree and the phenolic extract displayed no lag phase but an exponential increase reaching up to 70 and 50  $\mu\text{mol CD/g lipids}$ , for pH set at 5 or changing from 5 to 3, respectively (data not shown). The experiments were repeated in the absence of oil and a fast accumulation of substances absorbing at 234 nm was highlighted suggesting that part of the newly formed substances are from the apple matrices. For puree and the phenolic extracts, data are presented subtracted from these blank experiments. Although puree and the phenolic extract gave superimposed patterns which rapidly crossed the control curve, only puree appeared to be significantly inhibitory for the first 60 min of the intestinal digestion (pH 5, 2 h). By contrast, the final 4-HNE production remained largely decreased between 44-80% (pH 5, 2 h) and 36-95% (1 h pH 5 / 1 h pH 3). For hexanal, the inhibition rates were between 26-92% (pH 5, 2 h) and 38-54% (1 h pH 5 / 1 h pH 3).



**Figure 2.** Antioxidant activity of apple polyphenols during in vitro gastrointestinal digestion. Kinetics for accumulating conjugated dienes (CD, A left) and assessment of aldehydes at the end of the gastric and intestinal phases (A right) for 2 h at pH 5 for the gastric phase. Kinetics for accumulating conjugated dienes (CD, B left) and assessment of aldehydes at the end of the gastric and intestinal phases (B right) for 1 h at pH 5/1 h at pH 3 for the gastric phase. Epicatechin, puree, and phenolic extract: 100 µM eq. polyphenols. Fresh apple: 133 µM eq. polyphenols. \* $P < 0.05$  vs. Ctrl. # $P < 0.05$  vs. Fresh apple. \$ $P < 0.05$  vs. Puree. § $P < 0.05$  vs. Phenolic extract. £ $P < 0.05$  vs. Epicatechin. Values represented mean  $\pm$  SD ( $n = 4 - 5$ ).

Lipophilic antioxidant  $\alpha$ -tocopherol was found to disappear within 30 minutes after the beginning of the simulated digestion for both control and apple groups (data not shown) as also evidenced for epicatechin (Fig. 3). When epicatechin was present, no lipid oxidation could be observed during the gastric phase although epicatechin was found to be consumed as fast as tocopherol within 30 min. In the intestinal digestion, lipid oxidation resumed at the rate observed for the control experiment suggesting a loss of antioxidant effect for epicatechin (Fig. 3).



**Figure 3.** Consumption of  $\alpha$ -tocopherol and (-)-epicatechin during lipid oxidation of phospholipid-stabilized emulsions in the presence of absence of epicatechin for both gastric conditions (2 h pH 5 (A) vs. 1 h pH 5 and 1 h pH 3 (B)). \* $P < 0.05$  for CD. Values represented mean  $\pm$  SD (n = 4-5).

## DISCUSSION

In this study, we have evaluated both lipid oxidation during the gastrointestinal digestion of a Western-type diet and the antioxidant capacity of apple polyphenol rich in PCs in different matrices (fresh apple, puree, phenolic extract). Digestion conditions for electrolytes and enzymes were as proposed by Minekus et al. with minor modifications to take into account the continuous pH decay occurring during gastric digestion (Minekus et al., 2014). The initial phase of gastric digestion was simulated by setting the pH of 5 as for the intake and rapid gastric emptying of freshly ingested food whereas the mid-digestion step was best simulated using a pH of 3 that is still above the basal pH of 2 (Tyssandier et al., 2003). As presented previously, 10% sunflower oil-in-water emulsions stabilized by 0.25% (w/w) phospholipids were used to best model the physical state of lipids during gastric digestion (Bolea et al., Submitted 2019). However, the influence of the intestinal conditions on the stability of polyunsaturated lipids remained to be established.

### **Lipid oxidation during digestion**

#### *Lipid-derived CD and 4-HNE*

Lipid oxidation proceeded faster at pH 5 than at pH 3 when initiator was metmyoglobin as shown by the plateau displayed after the pH change (Fig. 1). A 10-fold slower accumulation of CD was already observed between pH 5 and 3 for the digestion of the same phospholipid-stabilized emulsion in the presence of pepsin (700 U/ mL in Bolea et al., Submitted 2019 vs. 1000 U/mL in this study). When pH was brought to 6.5 and bile and pancreatin added, CD accumulated again at rates similar to what was observed at pH 5 in the gastric phase without any major effect of the change in pH. Our results are consistent with data from Kenmogne-Domguia. These authors observed almost no oxygen uptake and MDA formation during the digestion of a phospholipid-stabilized emulsion in the presence of pepsin, mucin and metmyoglobin at pH 2.5 whereas both markers markedly increased at pH 6.5 during the intestinal phase (Kenmogne-Domguia et al., 2014).

The change in reactivity in the gastric phase was assessed to different pro-oxidant forms of heme iron. At pH 5, a partly proteolyzed form of metmyoglobin, named micro-metmyoglobin, is formed which appeared more pro-oxidant than metmyoglobin itself, likely allowing a better access to lipids (Bolea et al., Submitted 2019). At pH 3, both proteolysis of the globin protein and conformational change lead to the loss of bonding between the porphyrin iron center and

both His 64 and 93, possibly inducing the release of heme. The activity of heme may not be optimal in this environment owing to its likely binding to pepsin. At pH 6.5, the heme iron form may not be the limiting factor when hydrolyzed triacylglycerols are incorporated into mixed micelles with biliary salts. The surface area allowing the interaction between lipids and the pro-oxidant iron form also largely increases. More investigations are necessary to precise the iron forms and the lipid classes involved in lipid oxidation as well as the mechanisms behind the lag phase observed in the early intestinal phase.

#### *Alkanals vs alkenals*

The comparison between the primary marker, CD, and the secondary marker, 4-HNE, points to apparent contradictory results. First, the content in CD is 2-fold higher at the end of the gastric step conducted at pH 5 rather than 3. However, aldehydes appeared to be produced in a similar extent whatever the conditions. Additionally, no formation of 4-HNE was evidenced in the intestinal phase and this highly contrasts with the accumulation of CD. By contrast, hexanal contents increased by a 2- to 3-fold factor as for CD.

In a study by Van Hecke et al., alkanals were found to increase 2- to 3-fold after the gastrointestinal *in vitro* digestion of beef meat while 4-HNE changed only moderately suggesting a difference in reactivity in protein-rich media (Van Hecke et al., 2014). Because no assessment was made at the end of the gastric step, the contribution of this digestion phase was not revealed. Additionally, Steppeler et al. observed the accumulation of MDA during both phases when 4-HNE was only slightly produced in the gastric step for beef and salmon models (Steppeler et al., 2016). These authors also evidenced that the unsaturation level of fat, rather than total iron, was the dominating factor influencing the formation of aldehydes.

This discrepancy between aldehydes may be due to their difference in reactivity. 4-HNE, as all  $\alpha,\beta$ -unsaturated alkenals, is extremely reactive giving rise to Michael addition products and Schiff bases with histidine, lysine and cysteine. Thus, free 4-HNE may be low compared to protein-bound 4-HNE as evidenced by the possible coupling of up to 7 histidine residues to myoglobin (Suman et al., 2007). As a matter of fact, protein-bound 4-HNE (Michael adducts) was demonstrated to form, for the first time, in *in vivo* gastric digestion in minipigs in a similar pattern than the secondary marker TBARS (Delosiere et al., 2016). Although depending on the protein type and content, the distribution between free and protein-bound 4-HNE remains to be established in our system.

Different alkanals and alkenals were shown to be formed in the following decreasing order: hexanal > 2-heptenal > 2-octenal > pentanal (Fig. 2). This aldehyde profile agrees well with that observed using SPME/GS-MS for the metmyoglobin-initiated lipid oxidation of a 10% sunflower oil-in-water emulsion stabilized by 2% PL at pH 5.8 (PhD thesis B. Lorrain, Univ. Avignon, p. 152). After 8 h of oxidation, hexanal amounted at 14.9  $\mu\text{M}$  followed by 2-heptenal (8.5  $\mu\text{M}$ ), 2-octenal (4.9  $\mu\text{M}$ ) and pentanal (1.3  $\mu\text{M}$ ). Moreover, the oro-gastro-intestinal digestion of a thermodegraded sunflower oil showed the presence at the end of the digestion of hexanal and nonanal as the major alkanals while 2-heptenal and 2-octenal were among the 3 main alkenals (Goicoechea et al., 2008). By contrast, 4-HNE was recovered in lower yields compared to the other aldehydes. In our study, all the aldehydes, except 4-HNE, increased in the intestinal phase. Phospholipids and cholesterol esters brought by bile may be oxidized and contribute to the increase in aldehydes. This point should be checked. Although partitioned between the oil and aqueous phases (Goicoechea et al., 2008), these aldehydes proved to be bioaccessible and are thus likely able to reach the systemic circulation.

### **A role for apple phenolic compounds as antioxidants during digestion**

Endogenous  $\alpha$ -tocopherol disappeared very fast, in less than 30 min, as already observed in the gastric digestion at pH 2.5 of a phospholipid-stabilized emulsion in the presence of metmyoglobin (Kenmogne-Domguia et al., 2014). Only short protection can be afforded by  $\alpha$ -tocopherol compared to epicatechin added at a similar level in the aqueous phase. Epicatechin or its oxidation products totally inhibited lipid oxidation in the gastric phase whereas this protection was lost in the intestinal phase as shown by the accumulation of CD, 4-HNE and other aldehydes. In this study, we have also evaluated the effect of various apple matrices rich in PCs to protect lipids during the digestion process. Fresh apple (133  $\mu\text{M}$  total polyphenols), puree and the phenolic extract were as efficient inhibitors in the gastric phase as epicatechin brought at the same level of 100  $\mu\text{M}$  in phenolic compounds, totally inhibiting the formation of CD and reducing by more than 80% that of 4-HNE. By contrast, the apple matrices were no longer protective in the intestinal phase as already evidenced for epicatechin. The overall effect is however in favor of an antioxidant strategy based on apple polyphenols as shown by the reduction of 60-95% in 4-HNE and 36-92% in hexanal at the end of the intestinal step. Fruit matrices such as puree and fresh fruit, which compares well with epicatechin, may play an additional role in chemically reacting with free 4-HNE leading to its likely lower absorption.

Flavonols, monomeric and oligomeric PCs as well as chlorogenic acid, which represent most of the apple phenolic compounds, display the highly antioxidant catechol subunit. They can thus reduce the hypervalent iron form of myoglobin ( $\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) as well as chelate free iron in the gastric phase, protecting against lipid oxidation (Lorrain et al., 2012). However, the bioactivity of phenolic compounds is highly dependent on their bioaccessibility. As a matter of fact, the form of apple matrix may substantially impact their release in the aqueous phases of either chyme or chyle. Initial overall bioaccessibilities were found to be 89% for the phenolic extract, 67% for puree and 34% for fresh apple. As expected, bioaccessibility was almost total in the absence of matrix, elevated after thermal treatment of apple tissues and only partial for the mechanically treated apple matrix. Although thermal treatment efficiently induces cell wall and membrane rupture, the content in free phenolic compounds can be limited by non-covalent interactions with cell wall polysaccharides and proteins (Le Bourvellec and Renard, 2012). As a matter of fact, lower recoveries were exhibited for dimer B2 (1-40%) compared to the monomeric epicatechin (20-89%). For puree, bioaccessibility was found lower after 30 min (50%, data not shown) than at initial time (67%) in agreement with the degradation of phenolic compounds occurring through the exercise of their antioxidant effect in the gastric phase. Bouayed et al. (2012) observed higher *in vitro* gastric bioaccessibilities for chlorogenic acid, phloridzin and quercetin glycosides (73-100%) than for epicatechin and dimer B2 (30-81%) after 2 h at pH 2-2.5 for apple polyphenols from different varieties (Bouayed et al., 2012). By contrast, *in vivo* gastric bioaccessibilities were found extremely low, ranging from 2-7% for caffeoylquinic acids, 3-4% for phloridzin, 4% for phloretin xyloglucoside, and 3-10% for quercetin-3-glucoside after the co-ingestion of either defrosted apple or a phenolic extract with a Western-type meal (Dufour et al., 2018). Interestingly, the content in these compounds remained steady for more than 2 hours until stomach emptying and further dilution by gastric juices decreased their contents. No flavanol monomers and dimers were however recovered in agreement with their binding to dietary proteins and the digestion enzyme pepsin.

In the study by Bouayed et al. (2012), the two flavanols epicatechin and dimer B2 completely disappeared in the intestinal phase (pH 6.5) while hydroxycinnamoylquinic acid derivatives and quercetin glycosides were still present. Phloridzin and some quercetin glycosides were even at higher levels than initially, suggesting efficient extraction from the plant matrix and potential availability of these flavonoids under intestinal conditions.

However, the stability and thus the antioxidant capacity of ortho-diphenolic compounds may be more often diminished in the intestinal phase through the loss of polyphenol-protein

interactions after proteolysis and the degradation of polyphenols in near neutral conditions (Alminger et al., 2014).

## CONCLUSION

The present study demonstrated that lipid oxidation occurs in both the gastric and intestinal phases during the digestion of a Western-type diet. The quantification of two or more lipid oxidation products is a requirement to give an insight into these highly reactive systems where further reactions and transfer to the gas phase may occur as for volatile aldehydes. Additionally, acylglycerols and free fatty acids should be extracted to provide a safe determination of lipid-derived conjugated dienes owing to other lipids, peptides and substances from apple, bile and pancreatin contributing to absorption at 234 nm. Besides, the supplementation by apple polyphenols was found to efficiently counteract lipid oxidation in the gastric tract whereas the effect decreased in the intestinal phase. As a matter of fact, the 100 and 133  $\mu\text{M}$  polyphenol concentrations used in this study correspond to the intake of only 8 and 9 g of puree and fresh apple per liter of chyme, meaning that the consumption of a single apple or a 100 g-portion of apple puree should provide an antioxidant protection largely superior. These preliminary results should be confirmed *in vivo* through the study of the long-term effects of apple polyphenols on the endothelial function and atherosclerosis development after chronic co-ingestion of polyunsaturated fatty acids and heme iron as in the Western diet.

## REFERENCES

- Alminger, M., Aura, A.M., Bohn, T., Dufour, C., El, S.N., Gomes, A., Karakaya, S., Martinez-Cuesta, M.C., McDougall, G.J., Requena, T., *et al.* (2014). In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13, 413-436.
- Arts, I.C., and Hollman, P.C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81, 317S-325S.
- Aune, D., Giovannucci, E., Boffetta, P., Fadnes, L.T., Keum, N., Norat, T., Greenwood, D.C., Riboli, E., Vatten, L.J., and Tonstad, S. (2017). Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality-a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Epidemiology* 46, 1029-1056.
- Baron, C.P., and Andersen, H.J. (2002). Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *J Agric Food Chem* 50, 3887-3897.

Bolea, G., Ginies, C., Vallier, M.J., and Dufour, C. (2019). Lipid protection by polyphenol-rich apple matrices is modulated by pH and pepsin in in vitro gastric digestion Food and Function *submitted*.

Bouayed, J., Deusser, H., Hoffmann, L., and Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. Food Chemistry *131*, 1466-1472.

Ceymann, M., Arrigoni, E., Scharer, H., Nising, A.B., and Hurrell, R.F. (2012). Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. Journal of Food Composition and Analysis *26*, 128-135.

Chapple, S.J., Cheng, X., and Mann, G.E. (2013). Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. Redox Biol *1*, 319-331.

Dauchet, L., Amouyel, P., Hercberg, S., and Dallongeville, J. (2006). Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. J Nutr *136*, 2588-2593.

Delosiere, M., Sante-Lhoutellier, V., Chantelauze, C., Durand, D., Thomas, A., Joly, C., Pujos-Guillot, E., Remond, D., Comte, B., Gladine, C., *et al.* (2016). Quantification of 4-hydroxy-2-nonenal-protein adducts in the in vivo gastric digesta of mini-pigs using a GC-MS/MS method with accuracy profile validation. Food & Function *7*, 3497-3504.

Dufour, C., Loonis, M., Delosière, M., Buffière, C., Hafnaoui, N., Santé-Lhoutellier, V., and Rémond, D. (2018). The matrix of fruit & vegetables modulates the gastrointestinal bioaccessibility of polyphenols and their impact on dietary protein digestibility. Food Chemistry *240*, 314-322.

Gobert, M., Remond, D., Loonis, M., Buffiere, C., Sante-Lhoutellier, V., and Dufour, C. (2014). Fruits, vegetables and their polyphenols protect dietary lipids from oxidation during gastric digestion. Food Funct *5*, 2166-2174.

Goicoechea, E., Van Twillert, K., Duits, M., Brandon, E., Kootstra, P.R., Blokland, M.H., and Guillen, M.D. (2008). Use of an in vitro digestion model to study the bioaccessibility of 4-hydroxy-2-nonenal and related aldehydes present in oxidized oils rich in omega-6 acyl groups. Journal of Agricultural and Food Chemistry *56*, 8475-8483.

He, F.J., Nowson, C.A., and MacGregor, G.A. (2006). Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies. Lancet *367*, 320-326.

Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., Ryder, J.J., Hall, W.L., and Cassidy, A. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. Am J Clin Nutr *88*, 38-50.

Kay, C.D., Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., and Cassidy, A. (2012). Relative impact of flavonoid composition, dose and structure on vascular function: A systematic review of randomised controlled trials of flavonoid-rich food products. Molecular Nutrition & Food Research *56*, 1605-1616.

Keller, J., Baradat, M., Jouanin, I., Debrauwer, L., and Gueraud, F. (2015). "Twin peaks": Searching for 4-hydroxynonenal urinary metabolites after oral administration in rats. Redox Biology *4*, 136-148.

Kenmogne-Domguia, H.B., Moisan, S., Viau, M., Genot, C., and Meynier, A. (2014). The initial characteristics of marine oil emulsions and the composition of the media inflect lipid oxidation during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 152, 146-154.

Le Bourvellec, C., and Renard, C.M.G.C. (2012). Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52, 213-248.

Lorrain, B., Dangles, O., Loonis, M., Armand, M., and Dufour, C. (2012). Dietary iron-initiated lipid oxidation and its inhibition by polyphenols in gastric conditions. *J Agric Food Chem* 60, 9074-9081.

Mikkelsen, A., and Skibsted, L.H. (1995). Acid-catalysed reduction of ferrylmyoglobin: product distribution and kinetics of autoreduction and reduction by NADH. *Z Lebensm Unters Forsch* 200, 171-177.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., *et al.* (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function* 5, 1113-1124.

Negre-Salvayre, A., Garoby-Salom, S., Swiader, A., Rouahi, M., Pucelle, M., and Salvayre, R. (2017). Proatherogenic effects of 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 111, 127-139.

Pryor, W.A., and Castle, L. (1984). In *Oxygen Radicals in Biological Systems*, L. Packer, ed. (Orlando, Academic Press), pp. 293-295.

Rysman, T., Utrera, M., Morcuende, D., Van Royen, G., Van Weyenberg, S., De Smet, S., and Estevez, M. (2016). Apple phenolics as inhibitors of the carbonylation pathway during in vitro metal-catalyzed oxidation of myofibrillar proteins. *Food Chemistry* 211, 784-790.

Staprans, I., Pan, X.M., Rapp, J.H., and Feingold, K.R. (2005). The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 49, 1075-1082.

Staprans, I., Rapp, J.H., Pan, X.M., Kim, K.Y., and Feingold, K.R. (1994). Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized lipid in chylomicrons of human serum. *Arterioscler Thromb* 14, 1900-1905.

Stappeler, C., Haugen, J.E., Rodbotten, R., and Kirkhus, B. (2016). Formation of Malondialdehyde, 4-Hydroxynonenal, and 4-Hydroxyhexenal during in Vitro Digestion of Cooked Beef, Pork, Chicken, and Salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 487-496.

Suman, S.P., Faustman, C., Stamer, S.L., and Liebler, D.C. (2007). Proteomics of lipid oxidation-induced oxidation of porcine and bovine oxymyoglobins. *Proteomics* 7, 628-640.

Tyssandier, V., Reboul, E., Dumas, J.F., Bouteloup-Demange, C., Armand, M., Marcand, J., Sallas, M., and Borel, P. (2003). Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 284, G913-G923.

Van Hecke, T., Ho, P.L., Goethals, S., and De Smet, S. (2017). The potential of herbs and spices to reduce lipid oxidation during heating and gastrointestinal digestion of a beef product. *Food Research International* 102, 785-792.

Van Hecke, T., Vanden Bussche, J., Vanhaecke, L., Vossen, E., Van Camp, J., and De Smet, S. (2014). Nitrite Curing of Chicken, Pork, and Beef Inhibits Oxidation but Does Not Affect N-

Nitroso Compound (NOC)-Specific DNA Adduct Formation during in Vitro Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 1980-1988.

Van Hecke, T., Wouters, A., Rombouts, C., Izzati, T., Berardo, A., Vossen, E., Claeys, E., Van Camp, J., Raes, K., Vanhaecke, L., *et al.* (2016). Reducing Compounds Equivocally Influence Oxidation during Digestion of a High-Fat Beef Product, which Promotes Cytotoxicity in Colorectal Carcinoma Cell Lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 1600-1609.

Vulcain, E., Goupy, P., Caris-Veyrat, C., and Dangles, O. (2005). Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: Action in the aqueous vs. lipid phase. *Free Radic Res* 39, 547-563.

Wojdylo, A., Oszmianski, J., and Laskowski, P. (2008). Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 6520-6530.

Zhan, J., Liu, Y.J., Cai, L.B., Xu, F.R., Xie, T., and He, Q.Q. (2017). Fruit and vegetable consumption and risk of cardiovascular disease: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Crit Rev Food Sci* 57, 1650-1663.

## Etude n°3

Impairments of endothelial function and atherosclerosis development through n-6 lipid oxidation during digestion. Protective effects of a supplementation with apple polyphenols.

---

Altérations de la fonction endothéliale et développement de l'athérosclérose induits par l'oxydation lipidique des n-6 durant la digestion. Effets protecteurs d'une supplémentation en polyphénols de pomme.

Gaëtan Boléa, Clothilde Philouze, Sydney Risdon, Mathilde Dubois, Anais Humberclaude, Bernard Geny, Claire Arnaud, Claire Dufour, Grégory Meyer

### **III. Etude n°3**

#### **1. contexte scientifique**

L'athérosclérose est une maladie multifactorielle et l'une des principales causes de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés. La formation et la rupture des plaques d'athérome sont généralement les conséquences d'une inflammation chronique, d'un stress oxydant et d'une dysfonction endothéliale. L'un des principaux facteurs de risque de cette pathologie est un régime occidental. Ce régime est notamment caractérisé par sa richesse en AGPI n-6, sensibles à l'oxydation induite par le fer héminique apporté par la viande rouge dans le tractus gastro-intestinal. Cette oxydation lipidique est à l'origine de la formation du 4-HNE, un aldéhyde génotoxique et cytotoxique spécifique des AGPI n-6. De plus, le couplage du 4-HNE aux apolipoprotéines B des LDL (LDLox) est une étape clé dans le développement de l'athérosclérose. Cependant, une alimentation riche en polyphénols antioxydants tels que les PCs (flavonoïdes) est connue pour réduire le stress oxydant ainsi que les maladies coronariennes. Une stratégie de prévention par supplémentation en fruits riches en PCs de ce type de régime occidental pourrait être bénéfique pour la fonction vasculaire.

#### **2. Objectif**

**Dans ce contexte, l'objectif majeur de cette troisième étude sera d'évaluer l'effet d'un régime chronique de type occidental sur la fonction endothéliale et le développement des plaques d'athérome dans un modèle de souris transgéniques déficientes en apolipoprotéine E. Un second objectif sera d'évaluer les effets d'une supplémentation en polyphénols de pomme, représentés à 80% par des PCs hautement antioxydantes, sur la protection de la fonction vasculaire.**

### 3. Méthodologie

Dans cette étude, des souris C57BL/6 ApoE<sup>-/-</sup> sont réparties aléatoirement en 4 groupes expérimentaux : 1) un groupe High Fat plus viande rouge (HF+RM) riche en acides gras saturés, 2) un groupe dont le régime est enrichi en AGPI n-6 oxydables (HF+RM+SO) et 3) et 4) deux groupes supplémentés en polyphénols de pomme sous forme de purée ou d'extrait phénolique (PUREE et PE respectivement, 0,06% équivalent polyphénol totaux). Les souris ont été nourries pendant 12 semaines selon les différents régimes. A la fin du protocole nutritionnel, le profil lipidique plasmatique, la fonction vasculaire ainsi que les caractéristiques des plaques d'athérome ont été évalués.

### 4. Résultats majeurs

Ce travail a permis de mettre en évidence dans un premier temps une augmentation de l'oxydation lipidique durant la digestion (4-HNE) ainsi qu'une augmentation du taux plasmatique de LDLox lorsque le régime riche en fer héminique (viande rouge) était associé avec une source de AGPI n-6. Cette oxydation lipidique au niveau circulatoire était associée à une augmentation de la pression artérielle et à une détérioration de la fonction endothéliale (62 vs. 75% Rmax comparé au groupe HF+RM). Ces résultats semblent être la conséquence d'altérations au niveau de l'endothélium liées au stress oxydant. Ces altérations étaient associées à une augmentation de la taille des plaques d'athérome au niveau de la crosse aortique et de la carotide. De plus, l'augmentation du cœur nécrotique sans modification de la fibrose pourrait entraîner l'apparition d'une instabilité de la plaque d'athérome. Un résultat majeur de ce travail était que l'ajout de polyphénols avec ou sans la matrice du fruit permettait l'inhibition de l'oxydation lipidique durant la digestion. Par ce biais nous avons ainsi réduit la formation de LDLox mais surtout prévenu l'altération de la fonction endothéliale et le développement de l'athérosclérose dans notre modèle. **Cette troisième étude a permis de mettre en évidence que l'oxydation lipidique durant la digestion semble être un facteur clé dans le développement d'une dysfonction endothéliale pouvant conduire à la formation de plaques d'athérome. Par ailleurs, l'ingestion simultanée de polyphénols majoritairement constitués par des PCs, dont le potentiel antioxydant est reconnu, a permis de limiter la formation de produits d'oxydation absorbables et ainsi protéger la fonction vasculaire des effets délétères d'un régime de type Western. Par conséquent, la co-ingestion de fruits**

**riches en PCs pourrait avoir des effets santé bénéfiques dans une alimentation de type occidental.**

**Impairments of endothelial function and atherosclerosis development through n-6 lipid oxidation during digestion. Protective effects of a supplementation with apple polyphenols.**

G. BOLEA<sup>1,2</sup>, C. PHILOUZE<sup>2</sup>, S. RISDON<sup>2</sup>, M. DUBOIS<sup>2</sup>, A. HUMBERCLAUDE<sup>2</sup>, C. GINIES<sup>1</sup>, B. GENY<sup>4</sup>, C. ARNAUD<sup>3</sup>, C. DUFOUR<sup>1</sup> G. MEYER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UMR408 SQPOV “Safety and Quality of Plant Products”, INRA, Avignon University, F-84000 Avignon, France.

<sup>2</sup>EA4278 LaPEC “Laboratory of Cardiovascular Pharm-ecology “, Avignon University, F-84000 Avignon, France.

<sup>3</sup>INSERM U1042 “Cardiovascular & Respiratory Pathophysiology and Hypoxia”, University of Grenoble, 38000 Grenoble, France

<sup>4</sup>EA3072 Department of Physiology and Functional Explorations, Strasbourg University Hospitals, F-67091 Strasbourg, France

**Financial support**

The study was funded by the Foundation of Avignon University and Tersys. This work was supported by the Platform 3A, funded by the European Regional Development Fund, the French Ministry of Research Higher Education and Innovation, the Provence-Alpes-Côte-d'Azur Region, the Departmental Council of Vaucluse and the Urban Community of Avignon

**Acknowledgements**

We acknowledge the foundation of Avignon University for PhD grant. We gratefully thank Mrs Christine Boutin (Bio verger, Ambricourt, France) for the kind gift of apple *Reinette de Flandre*.

**Disclosures**

Authors declare that they have no conflict of interest.

**Corresponding author**

Dr. G. MEYER

Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire (EA4278),

Faculty of Sciences, Avignon University,

33 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France

Phone: +33 490162944 ; Fax: +33 490162901 ; E-mail: [gregory.meyer@univ-avignon.fr](mailto:gregory.meyer@univ-avignon.fr)

## Abstract

Atherosclerosis is a multifactorial disease and a leading cause of mortality in industrialized countries. Atherosclerosis is associated with endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation, which contribute to lesion formation, plaque rupture and thrombosis. One of the main risk factors is the Western diet rich in n-6 polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA) which are sensitive to oxidation in the gastrointestinal tract. This oxidation may increase the formation of 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), a specific genotoxic and cytotoxic aldehyde generated from n-6 PUFA. Coupling of 4-HNE to LDL is a key step in atherosclerosis development. By contrast, a diet rich in antioxidants such as apple polyphenols, which are largely constituted by antioxidant procyanidins (polyphenols from the flavonoid class), may reduce vascular impairments through the inhibition of digestive lipid oxidation.

**Method:** ApoE<sup>-/-</sup> mice were fed during 12 weeks with a high-fat/red meat diet associated with or without n-6 PUFA to assess the effects of the oxidizable n-6 PUFA. Moreover 2 high-fat/n-6 PUFA/red meat groups were supplemented with apple puree or phenolic extract (0.06% w/w in total polyphenols) rich in PCs to assess their effect on digestive lipid oxidation and its consequences.

**Results:** We have shown that lipid oxidation during digestion (4-HNE) was associated with an increase in plasma oxLDL level, an increase in arterial blood pressure and an endothelial function impairment. This endothelium alteration related to oxidative stress was associated with an increased atheromatous plaque size in aortic cross (136 vs. 166 mm<sup>2</sup>) and carotid thickness (0.25 vs. 0.30 mm). In addition, the strong tendency to an increased necrotic core could participate to the installation of atheromatous plaque instability. Interestingly, the supplementation in polyphenols (puree or phenolic extract) prevented lipid oxidation during digestion. This prevention during digestion was associated with a lower plasma oxLDL, a higher NO bioavailability, and decreased the exacerbation of endothelial alterations as well as atheromatous plaque size. No difference was evidenced regarding insulin resistance or obesity development.

**Conclusion:** Synthesis of absorbable lipid oxidation products such as 4-HNE was associated with an impairment of endothelial function and an increase in atheromatous plaque formation. Apple PCs could limit 4-HNE formation and absorption during digestion protecting long-term

vascular function. The reintroduction of PC-rich fruits (apple, pear) into the Western diet should thus be encouraged for their health beneficial effects.

**Keywords:** Western diet, 4-Hydroxy-2-nonenal, Endothelial function, Atherosclerosis, Polyphenols, LDLox.

## INTRODUCTION

Atherosclerosis is a multifactorial and degenerative disease characterized by the progressive accumulation of lipids and inflammatory cells on the arterial wall of large and medium arteries. These changes are associated with blood flow impairments, chronic inflammation and oxidative stress in some vascular wall areas (Chiu and Chien, 2011; Ross, 1999). Lipid accumulation is preceded by an alteration of the vascular endothelial function including, decreased production and bioavailability of nitric oxide (NO) caused by oxidative stress or inflammation (Hansson et al., 2006; Ross, 1999). One of the major risk factors of atherosclerosis is the Western diet rich in n-6 polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA) which are sensitive to oxidation. In the digestive tract, food is exposed to postprandial oxidative stress and therefore the gastric tract has been proposed as a major site for lipid oxidation (Kanner, 2007; Lorrain et al., 2012; Vulcain et al., 2005). Indeed, in the Western diet, heme iron in the form of myoglobin from red meat can initiate lipid oxidation leading to the formation of 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) among other aldehydes. 4-HNE is a specific genotoxic and cytotoxic  $\alpha,\beta$ -unsaturated hydroxyalkenal generated from n-6 PUFA and found in some oxidative and inflammatory diseases (Chapple et al., 2013). Keller et al. (2015), have shown that marked 4-HNE administered to rats by intra-gastric gavage to rats was partially absorbed by the intestinal barrier and then found in urine, liver, or kidney (Keller et al., 2015). This highly reactive aldehyde forms adducts with proteins (via Michael addition or Schiff base formation) with free amino acids or thiol groups of cysteine, lysine and histidine (Negre-Salvayre et al., 2017). This adduction results in an impairment of the protein conformation and function inducing subsequent cellular dysfunctions and tissular damages. As a matter of fact, the covalent binding of 4-HNE to ApoB, which yields oxidized LDL (oxLDL), is recognized as a key step in the development of an endothelial dysfunction and the subsequent atheromatous plaque formation (Gargiulo et al., 2017; Staprans et al., 2005). After crossing the endothelial barrier, oxLDL accumulate in the subendothelium. Next, the bonding between oxLDL and Class A scavenger receptor on macrophagic cells activates foam cell and fatty streak formation.

In the last decades, epidemiological, clinical and experimental studies have demonstrated that a healthy diet plays a central role in the prevention of atherosclerosis. Non-pharmacological prevention strategies can limit/prevent progression towards clinical events and more specifically, it has been reported that polyphenol consumption was able to reduce atherosclerosis development (Stoclet et al., 2004). Polyphenols are secondary metabolites

largely distributed in fruits, vegetables and cereals (Arts and Hollman, 2005) and are the most abundant antioxidants in the human diet. Polyphenols are used as nutraceuticals or supplementation in numerous diet studies for their antioxidant capacity. Dietary intake in polyphenols has been evaluated for the British (0.9 g per day) and French populations (1.2 g per day). In these populations, major contributors are tea, coffee, apple and fruit juices (Clifford, 2006; Perez-Jimenez et al., 2011). Among polyphenols, procyanidins (PCs) have been shown to reduce oxidative stress, LDL oxidation and therefore vascular dysfunction (Dauchet et al., 2006). The consumption of a diet rich in PCs is inversely correlated with the development of cardiovascular diseases (Kay et al., 2012; Sansone et al., 2015). The protective effect of PCs could be due to lipid oxidation inhibition during gastrointestinal digestion. After ingestion, polyphenols in their native form are largely bioaccessible in the stomach after their release from the plant food (Dufour et al., 2018). Through their catechol core they can reduce myoglobin hypervalent iron form ( $\text{MbFe}^{\text{IV}}=0$ ) to myoglobin ( $\text{MbFe}^{\text{III}}$ ) as well as chelate free iron protecting therefore against lipid oxidation (Lorrain et al., 2010). Antioxidant effects of PCs in the gastrointestinal tract could limit 4-HNE formation and its subsequent absorption. Limiting 4-HNE absorption can reduce LDL oxidation and thus protect the vascular function.

Consequently, the aims of this study was to evaluate 1) the effects of a chronic Western diet consumption and the subsequent lipid oxidation occurring in the digestive tract on the vascular function and atherosclerosis development, and 2) the consequences of a primary prevention strategy by a supplementation in polyphenols rich in PCs.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animal model and experimental protocol**

All investigations conformed to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH, National Academies Press US, 8<sup>th</sup> edition, 2011) as well as European Parliament Directive 2010/63/EU (experimentation n<sup>o</sup>: 84.004). Male apolipoproteinE<sup>-/-</sup> (ApoE<sup>-/-</sup>) mice (8 weeks old) (HP<sup>2</sup> laboratory, INSERM U1042, University of Grenoble, France) were used for this study. Mice were housed five by cage under controlled conditions of temperature ( $21 \pm 1$  °C), hygrometry ( $60 \pm 10\%$ ) and lightening (12:12 hours light-dark cycle), with access to water and food *ad libitum*. After two weeks of acclimatization, male mice were randomly assigned to four groups (n = 20 per group):

a control group with a high fat and red meat diet (HF 230, Safe, France; HF+RM group), a second group with a HF+RM diet complemented with sunflower oil as a source of oxidizable n-6 PUFA (HF+RM+SO group) and two other groups with a HF+RM+SO diet supplemented with apple polyphenols in the form of puree or phenolic extract, respectively Puree and PE groups. Composition of those experimental diets is detailed in Table 1. Diets protocols were sustained during 12 weeks. During this period, weight gain was measured every weeks and dietary intake was evaluated three times per week. Faeces were harvested at the start, middle and end of the protocol. During the last week, blood pressure was evaluated by tail cuff method and atheromatous plaque size by echography. At the end of the 12 weeks-diet period, an overnight fasting was performed and mice were euthanized by pentobarbital injection (120 mg/kg I.P.). Blood was collected for biochemistry analysis. Hearts were excised with aortic arch and fixed in O.C.T then frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for histological analysis. Finally, aorta was removed in order to perform *ex-vivo* analysis of vascular function in organ bathes or quantification of atheromatous plaque development.

**Table 1.** Experimental diet formulation

<b>Food Intake</b>				
	HF + RM	HF + RM + SO	PUREE	PE
Proteins (% kcal)	16.1	12.3	12.1	12.1
Carbohydrates (% kcal)	24.2	18.5	19.4	16.6
Lipids (% kcal)	59.7	69.2	68.5	68.3
Total calories (kcal/day)	12.1	13.0	11.7	12.4
<b>Composition (% of diet weight)</b>				
High Fat 230	79.5	68.6	60.6	67.0
Sunflower oil	-	13.7	12.1	13.4
Red meat	19.9	17.1	15.1	16.7
Polyphenols	-	-	0.060	0.061
PUREE	-	-	12.1	-
Phenolic Extract	-	-	-	2.3
Cellulose	0.64	0.55	-	0.54
n-6PUFA	10.5	28.3	28.3	28.3
Cholesterol	0.076	0.066	0.058	0.064
Vitamin E	0.014	0.021	0.019	0.021
Heme iron	0.0013	0.0011	0.0010	0.0011

HF: High Fat. RM: Red Meat. SO: Sunflower Oil. PE: Phenolic extract.

## **Food characterization and preparation**

Sunflower oil was bought and stored before use at 4 °C (Rustica from Leclerc, lot A21815). High Fat diet was provided by SAFE (HF230, SAFE, France). Apples (*Reinette de Flandre*) were collected from an organic orchard in Ambricourt Northern France. Polyphenol contents of apple puree and phenolic extract were determined by HPLC/Diode Array (Shimadzu Prominence system, Kyoto, Japan) after thioacidolysis as in Bolea et al. (Submitted 2019). Apple puree was prepared using a Roboqbo QB8-3 multicooker. Briefly, apples (2.5 kg) were cut in 12 slices, core and seeds were removed but skin was kept. Slices were cooked under vacuum (-950 mbar) by a convection heating system with a double jacket at 80 °C for 10 min and stirring (1000 rpm). The puree was poured into 250 g-jam jars before thermal treatment in an autoclave at 100 °C for 20 min. The jars were stored at 4 °C until use. The apple polyphenol extract was obtained by extraction of homogenized freeze-dried apple powder (without core and seeds, 200 g) by hexane (600 mL) once followed by acetone/water (60/40, v/v, 15 min) three times under magnetic stirring at room temperature. The pooled acetone/water phases containing polyphenols were concentrated on a rotary evaporator prior to freeze-drying. The phenolic extract containing soluble sugars was stored at -20 °C before use. Beef 150 g-ground steaks (Charolaise) were placed in plastic bags and slowly cooked in a water bath (70 °C, 40 min). Then, meat juice was removed and the red meat was freeze-dried, crushed in a fine powder and stored at -20 °C. All the diets have been reconstructed in our laboratory.

## **Blood pressure measurements**

Before the first week and during the last week of the dietary protocol, systolic, diastolic and mean blood pressures were assessed in conscious mice by tail-cuff method using CODA tail-cuff system (Kent Scientific, Torrington, CT, USA). To reduce stress influence, mice underwent 3 periods of habituation to blood pressure measurements during the week preceding final recording. Mice were warmed for 30 min before measurements. All measurements were made by the same experimenter between 9 AM and 12 AM. Obtained results were the mean of at least 10 valid measurements out of the 15 performed in a recording session.

### **Ultrasound imaging (echography) of atheromatous plaque**

Echographic assessment was performed using a Vevo 3100™ imaging system (Fujifilm VisualSonics, Toronto, Canada) equipped with the MX550D™ probe (22-55 MHz). Images were analyzed post-processing using the VevoLab™ software (Fujifilm VisualSonics, Toronto, Canada). Mice anesthesia was induced with 4% isoflurane (IsoFlo™, Zoetis, Parsippany, United-States) in medical air mix (22% O<sub>2</sub>, 78% N<sub>2</sub>) (Air Liquide, Paris, France), ventilated at 1 L/min, and then maintained with 1.5% isoflurane after effective sleep. Animals were placed in a supine position on a heating pad and their body temperature was monitored throughout the exam, as well as their breathing rate and electrocardiogram. Cross-sectional images of ascending aorta were obtained from a modified right parasternal view. Aortic plaque surface areas were determined from 3 measurements at the same spot. All measurements were performed between two inspiratory peaks.

### **Isolated aortic rings and vasoreactivity**

Under anesthesia (120 mg/kg I.P.), thoracic aortas were quickly removed and placed in cold Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (composition in mM: NaCl 118, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 4.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5 and glucose 11). After removal of adherent perivascular adipose tissues, aortas were cut into 2 mm long rings. Then, aortic rings were mounted onto stainless steel supports connected to an isometric force sensor (EMKA technologies, EMKA Paris, France) and suspended in organ bathes containing Krebs-Henseleit buffer at 37 °C continuously bubbled with gas mixture (95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>). Rings were connected to an isometric force transducer (EMKA technologies, EMKA Paris, France), linked to an amplifier (EMKA technologies, EMKA Paris, France) and a computerized acquisition system, to record changes in isometric force. Resting tension was adjusted to 0.8 g and aortic rings were allowed to stabilize during 60 min. During this period, Krebs-Henseleit buffer was changed two times and rings were re-stretched to maintain a tension of 0.8 g. First, smooth muscle cells and endothelial integrity were assessed by a single dose of phenylephrine (PE, 10<sup>-6</sup> M) followed by a single vasorelaxing dose of acetylcholine (ACh, 10<sup>-5</sup> M). Then, each vessel ring was pre-constricted with phenylephrine (10<sup>-6</sup> M). After pre-constriction reached a plateau, endothelium-dependent and independent relaxations were examined by challenging aortic rings with cumulative concentrations of ACh (10<sup>-9</sup> to 10<sup>-5</sup> M) or sodium nitroprusside (SNP, 10<sup>-9</sup> M to 10<sup>-5</sup> M) respectively. Vasodilatation was expressed as a percentage of maximum contractile response to

PE. Maximal relaxation (Emax) and sensitivity (EC50) to each drug were used to characterize vasorelaxation.

### **Blood analysis**

Blood analyses were performed in plasma obtained by centrifuging blood at 300 g for 10 min at 4 °C and plasma was stored at -80 °C for biochemistry analysis. Total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL) concentrations were determined by the CHOD-PAP method (Biolabo SAS, France). Triglycerides (TG) were assessed by the GPO method (Biolabo SAS, France). Finally, MDA-modified oxLDL were assessed by an ELISA kit (Cloud-Clone Corp., USA).

### **Biochemical assays**

#### *Western blot analysis*

After sacrifice, thoracic aortas were quickly removed of perivascular adipose tissues, then frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis. Aortas were homogenized (Ultra-turax, IKA, T10Basic) in ice-cold extraction buffer containing 50 mM Tris/HCl (pH 6.7), 1% SDS, 10% glycerol, protease-inhibitor cocktail (protease inhibitor cocktail; Sigma-Aldrich) and anti-phosphatase (NaOV; Fisher Scientific). Protein concentration was assessed by using BCA (bicinchoninic acid) as protein assay reagent (Pierce <sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher). Western blot were performed as previously described (Battault et al., 2016).

Briefly, proteins from aorta homogenates were separated onto polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate gels and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies in 1% milk (anti-mouse eNOS 1/1000; BD Technologies, anti-rabbit GAPDH 1/5000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or 3% bovine serum albumin (anti-mouse eNOS-P Ser1177 1/1000, BD Transduction) in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 overnight at 4 °C. Immunodetection was carried out using ECL or ECL Plus system (SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrate, Thermo Scientific or Luminata<sup>TM</sup> Forte Western HRP substrate, Millipore Corporation, respectively), and membranes were exposed to X-Ray film for

revelation and visualization. eNOS protein content was expressed relative to GAPDH content. eNOS-P<sup>Ser1177</sup> protein content was expressed relative to eNOS content.

#### *Measurement of reactive oxygen species (ROS) by electron paramagnetic resonance (EPR)*

ROS production was measured by EPR in aortic homogenates as previously described (Battault et al., 2016). Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of homogenates were incubated with 5  $\mu\text{L}$  of Krebs-Hepes buffer (pH 7.4) containing 1 mM of 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine and 25  $\mu\text{M}$  deferoxamine methane sulfonate. This solution was placed into electron paramagnetic resonance glass capillary tubes (Noxygen Science Transfer and Diagnostic, Elzach, Germany) and then placed inside the e-scan spectrometer (Bruker, Ettlingen, Germany) for data acquisition. The acquisition EPR parameters were: microwave frequency = 9.652 GHz; modulation frequency = 86 kHz, modulation amplitude = 0.01 G; center field = 3495.9 G, sweep width = 300 G; microwave power = 1.0 mW; number of scans = 10 and receiver gain =  $2 \cdot 10^{-1}$ . Sample temperature was kept at 37 °C by the Temperature & Gas Controller Bio III unit, interfaced to the spectrometer. Adducts generated by the probe reaction with free radicals were acquired and the spectra sequentially recorded for about 5 min in order to calculate the ROS production rate. The ROS production was normalized to the protein content of each sample and then expressed in  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ .

#### *Quantification of 4-HNE*

4-HNE was quantified in faeces and plasma to evaluate lipid oxidation during digestion. Faeces were collected 24 hours after diet change at the start, middle and end of the 12 weeks protocol. Faeces were crushed two times during 50 seconds at 30 Hz in ball mill (Reich 301) in acetonitrile. 4-HNE was extracted with 500  $\mu\text{L}$  of methanol containing 50 ng/mL de 4-HNE-D3 (internal standard) under stirring during 5 min. For the plasma, 70  $\mu\text{L}$  were mixed with 200  $\mu\text{L}$  of acetonitrile and 20  $\mu\text{L}$  of 4-HNE-D3 (50 ng/mL in methanol) during 5 min. After centrifugation (16 000 g, 5 min, room temperature), supernatant of samples were removed and dried under nitrogen. The residual volumes (20  $\mu\text{L}$ ) were taken up in 50  $\mu\text{L}$  of acetonitrile for plasma and 200  $\mu\text{L}$  for faeces containing acidified dinitrophenylhydrazine (DNPH, 2.5 mg/mL). The reaction was performed during 1 hour at room temperature and agitation. Separation and quantification of 4-HNE was performed by using LC/MS/APCI (EVOQ triple

quadrupole, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) with a ACQUITY HSS T3 (50 mm x 2,1 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) column at 40 °C. For chromatographic separation, mobile phase was constituted by a binary solvent system with water/formic acid (99.95/0.05, v/v, solvent A) and acetonitrile (solvent B) at the flow rate of 0.4 mL/min. The volume injected was 2  $\mu\text{L}$ . The elution gradient was as follows: 0-1 min isocratic 50% B; 1-9 min, linear 50-98% B; 9-10 min, isocratic 98% B; 10-10.1 min, linear 98-50% B and 10.1-11 min, isocratic 50% B. Mass spectrometry conditions were as follows: ionization by APCI in negative mode, spray current 20  $\mu\text{A}$ ; cone temperature 300 °C; heated probe temperature 300 °C; cone gas flow: 20 psi; probe gas flow: 40 psi; nebulizer gas flow: 50 psi. Spectra were recorded in MRM mode. 4-HNE-D3 was quantified by transition ion 338 to 167 and 4-HNE with transition ion 335 to 167. The retention time of both compound was 3.5 min. For quantification, 5 point-calibrations (1.02  $\mu\text{M}$  to 0.064  $\mu\text{M}$ ) were run with 4-HNE standards in acetonitrile. To evaluate the stability of the adduct with DNPH, a same sample was reinjected every hours and the variation over 6 hours was less than 5% (data not shown).

#### *OIL red coloration*

Atheromatous plaque size was assessed by measuring lipid aggregation in descending aortas that were fixed in paraformaldehyde (4%) during 24 hours at 4 °C. Then, aortas were rinsed three times with Krebs-Henseleit buffer and incubated overnight in an Oil-Red-O solution in iPrOH/water (60/40, v/v, 0.33% of Oil-Red-O, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) at room temperature. Atheromatous plaque size was assessed by capturing images directly from a color camera (Motic Moticcams 2300, Motic China group Co.) attached to a binocular loupe. Images were displayed on a RGB monitor by using Motic Image 2.0 (Motic China group Co.). Analysis was carried out using Image J<sup>®</sup> software (Image J, NIH, USA). Oil red staining was expressed as the percentage of aortic area.

#### *Histological sections and colorations*

The upper part of the heart (with aortic arch) was cut using a cryostat (Leica CM1950; Leica systems, France) at -20 °C. The distal portion of the aortic sinus was recognized by the appearance of the three leaflets of the valves. Sections of 8  $\mu\text{m}$  thickness were performed (total 50 sections). For each aortic valve, we quantified atheromatous plaque size, necrotic core size

(Hematoxylin-Eosin, Sigma-Aldrich, France) and fibrosis (Red Sirius, Labomoderne, Paris, France) from five sections separated from each other by 80  $\mu\text{m}$ . Photography were performed using a digital camera (Braumer VCXU31C, Baumer SAS France), mounted with a macro lens VS Technology 0513 (VS Technology Corporation, Japan) and Baumer GAPI acquisition software (Baumer SAS France). Quantitative analyses were performed using Image J<sup>®</sup> software to assess the stained area in  $\text{mm}^2$  and express it relative to the diameter of aorta in mm (atheromatous plaque size and necrotic core size) or in percentage of atheroma (fibrosis).

### **Statistical analysis**

Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. For comparison of multiple experimental conditions, analysis of variance (ANOVA) was used followed by the PLSD Fisher post hoc test. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Statistics were performed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, USA).

## RESULTS

### Diet Characterization

The sunflower oil used in this study contains 9.8% of saturated fatty acids (6.3% C16; 3.3% C18; 0.2% C20), 27.8% of monounsaturated fatty acids (0.1% C16:1; 27.0% C18:1n-9; 0.6% C18:1n-7; 0.1% C20:1) and 62.4% of polyunsaturated fatty acids (62.4% C18:2; 0.01% C18:3).  $\alpha$ -Tocopherol content was 665 ppm. Identification and quantification of apple polyphenols were performed by UPLC/DAD/ESI-MS and thioacidolysis (Bolea et al., Submitted 2019). Forty-six compounds distributed in four phenolic classes were identified: flavan-3-ols, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and flavonols (Table 2). Distribution, quantification and average degree of polymerization of monomeric and polymeric flavan-3-ols according to the different matrices are summarized in Table 2. The selected variety (*Reinette de Flandre*) is markedly rich in polyphenols (4.3 g/kg) compared to classically consumed dessert apples (ca. 1g/ kg) (Guyot et al., 2002). Polyphenols were even more concentrated in puree after thermal treatment of *Reinette de Flandre* reaching nearly 5 g/kg. Monomeric and oligomeric PCs represented 5-7% and 67-69%, respectively, of the phenolic pool followed by the hydroxycinnamic acid, 5-caffeoylquinic acid (21-22%) (Table 2). Quercetin derivatives and dihydrochalcones were only minor contributors. Additionally, the puree and apple phenolic extract were largely similar in their phenolic composition (Table 2). In our model of apple supplementation, no major differences were observed for polyphenol contents between the phenolic extract and puree. Apples used in the diet also contained, 3.15 g of glucose, 5.85 g of fructose, 1.09 g of saccharose, 0.04 g of citric acid and 1.61 g of malic acid per 100 g of fresh fruit (data not shown). Dehydroascorbic acid (17.7 mg per 100 g of fresh fruit) was markedly higher than ascorbic acid (5.9 mg per 100 g). 4-HNE was neither detected in freshly reconstituted diets nor after 48 hours at room temperature (data not shown).

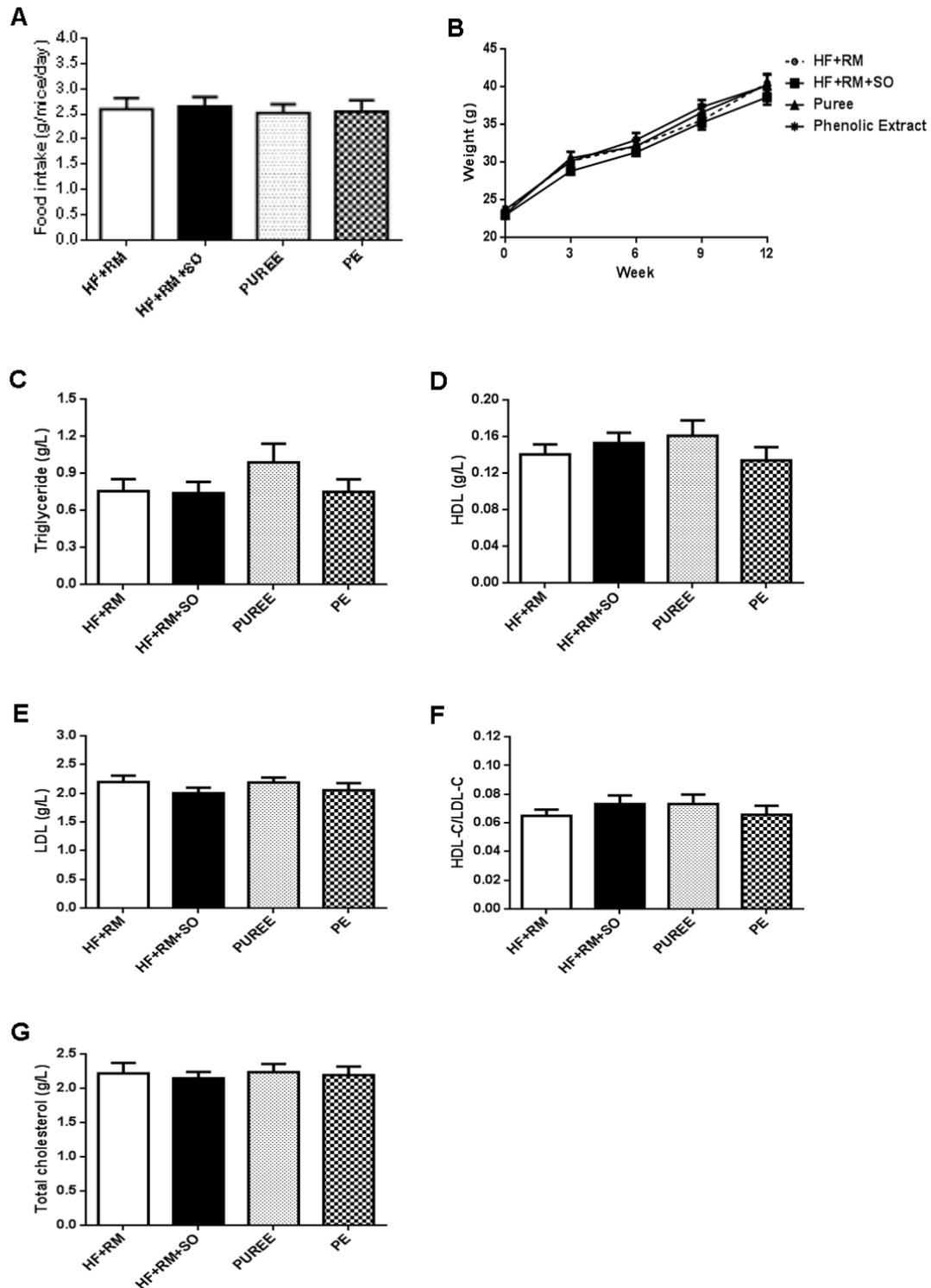
**Table 2.** Main phenolic classes content and characterization of flavan-3-ols for Puree and Phenolic extract matrices determined by HPLC following thioacidolysis.

Matrix	Monomeric procyanidins		Oligomeric procyanidins	mDP	Hydroxycinnamic acids		Dihydrochalcones		Flavonols	Total content in g/kg (mmol/kg)
	CAT	EPI			5-CQ	4-pCou	Phln	Phlx		
<b>Puree</b>	0.71 ± 0.01	6.2 ± 0.3	67 ± 0.7	4.3 ± 0.1	22 ± 0.5	0.49 ± 0.03	2.5 ± 0.1	0.57 ± 0.01	0.81 ± 0.01	5.0 ± 0.06 (16.3 ± 0.2)
<b>Phenolic extract</b>	0.47 ± 0.01	4.6 ± 0.1	68 ± 0.3	4.4 ± 0.1	21 ± 0.1	0.74 ± 0.01	2.6 ± 0.1	0.74 ± 0.02	1.9 ± 0.1	26 ± 0.1 (84.7 ± 0.5)

CAT: (+)-catechin. EPI: (-)-epicatechin. Flavonols: in equivalent quercetin. mDP: average degree of polymerization of monomeric and polymeric flavan-3-ols. 5-CQ: 5-caffeoylquinic acid. 4-pCou: 4-*paracoumaroyl*quinic acid. Phln: Phloretin-O-glucoside. Phlx: Phloretin-O-xyloglucoside. Value represent Mean ± SD (*n* = 3).

### **Impact of the diet protocols on body mass, glycemic regulation and blood lipid profile.**

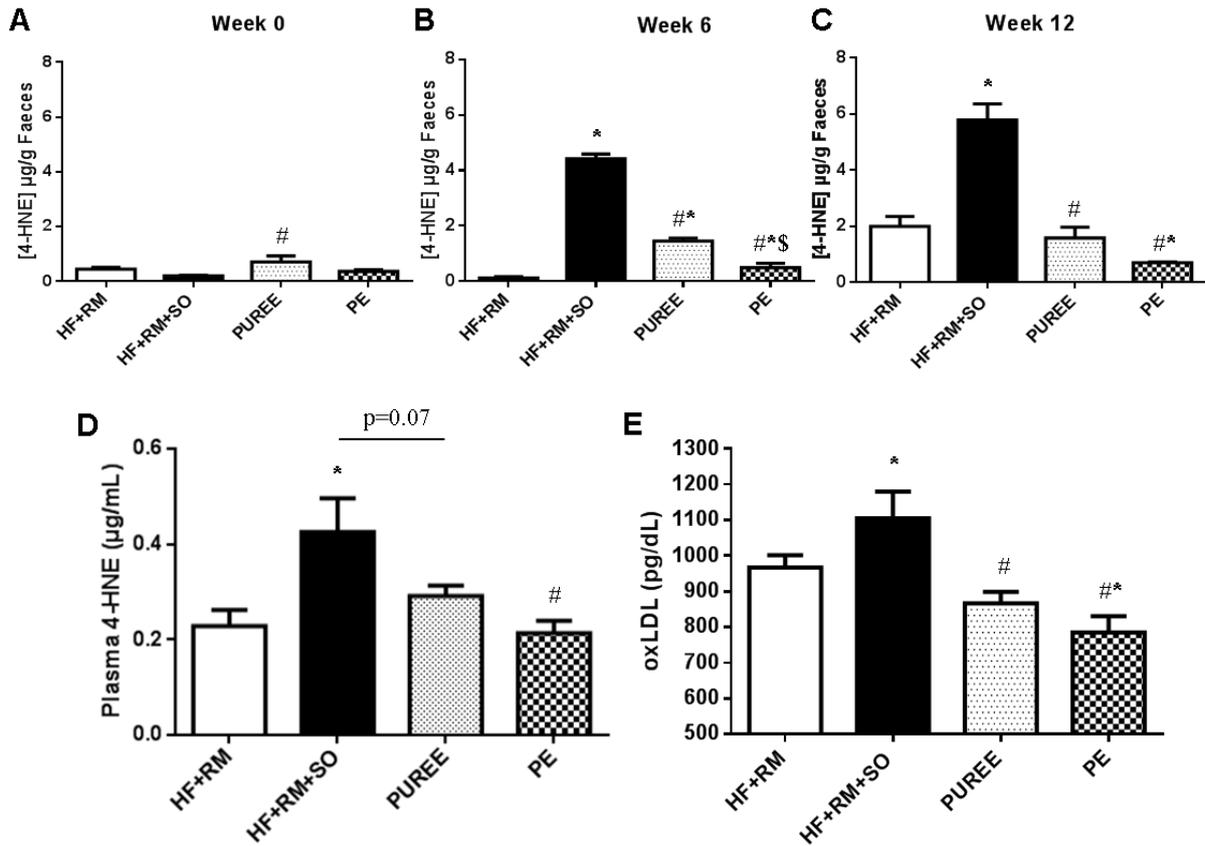
No difference in food intake and body mass was observed between groups during the 12 weeks of diet (Figure 1AB). Body weight showed a significant increase during protocol (Week 0 vs. Week 12). Blood analysis revealed no difference regarding triglycerides (Figure 1C), HDL (Figure 1D), LDL (Figure 1E), and total cholesterol levels (Figure 1G). Altogether, these results indicate that the different diets have no effect on lipid absorption. No difference in glycemic regulation (Suppl. Data. Figure 1ABCDE), adiposity index (Suppl. Data Figure 2AB) or liver weight (Suppl. Data Figure 2B) was additionally evidenced.



**Figure 1.** Effects of a Western diet with or without supplementation on weight gain and plasma lipoproteins. (A) Mean of daily food intake during 12 weeks per mice. (B) Follow up of body mass during the 12 weeks of different diets. Plasma triglyceride (C), HDL (D), LDL (E), HDL-cholesterol/LDL-cholesterol (F) and total cholesterol (G) were assessed at the end of the dietary protocols. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 15/grp for food intake, n = 20 for weight, n = 8 for LDL, HDL, HDL-c/LDL-c and total cholesterol).

## **Dietary effects on lipid oxidation during digestion and associated circulatory alterations**

To evaluate the impact of the different diets on lipid oxidation during digestion, 4-HNE formation was evaluated in faeces at different time points. Before the beginning of the diet (Week 0), only low contents of 4-HNE were detected (Figure 2A) and the observed effect of puree was probably the consequence of the variability of measurements made at the detection limit of LC/MS/APCI. At 6 (Figure 2B) and 12 weeks (Figure 2C), the Western diet (HF-RM-SO group) more strongly increased the 4-HNE formation (0.12 vs. 4.41  $\mu\text{g/g}$  at week 6 and 1.99 vs. 5.79 at week 12) compared to the HF+RM group in agreement with n-6 PUFA contents being 3 times higher in the HF-RM-SO group. This result also confirms that lipid oxidation induced by dietary heme iron can occur during *in vivo* gastrointestinal digestion. 4-HNE formation in HF+RM and HF+RM+SO groups seemed dependent of diet duration (statistically different at Week 12 vs. Week 6, 0.15 vs. 2.01  $\mu\text{g/g}$  and 4.41 vs. 5.79  $\mu\text{g/g}$ , respectively). This increase observed with the addition of n-6 PUFA was largely prevented by polyphenol supplementation with both apple matrices (Figure 2BC). After absorption of lipid oxidation product, plasmatic concentrations of 4-HNE were significantly higher in the HF+RM+SO group when compared to HF+RM (Figure 2D). In line with the results obtained on 4-HNE in faeces, the supplementation with apple polyphenols largely or significantly limited the increase in plasma 4-HNE (Figure 2D). OxLDL is a risk factor of endothelial dysfunction and a key step in atheromatous plaque formation. oxLDL level were significantly increased by the HF+RM+SO group when compared to HF+RM (Figure 2E). The supplementation with apple polyphenols significantly limited the increase in plasma oxLDL (Figure 2E). Interestingly, the oxLDL level after the ingestion of the phenolic extract was even lower than for the control diet HF+RM.



**Figure 2.** 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) formation during gastrointestinal digestion and lipid oxidation products in plasma. 4-HNE concentration in faeces at starting (A), 6 weeks (B) and 12 weeks (C) of diet measured by LC/MS/APCI. Plasma 4-HNE (D) and oxLDL (E) at the end of the 12 weeks. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (faeces  $n = 2-4$ /grp, plasma 4-HNE  $n = 6$ /grp, oxLDL  $n = 7$ /grp). \* $P < 0.05$  vs. HF+RM. # $P < 0.05$  vs. HF+RM+SO. \$ $P < 0.05$  vs. PUREE.

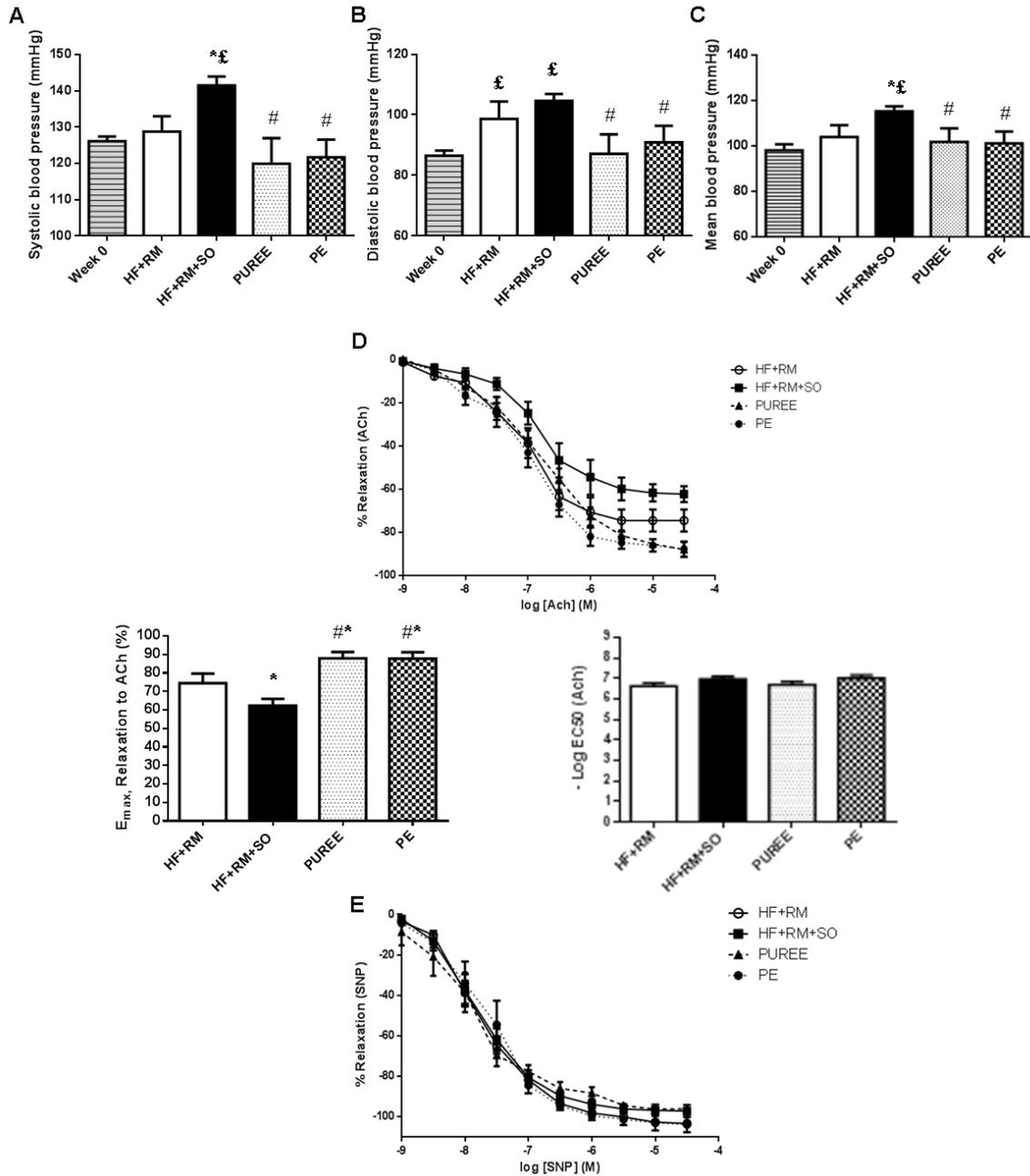
### Consequences of lipid oxidation on arterial blood pressure and endothelial function

To assess the consequences of these alterations on the vascular system we therefore evaluated arterial blood pressure and aortic vasomotor function. Arterial systolic pressure was significantly increased by diet HF+RM+SO when compared to HF+RM (128 vs. 141 mmHg) and week 0 (126 vs. 141 mmHg). Arterial diastolic pressure was increased but not significantly by the HF+RM+SO diet compared to HF+RM diet (98 vs. 104 mmHg, week 12) and significantly increased by diet HF+RM+SO when compared to week 0 (86 vs. 104 mmHg). Moreover, arterial diastolic blood pressure was significantly increased by HF+RM compared

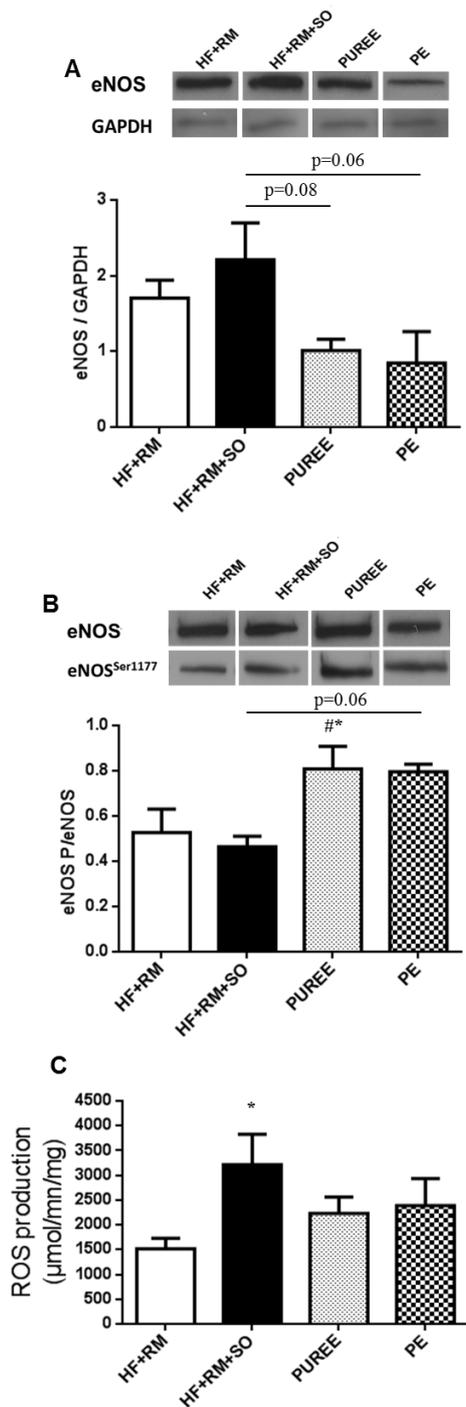
to week 0 (86 vs. 98 mmHg) (Figure 3AB). When the animals are supplemented with puree and the phenolic extract, these increases in systolic and diastolic arterial blood pressures were prevented (Figure 3AB). Data calculated for the mean blood pressure are fully consistent with those observed for the systolic blood pressure (Fig. 3C). In order to understand these alterations, we gave an insight into both the endothelium-dependent and independent relaxations of aortic rings. In the ApoE<sup>-/-</sup> mice model, the Western diet was associated with a lower endothelial vasorelaxation after endothelium-dependent dose-response to acetylcholine (62% vs. 75% maximal relaxation in HF+RM+SO vs. HF+RM, Figure 3D). Then, we assessed endothelium-independent vasorelaxation by dose-response to sodium nitroprusside (SNP). No difference in vascular relaxation to SNP was observed between these 2 groups (Figure 3E). These results strongly support that the Western diet is associated with a vascular endothelium impairment without smooth muscle cell alterations. Both apple polyphenol supplementations prevented the endothelial dysfunction observed when n-6 PUFA was added to the Western diet (Figure 3D). These observations are also consistent with the absence of effect of the supplemented diets on the endothelium-independent response to NO with increasing dose of SNP (Figure 3E).

In the aortic tissue, vasodilatation is mainly mediated by eNOS-NO dependent vascular smooth muscle relaxation (Ignarro et al., 1999). It has been previously reported that both NO and eNOS are highly sensitive to oxidative stress impairments. Consequently, we measured the impact of our experimental conditions on ROS production and eNOS expression and phosphorylation on its main activation site serine<sup>1177</sup> (eNOS<sup>Ser1177</sup>) in the aortic wall. The Western diet (HF+RM+SO) led to increased ROS production, which is known to contribute to the development of vascular dysfunction, compared to the High Fat diet HF+RM (Figure 4C). No difference was observed between HF+RM and HF+RM+SO group regarding eNOS expression and its phosphorylation on Ser1177. By contrast, both puree and the phenolic extract reduced ROS production by respectively 30% and 26% when compared to HF-RM-SO diet. No significant change of eNOS expression was observed even if, in both polyphenol supplementations we observed a lower expression. Interestingly, as evidenced by Western blot analysis, apple polyphenol supplementations increased eNOS activation state through its phosphorylation on serine<sup>1177</sup> (Figure 4AB).

The simultaneously observed lower ROS production and higher eNOS phosphorylation on Ser1177 (increased NO bioavailability) with both polyphenol supplementations may partly explain the preservation of the endothelial function.



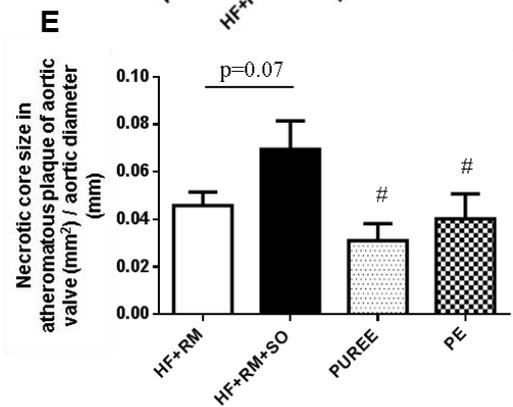
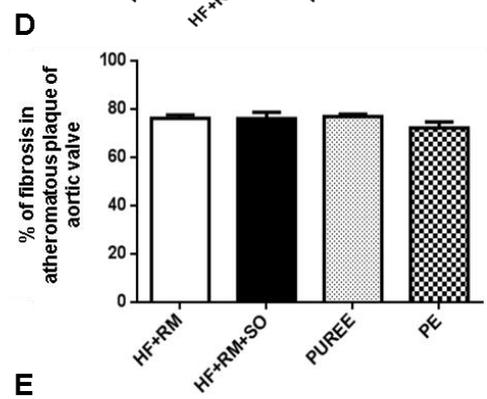
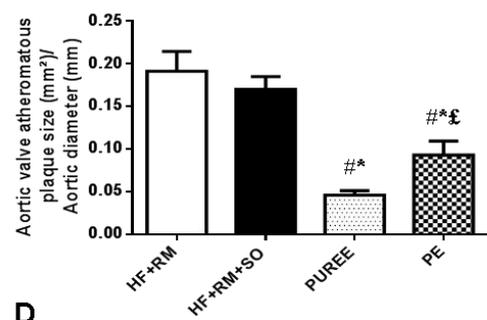
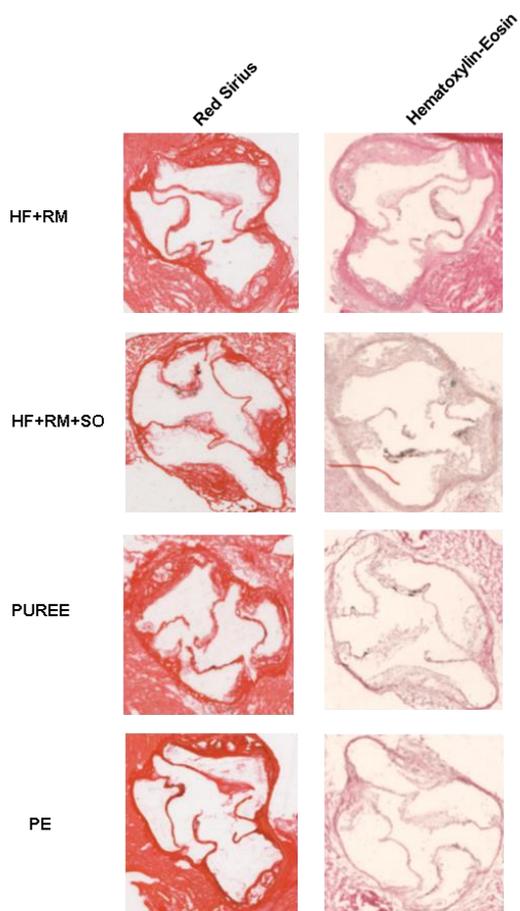
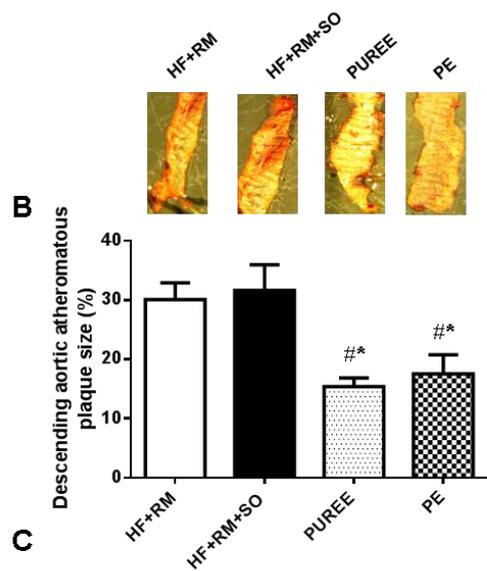
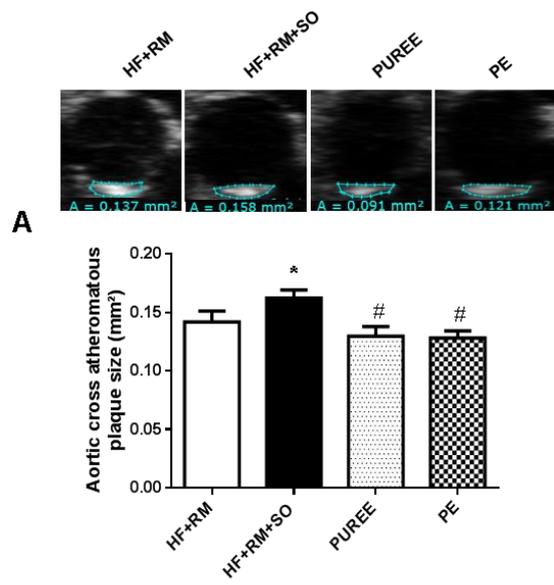
**Figure 3.** Effects of a Western diet and protection by apple polyphenol supplementation on vascular function. Systolic (A), diastolic (B) and mean (C) blood pressure measured at the end of dietary protocol by tail cuff method. D: Dose-dependent response to cumulative dose of acetylcholine (ACh) on aortic rings. *Left:* Maximal relaxation of aortic rings to ACh (Rmax). *Right:* half-effective maximal concentration of ACh (EC50) on aortic rings. E: Dose-dependent response to cumulative dose of Sodium nitroprusside (SNP) on aortic rings. Data are expressed in percent relaxation relative to maximal contraction obtained with 1  $\mu$ M of PE. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (blood pressure n = 12/grp, vasoreactivity n = 8/grp). \*P<0.05 vs. HF+RM. #P<0.05 vs. HF+RM+SO. £P<0.05 vs. Week 0.



**Figure 4.** Potential molecular mechanisms involved in endothelial dysfunction. eNOS expression (A) and phosphorylation at Ser 1177 (eNOS<sup>Ser1177</sup>, B) were measured in aortic tissue homogenates by Western immunoblotting. Total ROS production measured by electron paramagnetic resonance in aortic tissue homogenate (C). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (eNOS expression and phosphorylation n = 3 per group, ROS production n = 4/group). \*P<0.05 vs. HF+RM. #P<0.05 vs. HF+RM+SO.

### **Endothelial dysfunction and consequences on atheromatous plaque development.**

Endothelial dysfunction reflects a vascular phenotype prone to the pathogenesis of atherosclerosis. In this study, we have assessed the consequences of this endothelial dysfunction on vascular integrity. Different mice models (including ApoE<sup>-/-</sup>) have been developed to facilitate the study of diet-induced atherosclerosis. In ApoE<sup>-/-</sup> mice, subsequent lesion development can be detected at aortic bifurcations in the aortic arch, in the descending aorta and in other larger arteries (Venegas-Pino et al., 2013). The Western diet increased atheromatous plaque size in aortic cross as measured by echography (Figure 5A). No difference of atherosclerosis was observed by Oil-Red-O coloration on descending aorta of the n-6 PUFA-supplemented group (HF+RM+SO) when compared to the HF+RM group (30 vs. 32%, Figure 5B). In line with prevention of endothelial dysfunction, both polyphenol supplementations were able to reduce atheromatous plaque development on aortic cross and descending aorta. To characterize atheromatous plaque size, histological sections of aortic valves were performed. In this part of the artery, no difference on atheromatous plaque size was observed between HF+RM+SO group and HF+RM group. However, plaque size was reduced by both polyphenol supplementations (Figure 5C). To evaluate plaque stability, percentage of fibrosis and necrotic core area size in atheromatous plaque were assessed. No difference between any groups was observed regarding fibrosis (Figure 5D). However, we observed that necrotic core area was increased in the oxidizable n-6 PUFA group (Figure 5E). Another interesting result is that both apple supplementations managed to prevent this increase of the necrotic core area size (Figure 5E). This last result indicates that plaque stability may be affected negatively by n-6 PUFA oxidation and that preventing this oxidation, by adding polyphenols, may result in an enhanced vascular health.



**Figure 5.** Development and characterization of atheromatous plaque size induced by Western diet and protection by apple polyphenol supplementation. (A) Evaluation of aortic cross atheromatous plaque size performed by echography. (B) Atheromatous plaque size in descending aorta assessed by Oil-Red-O coloration. (C) Atheromatous plaque size in aortic valve relative to aortic diameter. (D) % of fibrosis in atheromatous plaque of aortic valve and (E) Necrotic core size in atheromatous plaque of aortic valve relative to aortic diameter assessed on histological sections. All measurements were performed at the end of dietary protocol. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (echography n = 8 per group, histological sections n = 5/mice/grp). \*P<0.05 vs. HF+RM. #P<0.05 vs. HF+RM+SO. £P<0.05 vs. PUREE.

## DISCUSSION

The aim of this study was to evaluate the mechanism involved in atherosclerosis development induced by the consumption of Western diet. We report here that our experimental Western diet is responsible for an *in vivo* endothelial dysfunction and atherosclerosis development. It has been previously reported that the ingestion of lipid oxidation products may play a role in the development of cardiovascular diseases (Staprans et al., 2005). In particular, a previous human study reported that the ingestion of an oxidized oil led to a decrease of the flow-mediated endothelium-dependent dilatation while not affecting the endothelium independent dilatation induced by glyceryl trinitrate (Williams et al., 1999). Our results are in line with these studies since an increase of lipid oxidation was associated with the development of vascular impairments. However, our work focusses on the effect of lipid oxidation products produced during digestion. Indeed, lipid oxidation products can be generated *in vivo* and the gastric tract has been proposed as a major site of lipid oxidation (Kanner and Lapidot, 2001). This was confirmed in our study since we observe that a Western diet including a n-6 PUFA-rich oil strongly increase the formation of 4-HNE during digestion, as shown by the higher recovery of 4-HNE in faeces. This higher lipid oxidation in the digestive tract (4-HNE) was associated with an increased absorption of 4-HNE resulting in a higher plasmatic concentration. These data agree well with results from Keller et al. who managed to observe 4-HNE in urine and various organs (liver, kidney, brain, heart) after its ingestion (Keller et al., 2015). These results further indicate that even if the majority of 4-HNE seems to be excreted in faeces, a part of it is absorbed and can be implicated in vascular impairments. Plasmatic concentration of 4-HNE after chronic HF+RM+SO diet was 2.6  $\mu$ M (0.43 mg/dL) which is slightly above

physiological concentrations reported by Negre-Salvayre et al. (2017). Such concentration of 4-HNE is known to trigger a variety of biological responses such as inflammation and cell proliferation (Negre-Salvayre et al., 2017). Moreover, the plasmatic 4-HNE values observed in our work were assessed after a prolonged fasting. We can thus hypothesize that higher values, that are reported to be proatherogenic, could be found in the postprandial state (Negre-Salvayre et al., 2017; Poli et al., 2008). This higher 4-HNE synthesis may be responsible of an increased endogenous oxidative stress in the vascular system. In fact, the absorption of this lipid oxidation product was associated, in our work, with an increase of ROS production and plasmatic malondialdehyde-modified oxLDL. An increase in oxLDL production has been largely reported in the literature as a key step in the development of vascular impairments such as endothelial dysfunctions or atherosclerosis which are generally described as the consequence of an oxidative stress resulting in an impairment of the NO pathway (Gradinaru et al., 2015; Steffen et al., 2012). This higher oxidative stress may be the consequence of an increased ROS production. Indeed a higher ROS production, as observed in this work, was previously reported as the consequence of the mitochondrial electron respiratory chain inhibition by 4-HNE (Landar et al., 2006; Picklo et al., 1999) or the increase of NADPH oxidase 2 expression and activity due to oxLDL uptake in endothelial cells by LOX-1 receptor (Negre-Salvayre et al., 2017). Consequently, it was not surprising to observe the worst endothelial function and atherosclerosis development in the group with the highest lipid oxidation. Despite no change of eNOS expression or phosphorylation was observed, we can hypothesize that the higher ROS production may impair NO bioavailability through its reaction with superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) to form peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot-}$ ). Consequently, lipid oxidation and the subsequent oxidative stress observed after the chronic consumption of a Western diet could be a key factor of atherosclerosis development.

Nonetheless, mouse models of atherosclerosis have some significant limitations. Unlike humans, they do not develop atherosclerosis throughout the whole length of aorta. Thus, it is recommended to evaluate the development of atheromatous plaques at several levels and by different methods (Venegas-Pino et al., 2013). We observed in our study an increase of atheromatous plaque size in aortic cross but not in descending aorta and aortic valve. Regarding atherosclerotic lesions, no difference was observed regarding fibrosis after our diets. However, necrotic core was increased by the Western diet. The increase in necrotic core is reported as an important factor of atheromatous plaque instability (Seimon and Tabas, 2009). Indeed, 4-HNE adduct can accumulate in the lipidic necrotic core of advanced atherosclerotic lesions. This

local accumulation induces macrophage and smooth muscle cell apoptosis which contribute to plaque destabilization and rupture thus increasing athero-thrombotic events (Negre-Salvayre et al., 2017). By contrast, atherosclerotic plaque rupture and arterial thrombosis, which are the direct cause of most myocardial infarctions in humans, are not observed in the majority of atherosclerosis prone mouse models.

In order to prevent the deleterious effects of a Western diet, it seems necessary to implement antioxidant strategies. In this study, we evaluated the antioxidant effects of a supplementation in apple, a widely consumed fruit. We reported here that both apple polyphenol supplementations remarkably reduced 4-HNE formation during digestion and plasmatic oxidative stress as shown by drastically reduced levels in oxLDL and 4-HNE (Fig. 2). The bioaccessibility of phenolic compounds in the gastric tract appears to be matrix- and compound-dependent. Actually, thermal processing may have largely increased polyphenol bioaccessibility in puree when compared to raw fruit (Bolea et al., Submitted 2019). Thus, comparable polyphenol bioaccessibilities for puree and the phenolic extract may explain the very similar results obtained throughout this study for both supplementations. Furthermore, if hydroxycinnamic acids can be recovered in the aqueous phase of the gastric digesta, oligomeric procyanidins may not be detected owing to their affinity for dietary fibers and proteins (Dufour et al., 2018). However, protein hydrolysis in the intestinal tract allows the release of oligomeric procyanidins. Chlorogenic acid as well as monomeric and oligomeric procyanidins display ortho-dihydroxyphenyl groups which can reduce the pro-oxidant hypervalent heme iron form ( $\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) into metmyoglobin ( $\text{MbFe}^{\text{III}}$ ). This reduction inhibits the initiation phase of the lipid oxidation process and has been previously reported as a major antioxidant effect of procyanidins and hydroxycinnamic acids in *in vitro* digestion (Lorrain et al., 2007). Such inhibition of lipid oxidation can explain the lower lipid oxidation in these groups. Since we previously pointed out the deleterious effects of digestive lipid oxidation on vascular integrity, we hypothesized that its inhibition by polyphenol consumption could prevent vascular impairments. This hypothesis was largely confirmed regarding the decrease of ROS production and vascular impairments. An interesting result was an increase in aortic eNOS phosphorylation at Ser1177 observed in both groups ingesting polyphenols. It has been previously reported that 4-HNE was responsible for an impairment of Akt phosphorylation which is responsible of eNOS phosphorylation on Ser1177 (Nakashima et al., 2003). Consequently, the higher eNOS phosphorylation on Ser1177 observed in both supplemented groups, which may promote NO synthesis, may be a direct consequence of the lower 4-HNE concentration in blood. We can

therefore conclude that the lowering of lipid oxidation during digestion when apple polyphenols were added to the Western diet may explain the protective effects observed on vascular system. This result is in line with previous studies pointing out that flavanols may result in eNOS phosphorylation on its serine 1177 (Oak et al., 2018). Moreover, chronic studies providing PCs-rich sources such as chocolate and tea have shown beneficial effects on flow-mediated dilatation (Hooper et al., 2008; Sansone et al., 2015).

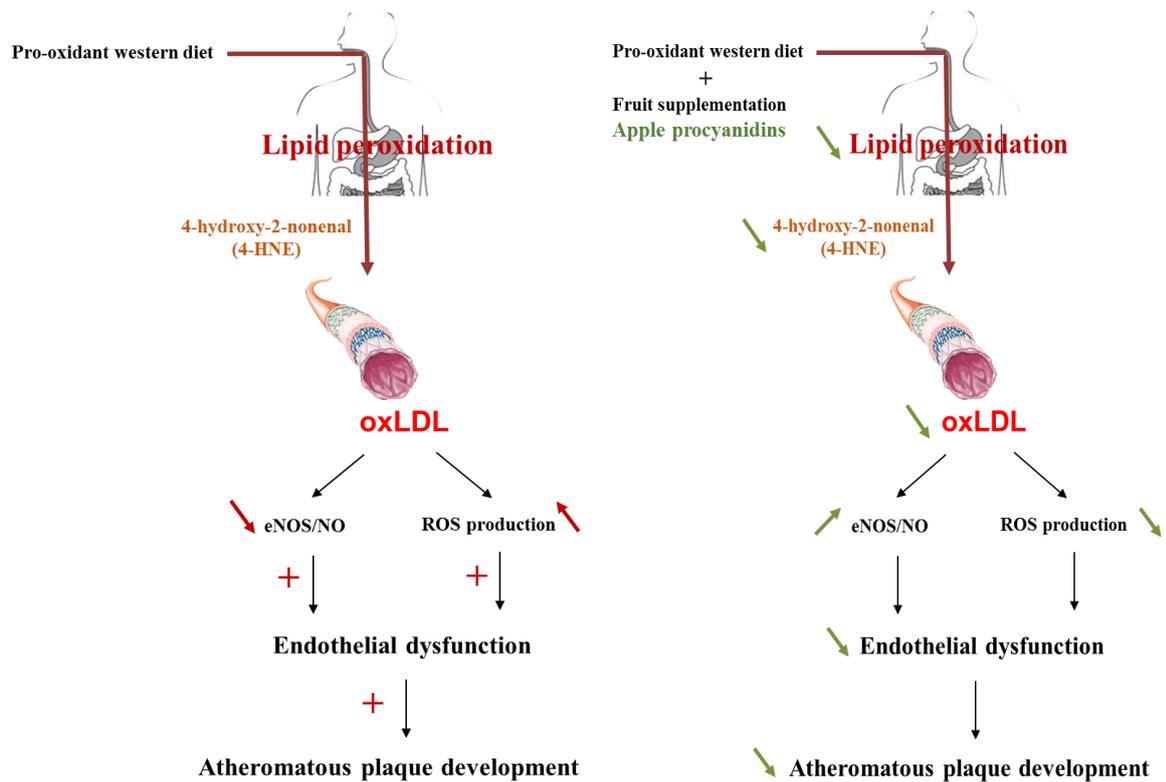
However, some post absorption effects of apple polyphenols should not be excluded. Indeed, after absorption, polyphenol metabolites circulate as conjugates (sulfate, glucuronide or O-methylether forms of the aglycones) mainly bound to albumin or as microbial metabolites with total metabolite concentrations rarely exceeding 1  $\mu$ M (Manach et al., 2004). For example, epicatechin- $\beta$ -D- glucuronide, 3'-O-methylepicatechin and 4'-O-methylepicatechin were reported to be able to inhibit endothelial NADPH oxidase and therefore superoxide anion production although direct scavenging activity towards superoxide anions was largely abolished for these metabolites (Steffen et al., 2008).

Our results point out that the protective effects of polyphenols on oxidative stress and endothelial function are associated with a prevention of atherosclerosis development and instability plaque. These results are in accordance with numerous studies reporting the interest of a chronic uptake of apple polyphenols to reduce risk factors (arterial pressure, blood lipid profile, inflammation, oxidative stress) and cardiovascular diseases (anti-angiogenic, anti-atherogenic and anti-hypertensive) in rodents or humans (Andre et al., 2012; Aune et al., 2017; Hyson, 2011; Koutsos et al., 2015; Stoclet et al., 2004). However, no study was yet able to link these effects with a potential antioxidant activity during digestion.

## CONCLUSION

In conclusion, a Western diet rich in n-6 PUFA appears to exacerbate lipid oxidation during gastric digestion leading to the formation of 4-HNE among other lipid oxidation products. The absorption of these products generated *in vivo* is for the first time associated with plasmatic oxidative stress as evidenced by increased oxLDL, plasma 4-HNE and ROS production. These alterations largely enhance the endothelial dysfunction and the development of atherosclerosis in the ApoE<sup>-/-</sup> mice model. By contrast, the inhibition of lipid oxidation and 4-HNE synthesis in the gastrointestinal tract by a supplementation in apple polyphenols under two different matrix forms remarkably prevent those impairments. Consequently, the consumption of

procyanidin-rich fruits such as apple or pear should be encouraged to attenuate the deleterious effect of the Western diet.



**Figure 6.** Effects of a Western diet rich in heme iron and polyunsaturated fatty acids on both vascular function and atherosclerosis development and protection by polyphenol addition into the diet.

## REFERENCES

- Andre, C.M., Greenwood, J.M., Walker, E.G., Rassam, M., Sullivan, M., Evers, D., Perry, N.B., and Laing, W.A. (2012). Anti-inflammatory procyanidins and triterpenes in 109 apple varieties. *J Agric Food Chem* *60*, 10546-10554.
- Arts, I.C., and Hollman, P.C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* *81*, 317S-325S.
- Aune, D., Giovannucci, E., Boffetta, P., Fadnes, L.T., Keum, N., Norat, T., Greenwood, D.C., Riboli, E., Vatten, L.J., and Tonstad, S. (2017). Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality-a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Int J Epidemiol* *46*, 1029-1056.
- Battault, S., Singh, F., Gayraud, S., Zoll, J., Reboul, C., and Meyer, G. (2016). Endothelial function does not improve with high-intensity continuous exercise training in SHR: implications of eNOS uncoupling. *Hypertens Res* *39*, 70-78.
- Bolea, G., Ginies, C., Vallier, M.J., and Dufour, C. (2019). Lipid protection by polyphenol-rich apple matrices is modulated by pH and pepsin in in vitro gastric digestion *Food and Function* *submitted*.
- Bonetti, P.O., Lerman, L.O., and Lerman, A. (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *23*, 168-175.
- Ceymann, M., Arrigoni, E., Scharer, H., Nising, A.B., and Hurrell, R.F. (2012). Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *Journal of Food Composition and Analysis* *26*, 128-135.
- Chapple, S.J., Cheng, X., and Mann, G.E. (2013). Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox Biol* *1*, 319-331.
- Chiu, J.J., and Chien, S. (2011). Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* *91*, 327-387.
- Clifford, M.a.B., J.E. (2006). *Flavonoids : chemistry, biochemistry and applications*. ed O Anderson and K Markham, CRC Press, Boca Raton, 319-370.
- Dauchet, L., Amouyel, P., Hercberg, S., and Dallongeville, J. (2006). Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. *J Nutr* *136*, 2588-2593.
- Gargiulo, S., Testa, G., Gamba, P., Staurenghi, E., Poli, G., and Leonarduzzi, G. (2017). Oxysterols and 4-hydroxy-2-nonenal contribute to atherosclerotic plaque destabilization. *Free Radical Biology and Medicine* *111*, 140-150.
- Gradinaru, D., Borsa, C., Ionescu, C., and Prada, G.I. (2015). Oxidized LDL and NO synthesis--Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mech Ageing Dev* *151*, 101-113.

Hansson, G.K., Robertson, A.K.L., and Soderberg-Naucler, C. (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol-Mech* 1, 297-329.

He, F.J., Nowson, C.A., and MacGregor, G.A. (2006). Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies. *Lancet* 367, 320-326.

Hooper, L., Kay, C., Abdelhamid, A., Kroon, P.A., Cohn, J.S., Rimm, E.B., and Cassidy, A. (2012). Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Clin Nutr* 95, 740-751.

Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., Ryder, J.J., Hall, W.L., and Cassidy, A. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 88, 38-50.

Hyson, D.A. (2011). A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. *Adv Nutr* 2, 408-420.

Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A., and Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34, 879-886.

Kanner, J. (2007). Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 1094-1101.

Kanner, J., and Lapidot, T. (2001). The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 31, 1388-1395.

Kay, C.D., Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., and Cassidy, A. (2012). Relative impact of flavonoid composition, dose and structure on vascular function: a systematic review of randomised controlled trials of flavonoid-rich food products. *Mol Nutr Food Res* 56, 1605-1616.

Keller, J., Baradat, M., Jouanin, I., Debrauwer, L., and Gueraud, F. (2015). "Twin peaks": Searching for 4-hydroxynonenal urinary metabolites after oral administration in rats. *Redox Biology* 4, 136-148.

Koutsos, A., Tuohy, K.M., and Lovegrove, J.A. (2015). Apples and cardiovascular health-- is the gut microbiota a core consideration? *Nutrients* 7, 3959-3998.

Landar, A., Zmijewski, J.W., Dickinson, D.A., Le Goffe, C., Johnson, M.S., Milne, G.L., Zannoni, G., Vidari, G., Morrow, J.D., and Darley-Usmar, V.M. (2006). Interaction of electrophilic lipid oxidation products with mitochondria in endothelial cells and formation of reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H1777-1787.

Lorrain, B., Dangles, O., and Dufour, C. (2007). Stability and antioxidant capacity of food polyphenols in two chemical models of the gastric tract. *Ann Nutr Metab* 51, 160-160.

Lorrain, B., Dangles, O., Genot, C., and Dufour, C. (2010). Chemical modeling of heme-induced lipid oxidation in gastric conditions and inhibition by dietary polyphenols. *J Agric Food Chem* 58, 676-683.

Lorrain, B., Dangles, O., Loonis, M., Armand, M., and Dufour, C. (2012). Dietary Iron-Initiated Lipid Oxidation and Its Inhibition by Polyphenols in Gastric Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 9074-9081.

Macready, A.L., George, T.W., Chong, M.F., Alimbetov, D.S., Jin, Y., Vidal, A., Spencer, J.P., Kennedy, O.B., Tuohy, K.M., Minihane, A.M., *et al.* (2014). Flavonoid-rich fruit and vegetables improve microvascular reactivity and inflammatory status in men at risk of cardiovascular disease--FLAVURS: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 99, 479-489.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79, 727-747.

Negre-Salvayre, A., Garoby-Salom, S., Swiader, A., Rouahi, M., Pucelle, M., and Salvayre, R. (2017). Proatherogenic effects of 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 111, 127-139.

Oak, M.H., Auger, C., Belcastro, E., Park, S.H., Lee, H.H., and Schini-Kerth, V.B. (2018). Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium. *Free Radic Biol Med* 122, 161-170.

Perez-Jimenez, J., Fezeu, L., Touvier, M., Arnault, N., Manach, C., Hercberg, S., Galan, P., and Scalbert, A. (2011). Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *American Journal of Clinical Nutrition* 93, 1220-1228.

Picklo, M.J., Amarnath, V., McIntyre, J.O., Graham, D.G., and Montine, T.J. (1999). 4-Hydroxy-2(E)-nonenal inhibits CNS mitochondrial respiration at multiple sites. *J Neurochem* 72, 1617-1624.

Poli, G., Schaur, R.J., Siems, W.G., and Leonarduzzi, G. (2008). 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* 28, 569-631.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138, S419-420.

Sansone, R., Rodriguez-Mateos, A., Heuel, J., Falk, D., Schuler, D., Wagstaff, R., Kuhnle, G.G.C., Spencer, J.P.E., Schroeter, H., Merx, M.W., *et al.* (2015). Cocoa flavanol intake improves endothelial function and Framingham Risk Score in healthy men and women: a randomised, controlled, double-masked trial: the Flaviola Health Study. *British Journal of Nutrition* 114, 1246-1255.

Seimon, T., and Tabas, I. (2009). Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J Lipid Res* 50 Suppl, S382-387.

Staprans, I., Pan, X.M., Rapp, J.H., and Feingold, K.R. (2005). The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 49, 1075-1082.

Steffen, Y., Gruber, C., Schewe, T., and Sies, H. (2008). Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 469, 209-219.

Steffen, Y., Vuillaume, G., Stolle, K., Roewer, K., Lietz, M., Schueller, J., Lebrun, S., and Wallerath, T. (2012). Cigarette smoke and LDL cooperate in reducing nitric oxide bioavailability in endothelial cells via effects on both eNOS and NADPH oxidase. *Nitric Oxide* 27, 176-184.

Steinberg, D., and Witztum, J.L. (2010). Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 2311-2316.

Stoclet, J.C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M.H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., and Schini-Kerth, V.B. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 500, 299-313.

Venegas-Pino, D.E., Banko, N., Khan, M.I., Shi, Y.Y., and Werstuck, G.H. (2013). Quantitative Analysis and Characterization of Atherosclerotic Lesions in the Murine Aortic Sinus. *Jove-J Vis Exp*.

Vulcain, E., Goupy, P., Caris-Veyrat, C., and Dangles, O. (2005). Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: Action in the aqueous vs. lipid phase. *Free Radic Res* 39, 547-563.

Williams, M.J.A., Sutherland, W.H.F., McCormick, M.P., de Jong, S.A., Walker, R.J., and Wilkins, G.T. (1999). Impaired endothelial function following a meal rich in used cooking fat. *Journal of the American College of Cardiology* 33, 1050-1055.

Wojdylo, A., Oszmianski, J., and Laskowski, P. (2008). Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 6520-6530.

Zhan, J., Liu, Y.J., Cai, L.B., Xu, F.R., Xie, T., and He, Q.Q. (2017). Fruit and vegetable consumption and risk of cardiovascular disease: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Crit Rev Food Sci* 57, 1650-1663.

## **Supplemental data**

### **Supplemental Material**

#### **Fasting blood glucose, glucose and insulin tolerance tests.**

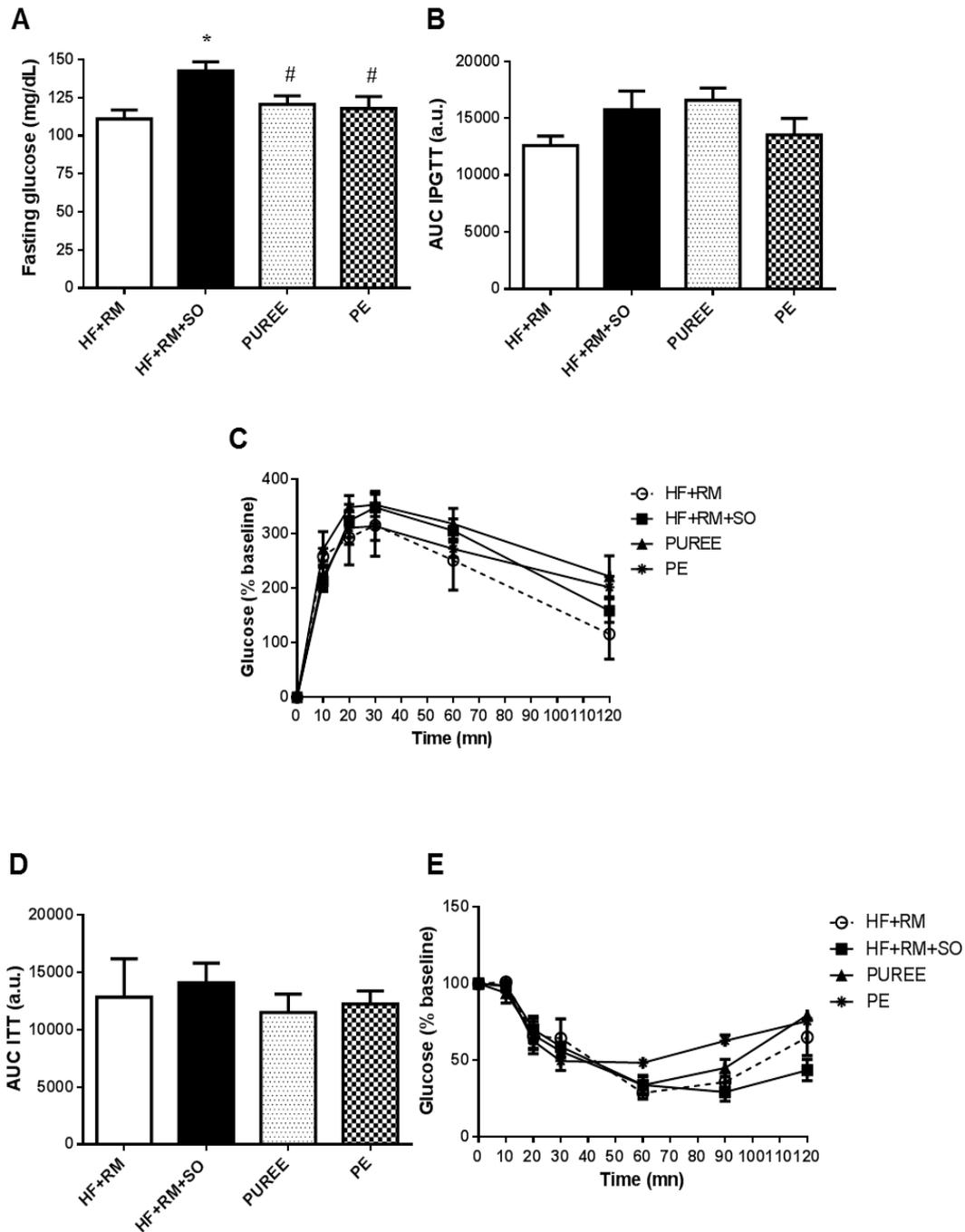
Intra-Peritoneal Glucose Tolerance Tests (IPGTT) were performed at the end of the 11<sup>th</sup> week of the chronic diet protocol. After an overnight fasting, blood was obtained via tail clip to assess fasting blood glucose (Caresens® N, I sens). Then, mice received an intra-peritoneal injection of glucose solution (1.5 g/kg) and blood glucose was measured at 10, 20, 30, 60 and 120 minutes after the injection. On the following week, intra-peritoneal Insulin Tolerance Test (ITT) was performed. After a 6 hour fasting (8h-14h), glucose was measured and mice subsequently received an intra-peritoneal injection of insulin solution (2 UI/kg). Blood glucose was measured at 10, 20, 30, 60, 90 and 120 minutes after insulin injection.

#### **Assessment of Adiposity index**

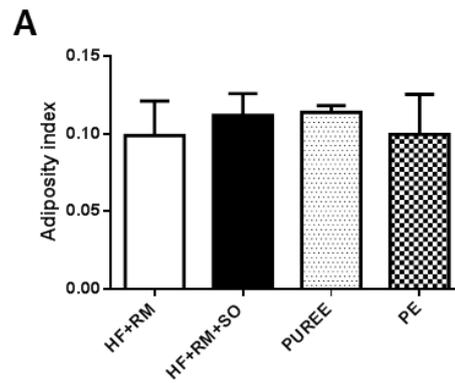
At the end of the 12 weeks protocol diets, mice were sacrificed, total epididymal, lingual and perirenal fat were removed and weighed to obtain an index of adiposity. Adiposity index was defined as (epididymal fat + lingual fat + perirenal fat)/mouse weigh.

### **Supplemental results**

After 12 weeks of chronic diet protocol, only fasting glucose was increased by Western diet and reduced by apple supplementation (Supp. Figure 1A). No difference was observed on IPGTT and ITT (area under curve and time to peak) (Supp. Figure 1BCDE). Those results point out that glycemic regulation was not altered by our different diets. No difference on adiposity index and liver weigh was reported (Supp. Figure 2 AB). These results indicate that fat repartition was not affected by our different diets.



**Supplemental Figure 1.** Effect of chronic protocol diet on glycaemia index. A: Fasting blood glucose measured at the end of the 11<sup>th</sup> week of the chronic protocol diet. B: Area under the curve (AUC) corresponding to Intra-Peritoneal Glucose Tolerance Tests (IPGTT) measured at the end of the 11<sup>th</sup> week of the chronic diet protocol. C: Evolution of blood glucose concentration during IPGTT at the end of the 11<sup>th</sup> week of the chronic protocol diet. D: Area under the curve corresponding to Insulin Tolerance Test (ITT) at week 12. E: Following blood glucose concentration during ITT at week 12.



**B**

Tissue	HF+RM	HF+RM+SO	PUREE	PE
Epididymal adipose tissue (g)	2.11±0.53	2.47±0.24	2.77±0.22	1.96±0.20
Perirenal adipose tissue (g)	0.69±0.22	1.12±0.12	1.14±0.11	0.78±0.040
Linguinal adipose tissue (g)	0.59±0.09	0.78±0.14	0.74±0.05	0.76±0.10
Adiposity index	0.098±0.015	0.11±0.015	0.11±0.005	0.099±0.02
Liver (g)	1.28±0.11	1.30±0.050	1.41±0.13	1.65±0.22

**Supplemental Figure 2.** Effect of chronic diet protocol on adiposity index and liver weight. A: Adiposity index assessment at the end of chronic protocol diet. B: Detailed repartition of adiposity index and liver weigh.

## **DISCUSSION**

### ***Oxydation lipidique durant la digestion et pathologies vasculaires***

Les pathologies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Parmi celles-ci les pathologies ischémiques telles que les maladies coronariennes ou les AVC sont les plus meurtrières. La prévalence de ces pathologies a fortement augmenté au cours des dernières décennies, avec comme l'un des principaux facteurs de risque une alimentation trop riche en viande rouge et en lipides impliquant une surconsommation d'AGPI n-6. Les AGPI sont sensibles aux processus d'oxydation endogènes lors de la digestion. Ces processus altèrent les qualités nutritionnelles en réduisant l'apport en acides gras essentiels et en produisant des produits d'oxydation secondaires (hydroperoxydes, aldéhydes, cétones, etc.) qui pourraient être impliqués dans les événements précurseurs des pathologies cardiovasculaires. Nos différents travaux avaient comme premier objectif de comprendre l'influence de différents facteurs de la digestion gastrique sur la synthèse de produits secondaires d'oxydation lipidique pour un repas modèle de type occidental. Le second objectif était d'évaluer les effets à long terme de leur absorption sur la fonction vasculaire. Parallèlement à ces objectifs, nous avons également évalué l'effet d'un régime riche en lipides saturés sur la fonction vasculaire comparé à un régime standard (voir Annexes).

Ainsi, dans nos modèles de digestion *in vitro*, l'effet des différents paramètres de la digestion (pH, pepsine, lipase) sur le niveau d'oxydation lipidique a été mis en évidence. En début de digestion, l'apparition d'une forme de micro-métmyoglobine par protéolyse partielle induite par la pepsine accélère l'initiation de l'oxydation lipidique. Cependant, au cours de la digestion gastrique avec la diminution du pH en présence de pepsine, cette oxydation semble être fortement ralentie probablement par la libération d'hématine dont la réactivité ne serait pas optimale dans cet environnement de par son interaction avec la pepsine. Lors du passage en phase intestinale à pH 6,5, le pro-oxydant peut-être majoritairement sous forme d'hématine mais également sous forme de micro-métmyoglobine en particulier lors de la vidange gastrique en début de digestion. Au cours de la phase intestinale (duodénum-jéjunum) suivant une phase gastrique à pH 5 (métmyoglobine) ou à pH 3 (hématine), l'oxydation lipidique se poursuit ou reprend (diènes conjugués). Cependant, la réaction du 4-HNE avec les protéines des enzymes de la digestion conduit à sous-estimer sa formation à la fin de cette phase. De ce fait, aucune différence n'a pu être mise en évidence concernant la concentration en 4-HNE libre entre la fin des phases gastrique et intestinale. D'autres investigations sont nécessaires pour préciser les formes de fer, les classes de lipides (TG, phospholipides) impliquées dans l'oxydation, ainsi que les mécanismes à l'origine de la phase de latence observée au début de la phase intestinale.

Même si les modèles de digestion *in vitro* ne sont pas tout à fait identiques (concentration en pro-oxydant ou pepsine, durée de la phase gastrique), nos résultats sont en accord avec la littérature concernant l'apparition de produits d'oxydation lipidique au cours de la digestion (diènes conjugués lipidiques, hydroperoxydes lipidiques, malondialdéhyde et 4-HNE) (Asprogenidi, 2015; Larsson et al., 2016; Lorrain et al., 2010; Lorrain et al., 2012; Tullberg et al., 2016). Il a également été montré *in vivo*, chez le mini-porc, qu'un repas de type occidental à base d'huile de tournesol et de bœuf haché conduisait à la formation de TBARS, diènes conjugués lipidiques et 4-HNE au cours de la digestion gastrique (Delosiere et al., 2016; Gobert et al., 2014).

Lors de la mesure du 4-HNE dans les fèces et le plasma de souris, la forte augmentation des acides gras n-6 dans le régime est associée, à moyen et long termes, à une augmentation de la formation de ce produit d'oxydation secondaire lors de la digestion. Ces résultats *in vivo* viennent ainsi confirmer nos résultats *in vitro*. Au niveau intestinal, il a été montré chez le rat sain qu'une partie des produits d'oxydation, et notamment le 4-HNE, est absorbée (Keller et al., 2015). De plus, il a été montré que la consommation d'un régime gras pouvait altérer l'état de la barrière intestinale par une augmentation de sa perméabilité (Masumoto et al., 2016). Ainsi, l'augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale pourrait entraîner une surabsorption de 4-HNE.

L'oxydation lipidique observée durant la digestion était associée dans nos travaux à une modification du métabolisme lipidique par une augmentation du taux d'oxydation des LDL (LDLox). Il est démontré que les LDLox sont un facteur clé dans l'apparition d'une dysfonction endothéliale et du développement de l'athérosclérose (Witztum, 1991). L'augmentation du taux de LDLox peut être à l'origine au niveau endothélial d'une surexpression d'enzyme oxydante comme la 15-lipoxygénase (Galle et al., 2006), de l'altération du cycle calcique cytosolique induisant l'apoptose ou la nécrose (Vindis et al., 2005) ainsi que de la synthèse de protéines pro-thrombotiques (Berliner and Heinecke, 1996). De plus, l'altération de la vasomotricité endothéliale pourrait être due à une augmentation de la calvéoline-1 inhibant la production de NO par la eNOS (Feron et al., 1999), à un découplage de la eNOS par déplétion du BH<sub>4</sub> ou à une diminution de la phosphorylation sur la serine 1177 (Negre-Salvayre et al., 2017). L'augmentation de la perméabilité endothéliale, la stimulation de l'inflammation (Gargiulo et al., 2017), l'apparition d'un stress du réticulum endoplasmique et un vieillissement prématuré des cellules endothéliales (Negre-Salvayre et al., 2017) participeraient également à ce processus dégénératif. Enfin, le 4-HNE entraîne des altérations rénales et la production d'angiotensine II

hypertensive qui pourrait à long terme contribuer aux effets délétères de la pression artérielle observés au niveau vasculaire (Landmesser et al., 2007; Negre-Salvayre et al., 2017).

La dysfonction endothéliale se caractérise le plus souvent par une atteinte de l'équilibre entre agents vasoconstricteurs et agents vasodilatateurs. Ainsi, la plupart des facteurs de risque cardiovasculaire sont associés à une baisse de la capacité de vasorelaxation. Nos travaux ont montré que cette dysfonction endothéliale était liée à une augmentation de la production de ERO et plus particulièrement de l'anion superoxyde responsable probablement d'une baisse de la disponibilité du NO par la formation de peroxynitrite. Dans notre modèle d'alimentation, une diminution de la biodisponibilité du NO pourrait expliquer les altérations de la vasomotricité et l'augmentation de la pression artérielle. De plus, la formation de peroxynitrite pourrait exacerber les effets délétères liés au stress oxydant. En effet, le NO ne joue pas qu'un rôle vasomoteur, il maintient également la paroi vasculaire dans un état d'équilibre en inhibant l'inflammation, la prolifération cellulaire et l'agrégation plaquettaire. C'est un messager secondaire essentiel pour maintenir l'intégrité et l'homéostasie vasculaire.

L'altération du fonctionnement endothélial s'accompagne d'altérations irréversibles de la paroi favorisant la progression des lésions athérosclérotiques. La présence d'un stress oxydant et d'une inflammation s'auto-entretenant favorisent également le recrutement des monocytes circulants et des lymphocytes T, la formation des cellules spumeuses, la prolifération et migration des CML ainsi que la formation des plaques d'athérome. Nos résultats ont montré une aggravation du développement des plaques d'athérome en présence d'un régime chronique occidental. De plus, Il a été montré que les LDLox, par l'intermédiaire de leurs actions sur le développement du cœur lipidique des plaques d'athérome et de la sécrétion de MMP par les macrophages, induisent une fragilisation de la chape fibreuse tout comme ils participeraient à la déstabilisation et à la rupture de celle-ci (Xu et al., 1999).

Les souris ApoE<sup>-/-</sup> constituent un modèle majeur dans l'étude du développement des plaques d'athérome et dans la compréhension de la physiopathologie de l'athérosclérose. En effet, dans ce modèle, l'initiation et la progression de l'athérosclérose sont en de nombreux points analogues à celles observées chez l'homme. Les souris ApoE<sup>-/-</sup>, dont le fond génétique est celui des souris C57BL/6, développent spontanément des plaques d'athérome. L'ApoE est impliquée dans le transport lipidique plasmatique vers les tissus de stockage périphérique et hépatique. L'importante dyslipidémie (hyperlipémie à VLDL et hypercholestérolémie) ainsi qu'un phénotype inflammatoire sont à l'origine de l'athérogénèse spontanée. Bien que controversé, il est admis que les lésions athérosclérotiques chez les souris ne présentent pas

d'événements athéromatose majeurs spontanés (rupture de plaques notamment) (Venegas-Pino et al., 2013), impliquant une limitation importante à l'étude de la vulnérabilité et de la stabilité de la plaque dans ce modèle. Une absence d'épaississement de l'intima chez la souris est également observée. De plus, les plaques d'athérome ne se développent pas de manière homogène sur l'ensemble de l'aorte et il est recommandé de réaliser cette mesure en différents points et par différentes méthodes (Venegas-Pino et al., 2013). De ce fait, la réalisation d'un profil lipidique de la plaque d'athérome aurait donné plus d'informations sur les caractéristiques de celle-ci. Il serait également très intéressant de pouvoir évaluer la présence de produits d'oxydation lipidique comme le 4-HNE à l'intérieur de celle-ci.

De manière générale, nous avons pu montrer qu'en plus de l'oxydation qui peut se produire dans la paroi de l'artère, celle induite lors de la digestion pourrait jouer un rôle primordial à long terme dans le développement d'événements cliniques et potentiellement d'accidents ischémiques.

### ***Stratégie alimentaire antioxydante de protection à long terme de la fonction vasculaire***

De nombreux travaux sont consacrés à l'identification de stratégies thérapeutiques capables d'améliorer ou de prévenir l'altération de la fonction endothéliale. Ces stratégies sont une priorité car si elles sont appliquées de manière précoce dans le processus pathologique il est possible de retarder voire de prévenir les altérations vasculaires et leurs manifestations cliniques. Ainsi, le second objectif de nos travaux a été d'évaluer le potentiel antioxydant de polyphénols de pomme riches en PCs au cours de la digestion et leur capacité à protéger la fonction vasculaire à long terme. Notre modèle s'inscrit dans le cadre d'une stratégie de prévention primaire par supplémentation en antioxydants d'un régime de type occidental démontré comme pro-oxydant. Le processus athérosclérotique commençant dès l'enfance, l'évolution de la plaque d'athérome reste asymptomatique de nombreuses années et la mise en place d'une telle stratégie pourrait limiter ou empêcher le développement de l'athérosclérose et par suite la survenue d'événements thrombotiques suite à la rupture de plaques instables ou par sténose artérielle.

Nos résultats ont montré l'efficacité de la supplémentation alimentaire en polyphénols de pomme sous différentes formes matricielles (frais, purée, extrait) en modèle *in vitro* de digestion gastrique dans la réduction de l'apparition de produits d'oxydation potentiellement absorbables. Il semblerait que l'activité antioxydante soit maximale en début de digestion

gastrique (à pH 5 et faible concentration de pepsine). Cela a également été démontré pour des PCs monomère et oligomères purifiées ainsi que pour un flavonol, la quercétine (Asprogenidi, 2015). Lorsque le pH décroît au cours de la digestion, le niveau d'oxydation des lipides est naturellement réduit tandis que la capacité antioxydante des matrices purée et extrait phénolique et de l'épicatéchine se maintient largement. Des résultats contradictoires ont été obtenus avec le fruit frais, ce dernier peu antioxydant à pH 3 et en présence de pepsine dans le modèle de digestion gastrique s'est montré tout aussi antioxydant que la purée et l'extrait phénolique lors de la phase gastrique à pH 3 du modèle *in vitro* gastro-intestinal. De plus, dans ce modèle de digestion, la supplémentation en polyphénols était aussi bien capable de réduire l'apparition de 4-HNE en fin de phase gastrique qu'en fin de phase intestinale limitant potentiellement la quantité de 4-HNE absorbable.

L'interprétation des mécanismes antioxydants des PCs est complexe. Ces mécanismes apparaissent être dépendants de la bioaccessibilité des composés phénoliques impliquant leurs libérations des vacuoles des cellules végétales, des interactions avec les protéines ou les polysaccharides présents dans la paroi végétale cellulaire (Renard et al., 2017), des activités pepsique et lipasique elles-mêmes dépendantes du pH, et de la forme du pro-oxydant également dépendante du pH (Asprogenidi, 2015; Lorrain et al., 2010) et de l'activité pepsique.

Les effets bénéfiques des polyphénols de pomme observés lors de la digestion *in vitro* ont été confirmés *in vivo*, à travers la réduction de la concentration en 4-HNE dans les fèces des souris dans les groupes supplémentés par les matrices purée et extrait phénolique.

En présence des polyphénols, nous n'avons pas observé de modification de la prise de poids, de la répartition des tissus adipeux ou du profil lipidique plasmatique indiquant une absence d'effet de la supplémentation en polyphénols sur l'absorption des lipides. Il a été démontré par ailleurs que les PCs présentant des degrés de polymérisation élevés étaient capables de réduire l'absorption des lipides, et donc la prise de poids, probablement par inhibition de l'activité de la lipase intestinale et préservation de l'intégrité de la barrière intestinale (Masumoto et al., 2016).

L'effet bénéfique antioxydant durant le processus de digestion observé *in vivo* était associé à une prévention de l'augmentation du taux de LDLox et de 4-HNE plasmatique.

La métabolisation des polyphénols natifs lors de la digestion colique ainsi que les modifications par le métabolisme de la phase II après absorption conduisent à la présence dans la circulation de métabolites structurellement très différents des molécules natives. Par ailleurs,

ils sont retrouvés en très faible concentration au niveau plasmatique, ne dépassant généralement pas l'ordre du  $\mu\text{M}$  et ne présentent souvent pas d'activité antioxydante directe (Manach et al., 2004). D'autres mécanismes que ceux impliqués lors de la digestion peuvent être envisagés *in situ* pour ces métabolites pour l'atténuation de la dysfonction endothéliale et la réduction du développement des plaques d'athérome. Ainsi, dans notre étude à long terme, une diminution de la production d'ERO ainsi qu'une augmentation de l'activité de la eNOS (phosphorylation sur la sérine 1177) ont été observés qui pourraient augmenter la biodisponibilité du NO, permettant de préserver la fonction endothéliale. Ces bénéfices étaient également associés à une prévention de l'augmentation de la pression artérielle, de la vasorelaxation maximale aortique ainsi que du développement des plaques d'athérome. Les effets bénéfiques non antioxydants directs des métabolites notamment de l'épicatéchine et de la quercétine sur la fonction vasculaire sont également largement décrits dans la littérature : ils joueraient un rôle de potentialisateur de NO (Corti et al., 2009; Galindo et al., 2012; Oak et al., 2018), de réducteur de l'inflammation (Andre et al., 2012; Ishisaka et al., 2013), du stress oxydant (NADPH oxydase (Steffen et al., 2008) et de l'internalisation des LDLox dans les macrophages réduisant ainsi la formation des cellules spumeuses (Kawai et al., 2008). Les différents mécanismes d'action antioxydants directe lors de la digestion ou cellulaires après absorption intestinale ne peuvent être dissociés pour expliquer les effets bénéfiques des polyphénols sur la fonction vasculaire après une supplémentation en pomme.

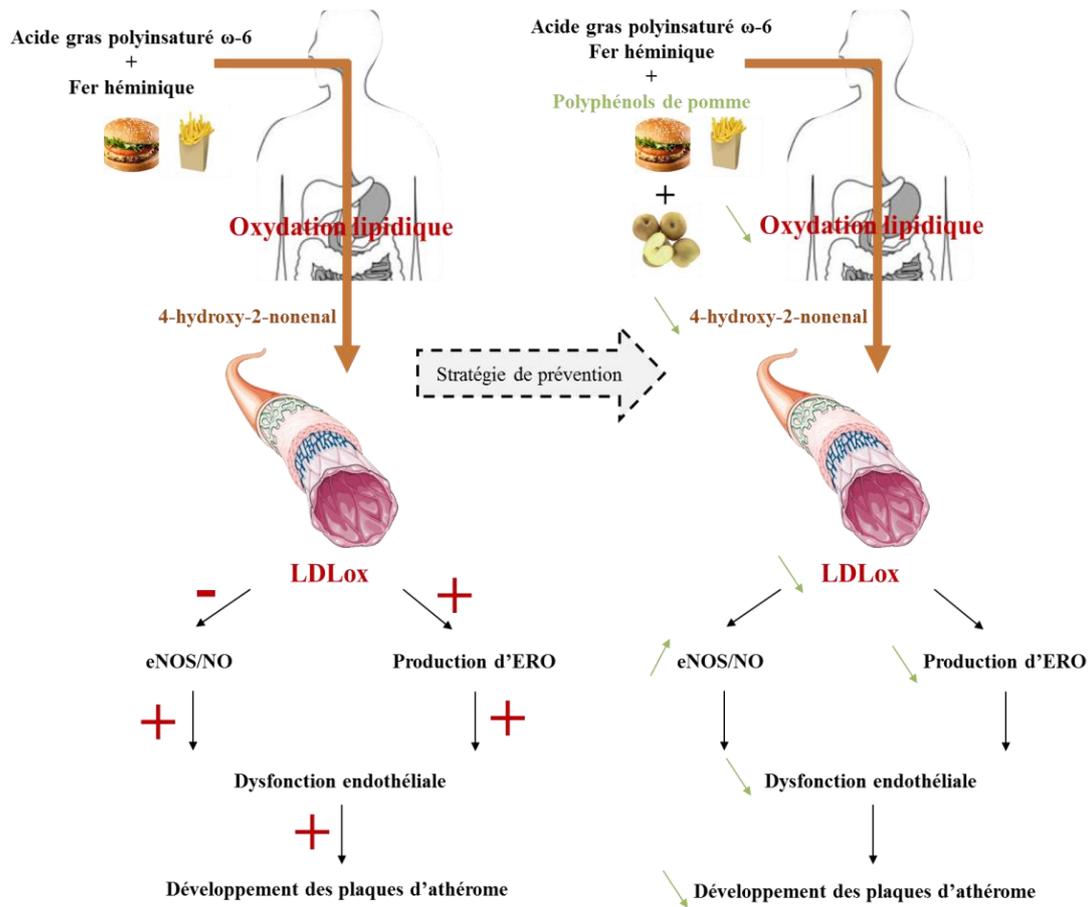
En résumé, il apparaît que la co-ingestion de fruits et légumes riches en antioxydants est une stratégie efficace afin de prévenir l'apparition ou l'aggravation de facteurs de risque cardiovasculaire liés à l'oxydation des lipides polyinsaturés au cours de la digestion. Nos résultats, obtenus pour des doses nutritionnelles de polyphénols, permettent de justifier une réintroduction des fruits riches en PCs (pommes, poires, baies, etc.) dans un régime de type occidental afin de préserver la fonction vasculaire. Cependant, les modalités de consommation doivent être mieux déterminées (avant, pendant ou après les lipides et le fer héminique) afin d'obtenir un effet optimal.



# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## Conclusion

L'ensemble de ces travaux de thèse ont permis de mieux comprendre les mécanismes et les interactions impliqués dans l'initiation de l'oxydation lipidique et l'accumulation de 4-HNE libre au cours du processus de digestion gastro-intestinale pour un repas de type occidental riche en lipides polyinsaturés n-6 et en fer héminique. Après absorption au niveau intestinal, les produits d'oxydation lipidique comme le 4-HNE entraînent une modification des LDL formant les LDLox qui sont associés à l'apparition d'une dysfonction endothéliale et à long terme au développement des plaques d'athérome. De plus, la stratégie de prévention primaire par supplémentation en pomme riche en PCs s'est avérée efficace pour réduire le taux d'oxydation lipidique et la formation de 4-HNE au cours de la digestion. La bioaccessibilité des composés phénoliques lors de la digestion apparaît être un facteur primordial. Ainsi, nous avons montré que les composés phénoliques sont plus bioaccessibles après un traitement thermique de la pomme et que la purée de pomme présente généralement une meilleure capacité antioxydante que le fruit frais. Chez la souris ApoE<sup>-/-</sup> soumise à 12 semaines de régime, la réduction de la formation de 4-HNE observée dans les groupes supplémentés en purée et extrait phénolique était associée à une baisse du taux de LDLox et à une prévention de la dysfonction endothéliale et du développement des plaques d'athérome (Figure 49). Ainsi, nos résultats ont montré le rôle central de la fonction endothéliale dans l'apparition du processus pathologique ischémique ainsi que l'intérêt d'une réintroduction de fruits riches en PCs dans une alimentation de type occidental afin de protéger la fonction vasculaire.



**Figure 49 :** Pathologies vasculaires induites par la consommation chronique d'un régime occidental et protection par la supplémentation en polyphénols de pomme.

## Perspectives

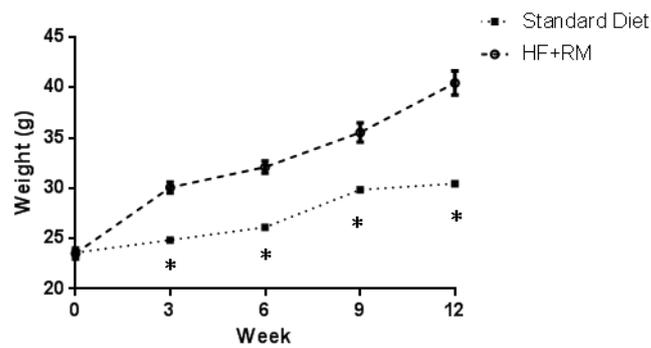
Les effets bénéfiques pour la santé cardiovasculaire ont été obtenus avec un produit végétal largement consommé, la purée de pomme, et un extrait hydroacétonique non purifié de polyphénols contenant majoritairement des glucides mais aussi d'autres substances hydrosolubles. Afin de valider un effet bénéfique des PCs constituant 80% des polyphénols de la pomme, il conviendrait de conduire une étude animale similaire avec un extrait purifié. De plus, une différenciation entre PCs monomériques directement absorbables au niveau intestinal et PCs oligomériques largement métabolisées dans le côlon pourrait permettre de préciser le bénéfice relatif de ces deux groupes pour lesquels il existe des études généralement séparées.

De nombreuses études cliniques ont déjà été consacrées à évaluer l'effet bénéfique des polyphénols (ex : cacao ou flavanones d'orange) sur la fonction endothéliale. Cependant, la plupart des études ont été réalisées sur des individus sains ou en aigu ne mettant donc que rarement en évidence un effet bénéfique dans ce type de population mais plutôt un maintien de la bonne santé vasculaire. La réalisation d'un protocole clinique chronique par une supplémentation riche en PCs chez des individus présentant des facteurs de risque cardiovasculaires (hypertension, obésité ou syndrome métabolique) permettrait de valider chez l'humain les données acquises en modèle animal et de développer de nouvelles stratégies préventives naturelles de la fonction vasculaire.

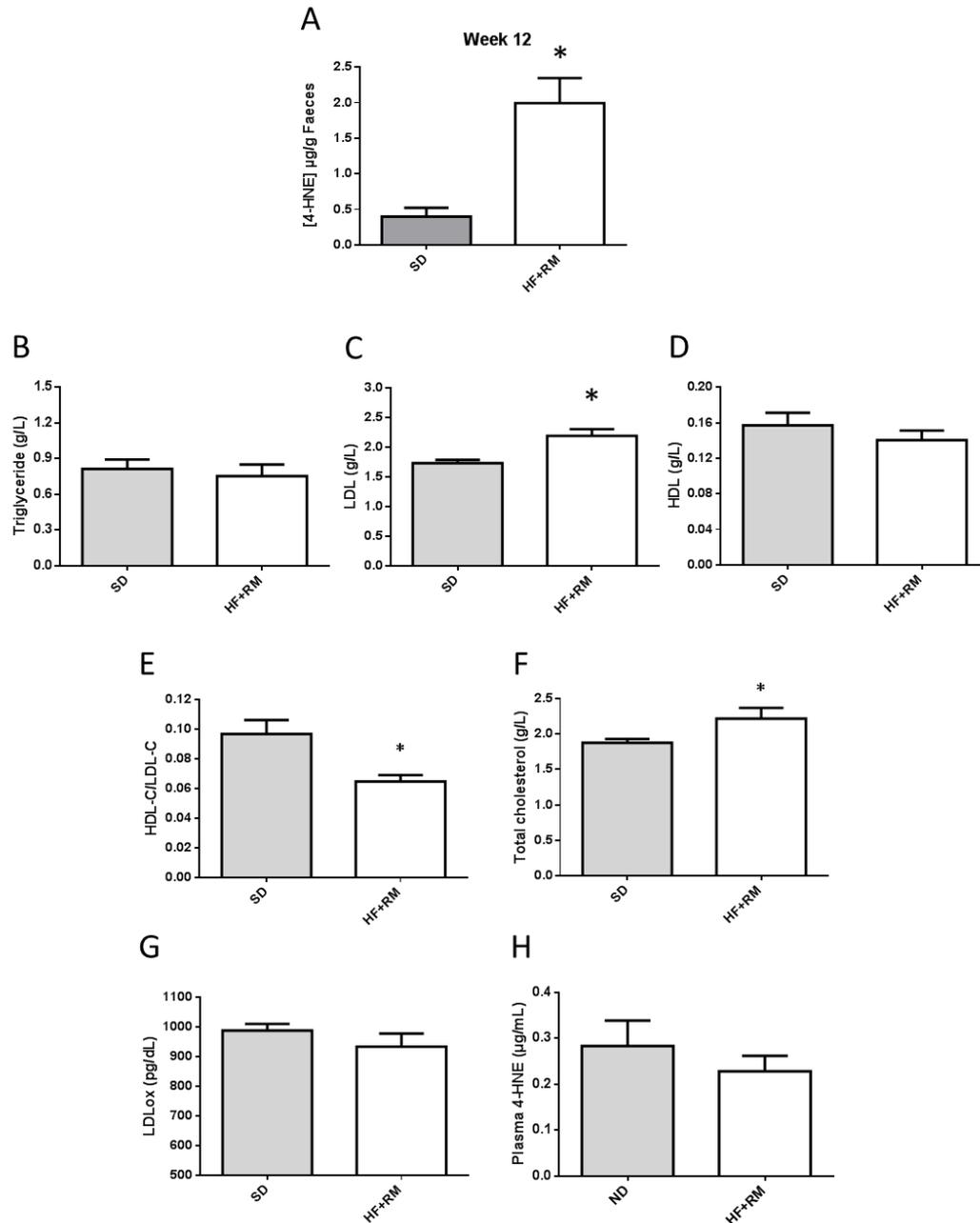


# **ANNEXES**

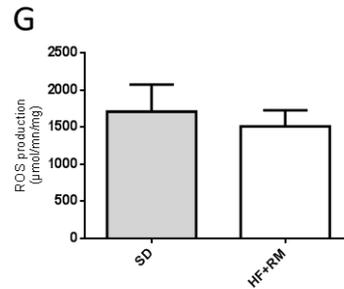
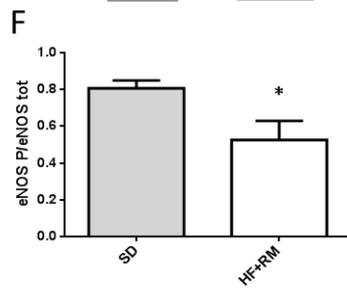
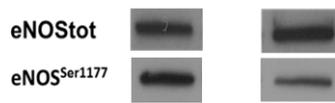
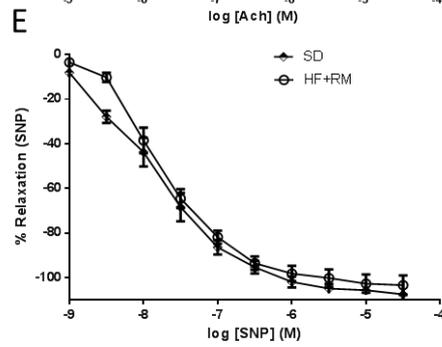
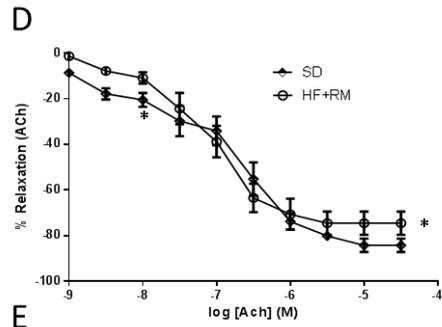
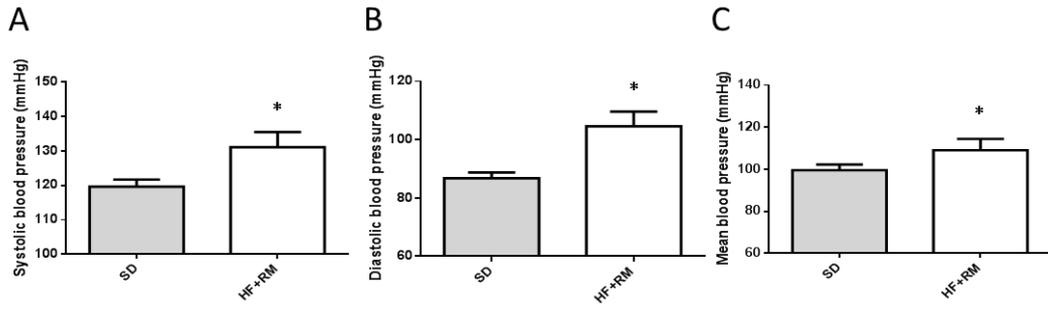
Lors de l'étude numéro 3, nous avons également inclus en plus de nos différents régimes nutritionnels, un groupe de souris ApoE<sup>-/-</sup> nourri avec un régime de maintenance (rongeur, SAFE A04, Standard Diet, SD) afin notamment d'évaluer l'impact du régime riche en lipides saturés (HF+RM). Ces souris ont été hébergées dans les mêmes conditions que les autres groupes et sacrifiées à l'âge de 20 semaines



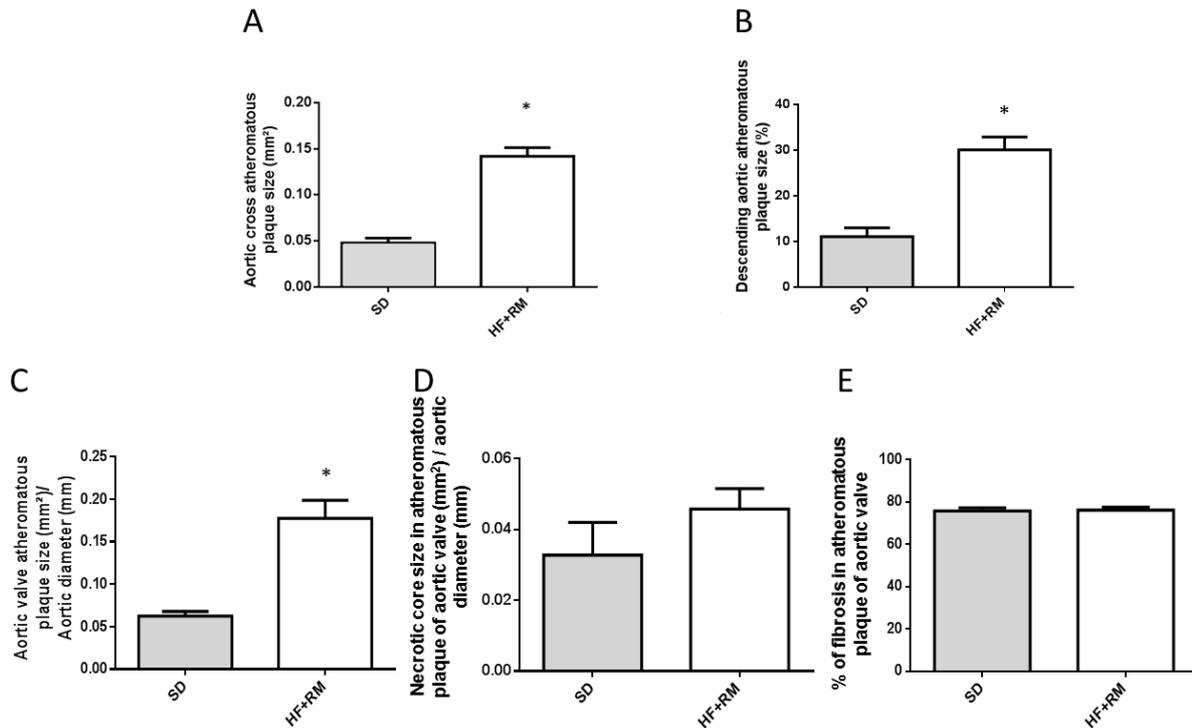
**Figure 50.** Effects of Standard vs. High Fat diet (HF+RM) diet on weight gain. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 20 for weight). \*P<0.05 vs. HF+RM.



**Figure 51.** Effects of Standard vs. High Fat diet (HF+RM) on 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) formation during gastro-intestinal digestion and plasma lipids and lipoproteins. 4-HNE concentration in faeces at 12 weeks (A) of diet measured by LC/MS/APCI. Plasma triglyceride (B), LDL-cholesterol (C), HDL-cholesterol (D), HDL-cholesterol/LDL-cholesterol (E) and total cholesterol (F) were assessed at the end of the dietary protocols. Plasma oxLDL (G) and 4-HNE (H) concentrations were assessed at the end of the 12 weeks of diet. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (Faeces  $n = 4/\text{grp}$ ,  $n = 8$  for LDL-c, HDL-c, HDL-c/LDL-C and total cholesterol, oxLDL  $n = 7/\text{grp}$ , Plasma 4-HNE  $n = 6/\text{grp}$ ). Values are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs. HF+RM.



**Figure 52.** Effects of Standard *vs.* High Fat diet (HF+RM) on vascular function and potential molecular mechanisms involved in endothelial dysfunction. Systolic (A), diastolic (B) and mean (C) blood pressures measured at the end of dietary protocol by tail cuff method. (D) Dose-dependent response to cumulative dose of acetylcholine (ACh) on aortic rings. (E) Dose-dependent response to cumulative dose of sodium nitroprusside (SNP) on aortic rings. Data are expressed in percent relaxation relative to maximal contraction obtained with 1  $\mu$ M of phényléphrine (PE). eNOS phosphorylation at Ser 1177 (eNOS<sup>Ser1177</sup>, F) were measured in aortic tissue homogenate by Western immunoblotting. Total ROS production measured by electron paramagnetic resonance in aortic tissue homogenate (G). Values are expressed as means  $\pm$  SEM (blood pressure n = 12/grp, vasoreactivity n = 8/grp, eNOS phosphorylation n = 3/grp, ROS production n = 4/grp). \*P<0.05 *vs.* HF+RM.



**Figure 53.** Development and characterization of atheromatous plaque size induced by the High Fat diet (HF+RM) vs. Standard diet. (A) Evaluation of aortic cross atheromatous plaque size performed by echography. (B) Atheromatous plaque size in descending aorta assessed by Oil-Red-O coloration. (C) Atheromatous plaque size in aortic valve relative to aortic diameter, (D) necrotic core size in atheromatous plaque of aortic valve relative to aortic diameter and (E) % of fibrosis in atheromatous plaque of aortic valve assessed on histological sections. All measurements were performed at the end of dietary protocol. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (Oil-Red-O coloration  $n = 7/\text{grp}$ , histological sections  $n = 5$  mice/ $\text{grp}$ ). \* $P < 0.05$  vs. HF+RM.



# **BIBLIOGRAPHIE**

Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271, 518-520.

Ait-Oufella, H., Salomon, B.L., Potteaux, S., Robertson, A.K., Gourdy, P., Zoll, J., Merval, R., Esposito, B., Cohen, J.L., Fisson, S., *et al.* (2006). Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 12, 178-180.

Alderton, W.K., Cooper, C.E., and Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593-615.

Alminger, M., Aura, A.M., Bohn, T., Dufour, C., El, S.N., Gomes, A., Karakaya, S., Martinez-Cuesta, M.C., McDougall, G.J., Requena, T., *et al.* (2014). In Vitro Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility. *Compr Rev Food Sci F* 13, 413-436.

Andersen, O.M.a.M., K.R. (2006). Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC press ISBN 978-0-8493-2021-7.

Andre, C.M., Greenwood, J.M., Walker, E.G., Rassam, M., Sullivan, M., Evers, D., Perry, N.B., and Laing, W.A. (2012). Anti-inflammatory procyanidins and triterpenes in 109 apple varieties. *J Agric Food Chem* 60, 10546-10554.

Aprikian, O., Busserolles, J., Manach, C., Mazur, A., Morand, C., Davicco, M.J., Besson, C., Rayssiguier, Y., Remesy, C., and Demigne, C. (2002). Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats. *J Nutr* 132, 1969-1976.

Araujo, F.B., Barbosa, D.S., Hsin, C.Y., Maranhao, R.C., and Abdalla, D.S. (1995). Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 117, 61-71.

Armand, M., Borel, P., Dubois, C., Senft, M., Peyrot, J., Salducci, J., Lafont, H., and Lairon, D. (1994). Characterization of Emulsions and Lipolysis of Dietary Lipids in the Human Stomach. *Am J Physiol* 266, G372-G381.

Armand, M., Borel, P., Pasquier, B., Dubois, C., Senft, M., Andre, M., Peyrot, J., Salducci, J., and Lairon, D. (1996). Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *Am J Physiol* 271, G172-183.

Armand, M., Hamosh, M., Philpott, J.R., Resnik, A.K., Rosenstein, B.J., Hamosh, A., Perman, J.A., and Hamosh, P. (2004). Gastric function in children with cystic fibrosis: effect of diet on gastric lipase levels and fat digestion. *Pediatr Res* 55, 457-465.

Armand, M., Pasquier, B., Andre, M., Borel, P., Senft, M., Peyrot, J., Salducci, J., Portugal, H., Jaussan, V., and Lairon, D. (1999). Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *Am J Clin Nutr* 70, 1096-1106.

Arranz, S., Manuel Silvan, J., and Saura-Calixto, F. (2010). Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: A study on the Spanish diet. *Molecular Nutrition & Food Research* 54, 1646-1658.

Arts, I.C., and Hollman, P.C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81, 317S-325S.

Asprogenidi, K. (2015). Protection of lipids from oxidation by dietary polyphenols in gastric-like conditions (Université d'Avignon et des pays du Vaucluse).

Auge, N., Garcia, V., Maupas-Schwalm, F., Levade, T., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (2002). Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways. *Arterioscl Throm Vas* 22, 1990-1995.

Aune, D., Giovannucci, E., Boffetta, P., Fadnes, L.T., Keum, N., Norat, T., Greenwood, D.C., Riboli, E., Vatten, L.J., and Tonstad, S. (2017). Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality-a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Int J Epidemiol* 46, 1029-1056.

Aura, A.M., Martin-Lopez, P., O'Leary, K.A., Williamson, G., Oksman-Caldentey, K.M., Poutanen, K., and Santos-Buelga, C. (2005). In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur J Nutr* 44, 133-142.

Aviram, M., and Brook, J.G. (1983). Characterization of the effect of plasma lipoproteins on platelet function in vitro. *Haemostasis* 13, 344-350.

Aviram, M., and Rosenblat, M. (2004). Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 37, 1304-1316.

~ B ~

Balligand, J.L., Kobzik, L., Han, X., Kaye, D.M., Belhassen, L., O'Hara, D.S., Kelly, R.A., Smith, T.W., and Michel, T. (1995). Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 270, 14582-14586.

Baron, C.P., and Andersen, H.J. (2002). Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *J Agric Food Chem* 50, 3887-3897.

Basu, T.K., and Donaldson, D. (2003). Intestinal absorption in health and disease: micronutrients. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17, 957-979.

Battault, S., Singh, F., Gayrard, S., Zoll, J., Reboul, C., and Meyer, G. (2016). Endothelial function does not improve with high-intensity continuous exercise training in SHR: implications of eNOS uncoupling. *Hypertens Res* 39, 70-78.

Bechaux, J., de La Pomelie, D., Theron, L., Sante-Lhoutellier, V., and Gatellier, P. (2018). Iron-catalysed chemistry in the gastrointestinal tract: Mechanisms, kinetics and consequences. A review. *Food Chemistry* 268, 27-39.

Benjamin, N., Dutton, J.A., and Ritter, J.M. (1991). Human vascular smooth muscle cells inhibit platelet aggregation when incubated with glyceryl trinitrate: evidence for generation of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 102, 847-850.

Berliner, J.A., and Heinecke, J.W. (1996). The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 20, 707-727.

Berry, C.E., and Hare, J.M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 555, 589-606.

- Berthier, A., Lemaire-Ewing, S., Prunet, C., Monier, S., Athias, A., Bessede, G., Pais de Barros, J.P., Laubriet, A., Gambert, P., Lizard, G., *et al.* (2004). Involvement of a calcium-dependent dephosphorylation of BAD associated with the localization of Trpc-1 within lipid rafts in 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis. *Cell Death Differ* *11*, 897-905.
- Blankenberg, S., Rupprecht, H.J., Bickel, C., Torzewski, M., Hafner, G., Tiret, L., Smieja, M., Cambien, F., Meyer, J., and Lackner, K.J. (2003). Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* *349*, 1605-1613.
- Bolea, G., Ginies, C., Vallier, M.J., and Dufour, C. (2019). Lipid protection by polyphenol-rich apple matrices is modulated by pH and pepsin in in vitro gastric digestion *Food and Function* *submitted*.
- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., and Cohen, R.A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* *368*, 850-853.
- Bondonno, C.P., Yang, X.B., Croft, K.D., Considine, M.J., Ward, N.C., Rich, L., Puddey, I.B., Swinny, E., Mubarak, A., and Hodgson, J.M. (2012). Flavonoid-rich apples and nitrate-rich spinach augment nitric oxide status and improve endothelial function in healthy men and women: a randomized controlled trial. *Free Radical Biology and Medicine* *52*, 95-102.
- Bonetti, P.O., Lerman, L.O., and Lerman, A. (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *23*, 168-175.
- Bonita, J.S., Mandarano, M., Shuta, D., and Vinson, J. (2007). Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacol Res* *55*, 187-198.
- Bordeaux, B., Yanek, L.R., Moy, T.F., White, L.W., Becker, L.C., Faraday, N., and Becker, D.M. (2007). Casual chocolate consumption and inhibition of platelet function. *Prev Cardiol* *10*, 175-180.
- Bouayed, J., Deusser, H., Hoffmann, L., and Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry* *131*, 1466-1472.
- Boveris, A., and Cadenas, E. (1975). Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* *54*, 311-314.
- Brandes, R.P., and Schroder, K. (2008). Differential vascular functions of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Lipidol* *19*, 513-518.
- Brat, P., George, S., Bellamy, A., Du Chaffaut, L., Scalbert, A., Mennen, L., Arnault, N., and Amiot, M.J. (2006). Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *Journal of Nutrition* *136*, 2368-2373.
- Brown, A.J., and Jessup, W. (1999). Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* *142*, 1-28.
- Buhman, K.F., Accad, M., and Farese, R.V. (2000). Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. *Biochim Biophys Acta* *1529*, 142-154.
- Buhman, K.K., Smith, S.J., Stone, S.J., Repa, J.J., Wong, J.S., Knapp, F.F., Jr., Burri, B.J., Hamilton, R.L., Abumrad, N.A., and Farese, R.V., Jr. (2002). DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis. *J Biol Chem* *277*, 25474-25479.

- Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Suarez, Y., Lasuncion, M.A., and Vega, M.A. (1998). Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res* 39, 777-788.
- Camejo, G., Fager, G., Rosengren, B., Hurt-Camejo, E., and Bondjers, G. (1993). Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 268, 14131-14137.
- Campbell, J.H., and Campbell, G.R. (1994). The role of smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 5, 323-330.
- Carey, M.C., Small, D.M., and Bliss, C.M. (1983). Lipid digestion and absorption. *Annu Rev Physiol* 45, 651-677.
- Carlsen, C.U., and Skibsted, L.H. (2004). Myoglobin species with enhanced prooxidative activity is formed during mild proteolysis by pepsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 1675-1681.
- Carn, F., Guyot, S., Baron, A., Perez, J., Buhler, E., and Zanchi, D. (2012). Structural Properties of Colloidal Complexes between Condensed Tannins and Polysaccharide Hyaluronan. *Biomacromolecules* 13, 751-759.
- Carriere, F., Barrowman, J.A., Verger, R., and Laugier, R. (1993). Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology* 105, 876-888.
- Ceymann, M., Arrigoni, E., Scharer, H., Nising, A.B., and Hurrell, R.F. (2012). Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *Journal of Food Composition and Analysis* 26, 128-135.
- Channon, K.M. (2004). Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 14, 323-327.
- Chapple, S.J., Cheng, X., and Mann, G.E. (2013). Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox Biol* 1, 319-331.
- Chen, M., Yang, Y., Braunstein, E., Georgeson, K.E., and Harmon, C.M. (2001). Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E916-923.
- Cheng, F., Torzewski, M., Degreif, A., Rossmann, H., Canisius, A., and Lackner, K.J. (2013). Impact of glutathione peroxidase-1 deficiency on macrophage foam cell formation and proliferation: implications for atherogenesis. *Plos One* 8, e72063.
- Cheng, Z.Y., and Li, Y.Z. (2007). What is responsible for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: An update. *Chem Rev* 107, 748-766.
- Chiu, J.J., and Chien, S. (2011). Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* 91, 327-387.
- Claude, S., Bobby, C., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Gerard, N., Morand, C., and Milenkovic, D. (2014). Flavanol metabolites reduce monocyte adhesion to endothelial cells through modulation of expression of genes via p38-MAPK and p65-Nf-kB pathways. *Molecular Nutrition & Food Research* 58, 1016-1027.

Clifford, M.a.B., J.E. (2006). Flavonoids : chemistry, biochemistry and applications. ed O Anderson and K Markham, CRC Press, BOca Raton, 319-370.

Cornwell, T.L., Pryzwansky, K.B., Wyatt, T.A., and Lincoln, T.M. (1991). Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 40, 923-931.

Corti, R., Flammer, A.J., Hollenberg, N.K., and Luscher, T.F. (2009). Cocoa and cardiovascular health. *Circulation* 119, 1433-1441.

Crabtree, M.J., Smith, C.L., Lam, G., Goligorsky, M.S., and Gross, S.S. (2008). Ratio of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin to 7,8-dihydrobiopterin in endothelial cells determines glucose-elicited changes in NO vs. superoxide production by eNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H1530-1540.

Crozier, A., Jaganath, I.B., and Clifford, M.N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 26, 1001-1043.

Cushing, S.D., and Fogelman, A.M. (1990). Monocytes May Amplify Their Recruitment into Inflammatory Lesions by Inducing Monocyte Chemotactic Protein (Mcp-1). *Arteriosclerosis* 10, A820-A820.

~ D ~

Dai, J., and Mumper, R.J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15, 7313-7352.

Dangles, O. (2012). Antioxidant Activity of Plant Phenols: Chemical Mechanisms and Biological Significance. *Curr Org Chem* 16, 692-714.

Dangles, O., and Dufour, C. (2008). Flavonoid-Protein Binding Processes and their Potential Impact on Human Health. *Recent Advances in Polyphenol Research, Vol 1* 1, 67-87.

Dauchet, L., Amouyel, P., Hercberg, S., and Dallongeville, J. (2006). Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. *J Nutr* 136, 2588-2593.

Daugherty, A., Cornicelli, J.A., Welch, K., Sendobry, S.M., and Rateri, D.L. (1997). Scavenger receptors are present on rabbit aortic endothelial cells in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2369-2375.

Dawson, J., and Walters, M. (2006). Uric acid and xanthine oxidase: future therapeutic targets in the prevention of cardiovascular disease? *Br J Clin Pharmacol* 62, 633-644.

Dawson, P.A., and Rudel, L.L. (1999). Intestinal cholesterol absorption. *Curr Opin Lipidol* 10, 315-320.

Day, A.J., Canada, F.J., Diaz, J.C., Kroon, P.A., McLauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R., and Williamson, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 468, 166-170.

de Freitas, V., and Mateus, N. (2001). Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J Agric Food Chem* 49, 940-945.

de Freitas, V., and Mateus, N. (2002). Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates. *J Sci Food Agr* 82, 113-119.

- de Freitas, V., and Mateus, N. (2012). Protein/Polyphenol Interactions: Past and Present Contributions. Mechanisms of Astringency Perception. *Curr Org Chem* 16, 724-746.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P., Tognolini, M., Borges, G., and Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* 18, 1818-1892.
- Delattre, J.B., J.L.; Bonnefont-Rosselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Paris Editions Tec & Doc / Editions medicale internationale.
- Delosiere, M., Sante-Lhoutellier, V., Chantelauze, C., Durand, D., Thomas, A., Joly, C., Pujos-Guillot, E., Remond, D., Comte, B., Gladine, C., *et al.* (2016). Quantification of 4-hydroxy-2-nonenal-protein adducts in the in vivo gastric digesta of mini-pigs using a GC-MS/MS method with accuracy profile validation. *Food & Function* 7, 3497-3504.
- Demer, L.L., and Tintut, Y. (2008). Vascular calcification - Pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 117, 2938-2948.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605.
- Dufour, C., and Dangles, O. (2005). Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1721, 164-173.
- Dufour, C., Loonis, M., and Dangles, O. (2007). Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin. *Free Radic Biol Med* 43, 241-252.
- Dufour, C., Loonis, M., Delosiere, M., Buffiere, C., Hafnaoui, N., Sante-Lhoutellier, V., and Remond, D. (2018). The matrix of fruit & vegetables modulates the gastrointestinal bioaccessibility of polyphenols and their impact on dietary protein digestibility. *Food Chem* 240, 314-322.
- Dupuy, A., Le Faouder, P., Vigor, C., Oger, C., Galano, J.M., Dray, C., Lee, J.C., Valet, P., Gladine, C., Durand, T., *et al.* (2016). Simultaneous quantitative profiling of 20 isoprostanoïds from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids by LC-MS/MS in various biological samples. *Anal Chim Acta* 921, 46-58.

~ E ~

- Ehrenkranz, J.R., Lewis, N.G., Kahn, C.R., and Roth, J. (2005). Phlorizin: a review. *Diabetes Metab Res Rev* 21, 31-38.
- El Gharras, H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *Int J Food Sci Tech* 44, 2512-2518.
- Eriksson, E.E., Werr, J., Thoren, P., and Lindbom, L. (2000). Leukocyte rolling in atherosclerosis in vivo is critically dependent on P-selectin. *Faseb Journal* 14, A288-A288.

~ F ~

- Farah, C., Kleindienst, A., Bolea, G., Meyer, G., Gayrard, S., Geny, B., Obert, P., Cazorla, O., Tanguy, S., and Reboul, C. (2013). Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic Research in Cardiology* 108.
- Fave, G., Coste, T.C., and Armand, M. (2004). Physicochemical properties of lipids: New strategies to manage fatty acid bioavailability. *Cell Mol Biol* 50, 815-831.
- Fernandes, I., de Freitas, V., Reis, C., and Mateus, N. (2012). A new approach on the gastric absorption of anthocyanins. *Food & Function* 3, 508-516.
- Feron, O., Dessy, C., Moniotte, S., Desager, J.P., and Balligand, J.L. (1999). Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 103, 897-905.
- Flammer, A.J., Anderson, T., Celermajer, D.S., Creager, M.A., Deanfield, J., Ganz, P., Hamburg, N.M., Luscher, T.F., Shechter, M., Taddei, S., *et al.* (2012). The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation* 126, 753-767.
- Forstermann, U., and Munzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113, 1708-1714.
- Forstermann, U., and Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33, 829-837, 837a-837d.
- Frank, J., Budek, A., Lundh, T., Parker, R.S., Swanson, J.E., Lourenco, C.F., Gago, B., Laranjinha, J., Vessby, B., and Kamal-Eldin, A. (2006). Dietary flavonoids with a catechol structure increase alpha-tocopherol in rats and protect the vitamin from oxidation in vitro. *J Lipid Res* 47, 2718-2725.
- Frankel, E.N. (1984). Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Prog Lipid Res* 23, 197-221.
- Frei, B. (1994). *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. Londres Academic Press.
- Fukai, T., and Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 15, 1583-1606.
- Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.

~ G ~

- Galindo, P., Rodriguez-Gomez, I., Gonzalez-Manzano, S., Duenas, M., Jimenez, R., Menendez, C., Vargas, F., Tamargo, J., Santos-Buelga, C., Perez-Vizcaino, F., *et al.* (2012). Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. *Plos One* 7, e32673.
- Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Lark, M.W., and Libby, P. (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94, 2493-2503.
- Galle, J., Hansen-Hagge, T., Wanner, C., and Seibold, S. (2006). Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis* 185, 219-226.

- Galleano, M., Verstraeten, S.V., Oteiza, P.I., and Fraga, C.G. (2010). Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Arch Biochem Biophys* 501, 23-30.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., and Fernandez-Gutierrez, A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules* 15, 8813-8826.
- Gareus, R., Kotsaki, E., Xanthoulea, S., van der Made, I., Gijbels, M.J.J., Kardakaris, R., Polykratis, A., Kollias, G., de Winther, M.P.J., and Pasparakis, M. (2008). Endothelial Cell-Specific NF-kappa B Inhibition Protects Mice from Atherosclerosis. *Cell Metabolism* 8, 372-383.
- Gargiulo, S., Testa, G., Gamba, P., Staurenghi, E., Poli, G., and Leonarduzzi, G. (2017). Oxysterols and 4-hydroxy-2-nonenal contribute to atherosclerotic plaque destabilization. *Free Radical Biology and Medicine* 111, 140-150.
- Gautier, T.M., D.; Lagrost, L. (2010). Métabolisme des lipides et des lipoprotéines chez l'homme. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Endocrinologie-Nutrition 10-368-A-10.
- Gee, J.M., DuPont, M.S., Day, A.J., Plumb, G.W., Williamson, G., and Johnson, I.T. (2000). Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 130, 2765-2771.
- Gibbons, G.H., and Dzau, V.J. (1994). The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 330, 1431-1438.
- Gillotte-Taylor, K., Boullier, A., Witztum, J.L., Steinberg, D., and Quehenberger, O. (2001). Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res* 42, 1474-1482.
- Gimbrone, M.A., Jr., Cybulsky, M.I., Kume, N., Collins, T., and Resnick, N. (1995). Vascular endothelium. An integrator of pathophysiological stimuli in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 748, 122-131; discussion 131-122.
- Gimbrone, M.A., Topper, J.N., Nagel, T., Anderson, K.R., and Garcia-Cardena, G. (2000). Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann Ny Acad Sci* 902, 230-240.
- Gobert, M., Remond, D., Loonis, M., Buffiere, C., Sante-Lhoutellier, V., and Dufour, C. (2014). Fruits, vegetables and their polyphenols protect dietary lipids from oxidation during gastric digestion. *Food Funct* 5, 2166-2174.
- Goetze, O., Steingoetter, A., Menne, D., van der Voort, I.R., Kwiatek, M.A., Boesiger, P., Weishaupt, D., Thumshirn, M., Fried, M., and Schwizer, W. (2007). The effect of macronutrients on gastric volume responses and gastric emptying in humans: a magnetic resonance imaging study. *Am J Physiol-Gastr L* 292, G11-G17.
- Goicoechea, E., and Guillen, M.D. (2010). Analysis of hydroperoxides, aldehydes and epoxides by 1H nuclear magnetic resonance in sunflower oil oxidized at 70 and 100 degrees C. *J Agric Food Chem* 58, 6234-6245.
- Goicoechea, E., Van Twillert, K., Duits, M., Brandon, E., Kootstra, P.R., Blokland, M.H., and Guillen, M.D. (2008). Use of an in vitro digestion model to study the bioaccessibility of 4-hydroxy-2-nonenal and related aldehydes present in oxidized oils rich in omega-6 acyl groups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 8475-8483.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1974). Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 249, 5153-5162.

Gonthier, M.P., Donovan, J.L., Texier, O., Felgines, C., Remesy, C., and Scalbert, A. (2003a). Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic Biol Med* 35, 837-844.

Gonthier, M.P., Verny, M.A., Besson, C., Remesy, C., and Scalbert, A. (2003b). Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr* 133, 1853-1859.

Goupy, P., Vulcain, E., Caris-Veyrat, C., and Dangles, O. (2007). Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: mechanism of action and synergism. *Free Radic Biol Med* 43, 933-946.

Grassi, D., Desideri, G., and Ferri, C. (2010). Blood pressure and cardiovascular risk: what about cocoa and chocolate? *Arch Biochem Biophys* 501, 112-115.

Grootveld, M., Atherton, M.D., Sheerin, A.N., Hawkes, J., Blake, D.R., Richens, T.E., Silwood, C.J., Lynch, E., and Claxson, A.W. (1998). In vivo absorption, metabolism, and urinary excretion of alpha,beta-unsaturated aldehydes in experimental animals. Relevance to the development of cardiovascular diseases by the dietary ingestion of thermally stressed polyunsaturate-rich culinary oils. *J Clin Invest* 101, 1210-1218.

Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., and Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol* 30, 591-600.

Guyot, S., Doco, T., Souquet, J.M., Moutounet, M., and Drilleau, J.F. (1997). Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var kermerrien) skin and pulp. *Phytochemistry* 44, 351-357.

Guyot, S., Le Bourvellec, C., Marnet, N., and Drilleau, J.F. (2002). Procyanidins are the most abundant polyphenols in dessert apples at maturity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 35, 289-291.

Guyot, S., Marnet, N., and Drilleau, J. (2001). Thiolytic-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states. *J Agric Food Chem* 49, 14-20.

~ H ~

Haikal, Z., Play, B., Landrier, J.F., Giraud, A., Ghiringhelli, O., Lairon, D., and Jourdeuil-Rahmani, D. (2008). NPC1L1 and SR-BI are involved in intestinal cholesterol absorption from small-size lipid donors. *Lipids* 43, 401-408.

Halliwell, B. (2007). Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc Res* 73, 341-347.

Halliwell, B., Zhao, K., and Whiteman, M. (2000). The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radic Res* 33, 819-830.

Hamilton, R.J., Kalu, C., Prisk, E., Padley, F.B., and Pierce, H. (1997). Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chemistry* 60, 193-199.

Hamosh, M. (1990). Lingual and gastric lipases. *Nutrition* 6, 421-428.

- Hamosh, M., Bitman, J., Liao, T.H., Mehta, N.R., Buczek, R.J., Wood, D.L., Grylack, L.J., and Hamosh, P. (1989). Gastric lipolysis and fat absorption in preterm infants: effect of medium-chain triglyceride or long-chain triglyceride-containing formulas. *Pediatrics* 83, 86-92.
- Hansson, G.K., and Hermansson, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 12, 204-212.
- Hansson, G.K., Robertson, A.K.L., and Soderberg-Naucler, C. (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol-Mech* 1, 297-329.
- He, F.J., Nowson, C.A., and MacGregor, G.A. (2006). Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies. *Lancet* 367, 320-326.
- Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M., and Kihara, Y. (2009). Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73, 411-418.
- Hollman, P.C., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., Serafini, M., Scalbert, A., Sies, H., and Vidry, S. (2011). The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr* 141, 989S-1009S.
- Hooper, L., Kay, C., Abdelhamid, A., Kroon, P.A., Cohn, J.S., Rimm, E.B., and Cassidy, A. (2012). Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Clin Nutr* 95, 740-751.
- Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., Ryder, J.J., Hall, W.L., and Cassidy, A. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 88, 38-50.
- Horowitz, A., Menice, C.B., Laporte, R., and Morgan, K.G. (1996). Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 76, 967-1003.
- Hyson, D.A. (2011). A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. *Adv Nutr* 2, 408-420.

~ I ~

- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9265-9269.
- Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A., and Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34, 879-886.
- Ignat, I., Volf, I., and Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem* 126, 1821-1835.
- Innerarity, T.L., and Mahley, R.W. (1978). Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochemistry* 17, 1440-1447.
- Inoue, K., Arai, Y., Kurihara, H., Kita, T., and Sawamura, T. (2005). Overexpression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 induces intramyocardial vasculopathy in apolipoprotein E-null mice. *Circ Res* 97, 176-184.

Ishigaki, Y., Katagiri, H., Gao, J., Yamada, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Kaneko, K., Ogihara, T., Ishihara, H., *et al.* (2008). Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation* 118, 75-83.

Ishii, T., Mori, T., Tanaka, T., Mizuno, D., Yamaji, R., Kumazawa, S., Nakayama, T., and Akagawa, M. (2008). Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate through autoxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 45, 1384-1394.

Ishisaka, A., Kawabata, K., Miki, S., Shiba, Y., Minekawa, S., Nishikawa, T., Mukai, R., Terao, J., and Kawai, Y. (2013). Mitochondrial dysfunction leads to deconjugation of quercetin glucuronides in inflammatory macrophages. *Plos One* 8, e80843.

~ J ~

Jacobsen, C., Hartvigsen, K., Lund, P., Thomsen, M.K., Skibsted, L.H., Adler-Nissen, J., Holmer, G., and Meyer, A.S. (2000). Oxidation in fish oil-enriched mayonnaise 3. Assessment of the influence of the emulsion structure on oxidation by discriminant partial least squares regression analysis. *Eur Food Res Technol* 211, 86-98.

Jahn, U., Galano, J.M., and Durand, T. (2008). Beyond prostaglandins--chemistry and biology of cyclic oxygenated metabolites formed by free-radical pathways from polyunsaturated fatty acids. *Angew Chem Int Ed Engl* 47, 5894-5955.

James, M.N., and Sielecki, A.R. (1986). Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution. *Nature* 319, 33-38.

Jin, Z., Berthiaume, J.M., Li, Q., Henry, F., Huang, Z., Sadhukhan, S., Gao, P., Tochtrop, G.P., Puchowicz, M.A., and Zhang, G.F. (2014). Catabolism of (2E)-4-hydroxy-2-nonenal via omega- and omega-1-oxidation stimulated by ketogenic diet. *J Biol Chem* 289, 32327-32338.

~ K ~

Kanner, J. (2007). Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health. *Mol Nutr Food Res* 51, 1094-1101.

Kanner, J., and Lapidot, T. (2001). The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 31, 1388-1395.

Kaplan, M., and Aviram, M. (2001). Retention of oxidized LDL by extracellular matrix proteoglycans leads to its uptake by macrophages: an alternative approach to study lipoproteins cellular uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 386-393.

Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Crit Rev Food Sci* 44, 453-464.

Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Moriwaki, H., Murase, T., Sawamura, T., Masaki, T., Hashimoto, N., and Kita, T. (1999). Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation* 99, 3110-3117.

- Katsuda, S., Boyd, H.C., Fligner, C., Ross, R., and Gown, A.M. (1992). Human Atherosclerosis .3. Immunocytochemical Analysis of the Cell Composition of Lesions of Young-Adults. *American Journal of Pathology* *140*, 907-914.
- Kawai, Y., Nishikawa, T., Shiba, Y., Saito, S., Murota, K., Shibata, N., Kobayashi, M., Kanayama, M., Uchida, K., and Terao, J. (2008). Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem* *283*, 9424-9434.
- Kay, C.D., Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., and Cassidy, A. (2012). Relative impact of flavonoid composition, dose and structure on vascular function: a systematic review of randomised controlled trials of flavonoid-rich food products. *Mol Nutr Food Res* *56*, 1605-1616.
- Keller, J., Baradat, M., Jouanin, I., Debrauwer, L., and Gueraud, F. (2015). "Twin peaks": Searching for 4-hydroxynonenal urinary metabolites after oral administration in rats. *Redox Biology* *4*, 136-148.
- Kenmogne-Domguia, H.B., Moisan, S., Viau, M., Genot, C., and Meynier, A. (2014). The initial characteristics of marine oil emulsions and the composition of the media inflect lipid oxidation during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* *152*, 146-154.
- Khalil, M.F., Wagner, W.D., and Goldberg, I.J. (2004). Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis. *Arterioscl Throm Vas* *24*, 2211-2218.
- Khawaja, O., Gaziano, J.M., and Djousse, L. (2011). Chocolate and coronary heart disease: a systematic review. *Curr Atheroscler Rep* *13*, 447-452.
- Kleinbongard, P., Schulz, R., Rassaf, T., Lauer, T., Dejam, A., Jax, T., Kumara, I., Gharini, P., Kabanova, S., Ozuyaman, B., *et al.* (2006). Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* *107*, 2943-2951.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., and Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* *76*, 560-568.
- Kobayashi, S., Maesato, K., Moriya, H., Ohtake, T., and Ikeda, T. (2005). Insulin resistance in patients with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* *45*, 275-280.
- Koutsos, A., Tuohy, K.M., and Lovegrove, J.A. (2015). Apples and cardiovascular health--is the gut microbiota a core consideration? *Nutrients* *7*, 3959-3998.
- Kubow, S. (1992). Routes of Formation and Toxic Consequences of Lipid Oxidation-Products in Foods. *Free Radical Biology and Medicine* *12*, 63-81.
- Kugiyama, K., Kerns, S.A., Morrisett, J.D., Roberts, R., and Henry, P.D. (1990). Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* *344*, 160-162.
- Kunjathoor, V.V., Febbraio, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff, H.F., and Freeman, M.W. (2002). Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* *277*, 49982-49988.
- Kwiatk, M.A., Menne, D., Steingoetter, A., Goetze, O., Forras-Kaufman, Z., Kaufman, E., Fruehauf, H., Boesiger, P., Fried, M., Schwizer, W., *et al.* (2009). Effect of meal volume and calorie load on postprandial gastric function and emptying: studies under physiological

conditions by combined fiber-optic pressure measurement and MRI. *Am J Physiol-Gastr L* 297, G894-G901.

~ L ~

Landmesser, U., Spiekermann, S., Preuss, C., Sorrentino, S., Fischer, D., Manes, C., Mueller, M., and Drexler, H. (2007). Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 943-948.

Lapidot, T., Granit, R., and Kanner, J. (2005). Lipid hydroperoxidase activity of myoglobin and phenolic antioxidants in simulated gastric fluid. *J Agric Food Chem* 53, 3391-3396.

Larsson, K., Tullberg, C., Alminger, M., Havenaar, R., and Undeland, I. (2016). Malondialdehyde and 4-hydroxy-2-hexenal are formed during dynamic gastrointestinal in vitro digestion of cod liver oils. *Food Funct* 7, 3458-3467.

Laurora, S., Tamagno, E., Briatore, F., Bardini, P., Pizzimenti, S., Toaldo, C., Reffo, P., Costelli, P., Dianzani, M.U., Danni, O., *et al.* (2005). 4-Hydroxynonenal modulation of p53 family gene expression in the SK-N-BE neuroblastoma cell line. *Free Radic Biol Med* 38, 215-225.

Le Bourvellec, C., Bagano Vilas Boas, P., Lepercq, P., Comtet-Marre, S., Auffret, P., Ruiz, P., Bott, R., Renard, C., Dufour, C., Chatel, J.M., *et al.* (2019). Procyanidin-Cell Wall Interactions within Apple Matrices Decrease the Metabolization of Procyanidins by the Human Gut Microbiota and the Anti-Inflammatory Effect of the Resulting Microbial Metabolome In Vitro. *Nutrients* 11.

Le Bourvellec, C., Bouchet, B., and Renard, C.M. (2005). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochim Biophys Acta* 1725, 10-18.

Le Bourvellec, C., Bouzerzour, K., Ginies, C., Regis, S., Ple, Y., and Renard, C.M.G.C. (2011). Phenolic and polysaccharidic composition of applesauce is close to that of apple flesh. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 537-547.

Le Bourvellec, C., and Renard, C.M.G.C. (2012). Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52, 213-248.

Lee, C.C., Kim, J.H., Kim, J.S., Oh, Y.S., Han, S.M., Park, J.H.Y., Lee, K.W., and Lee, C.Y. (2017). 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl-gamma-valerolactone), a major microbial metabolite of proanthocyanidin, attenuates THP-1 monocyte-endothelial adhesion. *Int J Mol Sci* 18.

Lee, R.T., and Libby, P. (1997). The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 1859-1867.

Lemaire, S., Lizard, G., Monier, S., Miguet, C., Gueldry, S., Volot, F., Gambert, P., and Neel, D. (1998). Different patterns of IL-1 $\beta$  secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. *FEBS Lett* 440, 434-439.

Levy, E., ed. (2000). Digestion and absorption of carbohydrates, fat and proteins (In : Rathaike RN, ed. *Small Bowel Disorders*. London (UK) : Hodder Arnold).

- Levy, E., Marcel, Y.L., Milne, R.W., Grey, V.L., and Roy, C.C. (1987). Absence of intestinal synthesis of apolipoprotein B-48 in two cases of abetalipoproteinemia. *Gastroenterology* 93, 1119-1126.
- Li, H., Jamal, J., Plaza, C., Pineda, S.H., Chreifi, G., Jing, Q., Cinelli, M.A., Silverman, R.B., and Poulos, T.L. (2014). Structures of human constitutive nitric oxide synthases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70, 2667-2674.
- Li, R.J., Yang, Y., Wang, Y.H., Xie, J.J., Song, L., Wang, Z., Zhang, Y.Z., Qin, Y.W., Li, Z.A., and Zhang, X.S. (2011). Micro-ultrasonographic imaging of atherosclerotic progression and correlation with inflammatory markers in apolipoprotein-E knockout mice. *Tex Heart Inst J* 38, 364-370.
- Libby, P. (2000). Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am J Cardiol* 86, 3J-8J; discussion 8J-9J.
- Linseisen, J., and Wolfram, G. (1998). Absorption of cholesterol oxidation products from ordinary foodstuff in humans. *Ann Nutr Metab* 42, 221-230.
- Lombardi-Boccia, G., Martinez-Dominguez, B., and Aguzzi, A. (2002). Total heme and non-heme iron in raw and cooked meats. *J Food Sci* 67, 1738-1741.
- Loree, H.M., Grodzinsky, A.J., Park, S.Y., Gibson, L.J., and Lee, R.T. (1994). Static circumferential tangential modulus of human atherosclerotic tissue. *J Biomech* 27, 195-204.
- Lorrain, B., Dangles, O., and Dufour, C. (2007). Stability and antioxidant capacity of food polyphenols in two chemical models of the gastric tract. *Annals of Nutrition and Metabolism* 51, 160-160.
- Lorrain, B., Dangles, O., Genot, C., and Dufour, C. (2010). Chemical Modeling of Heme-Induced Lipid Oxidation in Gastric Conditions and Inhibition by Dietary Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 676-683.
- Lorrain, B., Dangles, O., Loonis, M., Armand, M., and Dufour, C. (2012). Dietary iron-initiated lipid oxidation and its inhibition by polyphenols in gastric conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 9074-9081.
- Luczaj, W., Gegotek, A., and Skrzydlewska, E. (2017). Antioxidants and HNE in redox homeostasis. *Free Radic Biol Med* 111, 87-101.
- Lund, E., Bjorkhem, I., Furster, C., and Wikvall, K. (1993). 24-Hydroxylation, 25-Hydroxylation and 27-Hydroxylation of Cholesterol by a Purified Preparation of 27-Hydroxylase from Pig-Liver. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1166, 177-182.
- Lundin, L., Golding, M., and Wooster, T.J. (2008). Understanding food structure and function in developing food for appetite control. *Nutr Diet* 65, S79-S85.

~ L ~

- Mackay, K., Starr, J.R., Lawn, R.M., and Ellsworth, J.L. (1997). Phosphatidylcholine hydrolysis is required for pancreatic cholesterol esterase- and phospholipase A2-facilitated cholesterol uptake into intestinal Caco-2 cells. *J Biol Chem* 272, 13380-13389.
- Macready, A.L., George, T.W., Chong, M.F., Alimbetov, D.S., Jin, Y., Vidal, A., Spencer, J.P., Kennedy, O.B., Tuohy, K.M., Minihane, A.M., *et al.* (2014). Flavonoid-rich fruit and

vegetables improve microvascular reactivity and inflammatory status in men at risk of cardiovascular disease--FLAVURS: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 99, 479-489.

Malek, A.M., Alper, S.L., and Izumo, S. (1999). Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 282, 2035-2042.

Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Leseche, G., Freyssinet, J.M., and Tedgui, A. (1999). Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 99, 348-353.

Manach, C., and Donovan, J.L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research* 38, 771-785.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79, 727-747.

Mangels, D.R., and Mohler, E.R. (2017). Catechins as potential mediators of cardiovascular health. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 37, 757-763.

Marciani, L., Wickham, M., Singh, G., Bush, D., Pick, B., Cox, E., Fillery-Travis, A., Faulks, R., Marsden, C., Gowland, P.A., *et al.* (2006). Delaying gastric emptying and enhancing cholecystokinin release and satiety by using acid stable fat emulsions. *Gastroenterology* 130, A227-A227.

Marciani, L., Young, P., Wright, J., Moore, R., Coleman, N., Gowland, P.A., and Spiller, R.C. (2001). Antral motility measurements by magnetic resonance imaging. *Neurogastroenterol Motil* 13, 511-518.

Margaritis, M., Channon, K.M., and Antoniades, C. (2014). Statins as Regulators of Redox State in the Vascular Endothelium: Beyond Lipid Lowering. *Antioxidants & Redox Signaling* 20, 1198-1215.

Masumoto, S., Terao, A., Yamamoto, Y., Mukai, T., Miura, T., and Shoji, T. (2016). Non-absorbable apple procyanidins prevent obesity associated with gut microbial and metabolomic changes. *Sci Rep* 6, 31208.

McClements, D.J., and Decker, E.A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J Food Sci* 65, 1270-1282.

McClements, D.J., and Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function* 1, 32-59.

McDonald, M., Mila, I., and Scalbert, A. (1996). Precipitation of metal ions by plant polyphenols: Optimal conditions and origin of precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 599-606.

Mcrae, J.M., Falconer, R.J., and Kennedy, J.A. (2010). Thermodynamics of Grape and Wine Tannin Interaction with Polyproline: Implications for Red Wine Astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12510-12518.

Medina-Remon, A., Casas, R., Tresserra-Rimbau, A., Ros, E., Martinez-Gonzalez, M.A., Fito, M., Corella, D., Salas-Salvado, J., Lamuela-Raventos, R.M., and Estruch, R. (2017). Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: a substudy of the PREDIMED trial. *Br J Clin Pharmacol* 83, 114-128.

Merkus, H.G. (2009). Particle Size Measurements: Fundamentals, Practice, Quality. Part Technol Ser 17, 1-533.

- Mikkelsen, A., and Skibsted, L.H. (1995). Acid-catalysed reduction of ferrylmyoglobin: product distribution and kinetics of autoreduction and reduction by NADH. *Z Lebensm Unters Forsch* 200, 171-177.
- Min, B., Nam, K.C., Cordray, J., and Ahn, D.U. (2008). Endogenous factors affecting oxidative stability of beef loin, pork loin, and chicken breast and thigh meats. *Journal of Food Science* 73, C439-C446.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., *et al.* (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct* 5, 1113-1124.
- Mink, P.J., Scrafford, C.G., Barraj, L.M., Harnack, L., Hong, C.P., Nettleton, J.A., and Jacobs, D.R., Jr. (2007). Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 85, 895-909.
- Mittleman, M.A., and Mostofsky, E. (2011). Physical, psychological and chemical triggers of acute cardiovascular events: preventive strategies. *Circulation* 124, 346-354.
- Moore, K.J., and Freeman, M.W. (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1702-1711.
- Morand, C., Manach, C., Crespy, V., and Remesy, C. (2000). Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model. *Biofactors* 12, 169-174.
- Moreno-Ulloa, A., Mendez-Luna, D., Beltran-Partida, E., Castillo, C., Guevara, G., Ramirez-Sanchez, I., Correa-Basurto, J., Ceballos, G., and Villarreal, F. (2015). The effects of (-)-epicatechin on endothelial cells involve the G protein-coupled estrogen receptor (GPER). *Pharmacological Research* 100, 309-320.
- Mu, H., and Hoy, C.E. (2000). Effects of different medium-chain fatty acids on intestinal absorption of structured triacylglycerols. *Lipids* 35, 83-89.
- Murota, K., and Terao, J. (2005). Quercetin appears in the lymph of unanesthetized rats as its phase II metabolites after administered into the stomach. *FEBS Lett* 579, 5343-5346.
- Murray, C.I., Gebeska, M.A., Haile, A., Zhang, M.L., Kass, D.A., Champion, H.C., and Van Eyk, J.E. (2008). cGMP Specific Phosphodiesterase Type 5A Activity Is Regulated by S-nitrosylation at Cys 181. *Circulation* 118, S415-S415.

~ N ~

- Nakashima, I., Liu, W., Akhand, A.A., Takeda, K., Kawamoto, Y., Kato, M., and Suzuki, H. (2003). 4-hydroxynonenal triggers multistep signal transduction cascades for suppression of cellular functions. *Mol Aspects Med* 24, 231-238.
- Nakashima, Y., Chen, Y.X., Kinukawa, N., and Sueishi, K. (2002). Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age. *Virchows Arch* 441, 279-288.
- Napoli, C., D'Armiento, F.P., Mancini, F.P., Postiglione, A., Witztum, J.L., Palumbo, G., and 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. *J Clin Invest* 100, 2680-2690.

Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C., and Salvayre, R. (2008). Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol* *153*, 6-20.

Negre-Salvayre, A., Garoby-Salom, S., Swiader, A., Rouahi, M., Pucelle, M., and Salvayre, R. (2017). Proatherogenic effects of 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* *111*, 127-139.

Negre-Salvayre, A., Lopez, M., Levade, T., Pieraggi, M.T., Dousset, N., Douste-Blazy, L., and Salvayre, R. (1990). Ultraviolet-treated lipoproteins as a model system for the study of the biological effects of lipid peroxides on cultured cells. II. Uptake and cytotoxicity of ultraviolet-treated LDL on lymphoid cell lines. *Biochim Biophys Acta* *1045*, 224-232.

Niu, X.F., Smith, C.W., and Kubes, P. (1994). Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ Res* *74*, 1133-1140.

Northrop, D.B. (2001). Follow the protons: a low-barrier hydrogen bond unifies the mechanisms of the aspartic proteases. *Acc Chem Res* *34*, 790-797.

~ O ~

Oak, M.H., Auger, C., Belcastro, E., Park, S.H., Lee, H.H., and Schini-Kerth, V.B. (2018). Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium. *Free Radic Biol Med* *122*, 161-170.

Ogino, Y., Osada, K., Nakamura, S., Ohta, Y., Kanda, T., and Sugano, M. (2007). Absorption of dietary cholesterol oxidation products and their downstream metabolic effects are reduced by dietary apple polyphenols. *Lipids* *42*, 151-161.

Oguzhan, Y.M., S. and Husamettin G. (2013). Pharmacology of Arterial Grafts for Coronary Artery Bypass Surgery. *Artery bypass*.

Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., and Lobb, R. (1989). Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* *59*, 1203-1211.

Ou, K.Q., Sarnoski, P., Schneider, K.R., Song, K.J., Khoo, C., and Gu, L.W. (2014). Microbial catabolism of procyanidins by human gut microbiota. *Molecular Nutrition & Food Research* *58*, 2196-2205.

Oueslati, K., Promeyrat, A., Gatellier, P., Daudin, J.D., and Kondjoyan, A. (2018). Stoichiometric Modeling of Fenton Chemistry in a Meat-Mimetic Aqueous-Phase Medium. *J Agric Food Chem* *66*, 5892-5900.

Owens, G.K., Kumar, M.S., and Wamhoff, B.R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* *84*, 767-801.

~ P ~

Pafumi, Y., Lairon, D., de la Porte, P.L., Juhel, C., Storch, J., Hamosh, M., and Armand, M. (2002). Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. *J Biol Chem* *277*, 28070-28079.

Palm, F., Onozato, M.L., Luo, Z., and Wilcox, C.S. (2007). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H3227-3245.

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

Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., and Kleinert, H. (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23, 75-93.

Perez-Jimenez, J., Fezeu, L., Touvier, M., Arnault, N., Manach, C., Hercberg, S., Galan, P., and Scalbert, A. (2011). Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *American Journal of Clinical Nutrition* 93, 1220-1228.

Perk, J., De Backer, G., Gohlke, H., Graham, I., Reiner, Z., Verschuren, M., Albus, C., Benlian, P., Boysen, G., Cifkova, R., *et al.* (2012). European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J* 33, 1635-1701.

Petroff, M.G., Kim, S.H., Pepe, S., Dessy, C., Marban, E., Balligand, J.L., and Sollott, S.J. (2001). Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca<sup>2+</sup> release in cardiomyocytes. *Nat Cell Biol* 3, 867-873.

Pizzimenti, S., Barrera, G., Dianzani, M.U., and Brusselbach, S. (1999). Inhibition of D1, D2, and A-cyclin expression in HL-60 cells by the lipid peroxydation product 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 26, 1578-1586.

Poncet-Legrand, C., Gautier, C., Cheynier, V., and Imberty, A. (2007). Interactions between flavan-3-ols and poly(L-proline) studied by isothermal titration calorimetry: Effect of the tannin structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 9235-9240.

Prigent, S.V.E., Voragen, A.G.J., van Koningsveld, G.A., Baron, A., Renard, C.M.G.C., and Gruppen, H. (2009). Interactions between globular proteins and procyanidins of different degrees of polymerization. *J Dairy Sci* 92, 5843-5853.

Pryor, W.A., ed. (1982). *Free Radicals in Biology Volume V*.

Pryor, W.A., and Castle, L. (1984). In *Oxygen Radicals in Biological Systems*, L. Packer, ed. (Orlando, Academic Press), pp. 293-295.

Pyrzynska, K., and Biesaga, M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trac-Trend Anal Chem* 28, 893-902.

~ Q ~

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., and Pouysegou, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 50, 586-621.

- Rader, D.J., and Daugherty, A. (2008). Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 451, 904-913.
- Raines, E.W., and Ferri, N. (2005). Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *J Lipid Res* 46, 1081-1092.
- Rajavashisth, T.B., Andalibi, A., Territo, M.C., Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., and Lusis, A.J. (1990). Induction of Endothelial-Cell Expression of Granulocyte and Macrophage Colony-Stimulating Factors by Modified Low-Density Lipoproteins. *Nature* 344, 254-257.
- Ramirez-Sanchez, I., Taub, P.R., Ciaraldi, T.P., Nogueira, L., Coe, T., Perkins, G., Hogan, M., Maisel, A.S., Henry, R.R., Ceballos, G., *et al.* (2013). (-)-Epicatechin rich cocoa mediated modulation of oxidative stress regulators in skeletal muscle of heart failure and type 2 diabetes patients. *Int J Cardiol* 168, 3982-3990.
- Ravi, K., Brennan, L.A., Levic, S., Ross, P.A., and Black, S.M. (2004). S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. *P Natl Acad Sci USA* 101, 2619-2624.
- Renard, C.M.G.C., Watrelot, A.A., and Le Bourvellec, C. (2017). Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends Food Sci Tech* 60, 43-51.
- Riahi, Y., Kaiser, N., Cohen, G., Abd-Elrahman, I., Blum, G., Shapira, O.M., Koler, T., Simionescu, M., Sima, A.V., Zarkovic, N., *et al.* (2015). Foam cell-derived 4-hydroxynonenal induces endothelial cell senescence in a TXNIP-dependent manner. *J Cell Mol Med* 19, 1887-1899.
- Richardson, P.D., Davies, M.J., and Born, G.V. (1989). Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 2, 941-944.
- Riediger, N.D., Othman, R.A., Suh, M., and Moghadasian, M.H. (2009). A Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease. *J Am Diet Assoc* 109, 668-679.
- Rios, L.Y., Bennett, R.N., Lazarus, S.A., Remesy, C., Scalbert, A., and Williamson, G. (2002). Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans'. *American Journal of Clinical Nutrition* 76, 1106-1110.
- Robbesyn, F., Garcia, V., Auge, N., Vieira, O., Frisach, M.F., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (2003). HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells. *FASEB J* 17, 743-745.
- Rohn, S., Rawel, H.M., and Kroll, J. (2004). Antioxidant activity of protein-bound quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4725-4729.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138, S419-420.

- Sadik, C.D., Sies, H., and Schewe, T. (2003). Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol* *65*, 773-781.
- Sams, L., Paume, J., Giallo, J., and Carriere, F. (2016). Relevant pH and lipase for in vitro models of gastric digestion. *Food & Function* *7*, 30-45.
- Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D., and Drilleau, J.F. (1999). Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *47*, 4847-4853.
- Sansone, R., Rodriguez-Mateos, A., Heuel, J., Falk, D., Schuler, D., Wagstaff, R., Kuhnle, G.G.C., Spencer, J.P.E., Schroeter, H., Merx, M.W., *et al.* (2015). Cocoa flavanol intake improves endothelial function and Framingham Risk Score in healthy men and women: a randomised, controlled, double-masked trial: the Flaviola Health Study. *British Journal of Nutrition* *114*, 1246-1255.
- Santos-Buelga, C., and Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agr* *80*, 1094-1117.
- Sato, K., Nakano, K., Katsuki, S., Matoba, T., Osada, K., Sawamura, T., Sunagawa, K., and Egashira, K. (2012). Dietary cholesterol oxidation products accelerate plaque destabilization and rupture associated with monocyte infiltration/activation via the MCP-1-CCR2 pathway in mouse brachiocephalic arteries: therapeutic effects of ezetimibe. *J Atheroscler Thromb* *19*, 986-998.
- Sattler, W., Christison, J., and Stocker, R. (1995). Cholesterylester hydroperoxide reducing activity associated with isolated high- and low-density lipoproteins. *Free Radic Biol Med* *18*, 421-429.
- Sayd, T., Dufour, C., Chambon, C., Buffiere, C., Remond, D., and Sante-Lhoutellier, V. (2018). Combined in vivo and in silico approaches for predicting the release of bioactive peptides from meat digestion. *Food Chemistry* *249*, 111-118.
- Schaur, R.J. (2003). Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* *24*, 149-159.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.X., Allescher, H.D., Korth, M., Wilm, M., *et al.* (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I $\beta$ . *Nature* *404*, 197-201.
- Schwarz, P.M., Kleinert, H., and Forstermann, U. (1999). Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *19*, 2584-2590.
- Schwarzinger, S., Ahrer, W., and Muller, N. (2000). Proteolytic preparation of a heme binding fragment from sperm whale myoglobin: Micro-myoglobin. *Monatshefte Fur Chemie* *131*, 409-416.
- Seddon, M.D., Chowienzyk, P.J., Brett, S.E., Casadei, B., and Shah, A.M. (2008). Neuronal nitric oxide synthase regulates basal microvascular tone in humans in vivo. *Circulation* *117*, 1991-1996.

- Seetharam, D., Mineo, C., Gormley, A.K., Gibson, L.L., Vongpatanasin, W., Chambliss, K.L., Hahner, L.D., Cummings, M.L., Kitchens, R.L., Marcel, Y.L., *et al.* (2006). High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ Res* 98, 63-72.
- Seimon, T., and Tabas, I. (2009). Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J Lipid Res* 50 *Suppl*, S382-387.
- Serra, A.T., Rocha, J., Sepodes, B., Matias, A.A., Feliciano, R.P., de Carvalho, A., Bronze, M.R., Duarte, C.M., and Figueira, M.E. (2012). Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties - Correlation of response with composition. *Food Chem* 135, 2378-2386.
- Sfeir, Z., Ibrahimi, A., Amri, E., Grimaldi, P., and Abumrad, N. (1997). Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 57, 17-21.
- Shaw, P.X., Horkko, S., Chang, M.K., Curtiss, L.K., Palinski, W., Silverman, G.J., and Witztum, J.L. (2000). Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J Clin Invest* 105, 1731-1740.
- Singh, H., and Sarkar, A. (2011). Behaviour of protein-stabilised emulsions under various physiological conditions. *Adv Colloid Interfac* 165, 47-57.
- Smith, J.D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J., and Miyata, M. (1995). Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8264-8268.
- Staprans, I., Pan, X.M., Rapp, J.H., and Feingold, K.R. (2005). The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 49, 1075-1082.
- Staprans, I., Rapp, J.H., Pan, X.M., and Feingold, K.R. (1996). Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats. *J Lipid Res* 37, 420-430.
- Staprans, I., Rapp, J.H., Pan, X.M., Kim, K.Y., and Feingold, K.R. (1994). Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized lipid in chylomicrons of human serum. *Arterioscler Thromb* 14, 1900-1905.
- Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1512-1531.
- Steffen, Y., Gruber, C., Schewe, T., and Sies, H. (2008). Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 469, 209-219.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., and Witztum, J.L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320, 915-924.
- Steinbrecher, U.P. (1999). Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1436, 279-298.
- Steppeler, C., Haugen, J.E., Rodbotten, R., and Kirkhus, B. (2016). Formation of Malondialdehyde, 4-Hydroxynonenal, and 4-Hydroxyhexenal during in Vitro Digestion of

Cooked Beef, Pork, Chicken, and Salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 487-496.

Stocker, R., and Keaney, J.F., Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84, 1381-1478.

Stoclet, J.C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M.H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., and Schini-Kerth, V.B. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 500, 299-313.

Suman, S.P., Faustman, C., Stamer, S.L., and Liebler, D.C. (2007). Proteomics of lipid oxidation-induced oxidation of porcine and bovine oxymyoglobins. *Proteomics* 7, 628-640.

Suomela, J.P., Ahotupa, M., and Kallio, H. (2005). Triacylglycerol oxidation in pig lipoproteins after a diet rich in oxidized sunflower seed oil. *Lipids* 40, 437-444.

Szabo, C., Ischiropoulos, H., and Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6, 662-680.

~ T ~

Taubman, M.B., Fallon, J.T., Schechter, A.D., Giesen, P., Mendlowitz, M., Fyfe, B.S., Marmur, J.D., and Nemerson, Y. (1997). Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 78, 200-204.

Thomson, A.B., McIntyre, Y., MacLeod, J., and Keelan, M. (1986). Adaptation of colonic uptake of hexoses and lipids following ileal resection: effect of variations in the fat content of the diet. *Digestion* 35, 89-94.

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2, 1231-1246.

Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E., and Khanizadeh, S. (2005). Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *J Agric Food Chem* 53, 4989-4995.

Tsao, R., Yang, R., Young, J.C., and Zhu, H. (2003). Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J Agric Food Chem* 51, 6347-6353.

Tullberg, C., Larsson, K., Carlsson, N.G., Comi, I., Scheers, N., Vegarud, G., and Undeland, I. (2016). Formation of reactive aldehydes (MDA, HHE, HNE) during the digestion of cod liver oil: comparison of human and porcine in vitro digestion models. *Food Funct* 7, 1401-1412.

Tyssandier, V., Reboul, E., Dumas, J.F., Bougteloup-Demange, C., Armand, M., Marcand, J., Sallas, M., and Borel, P. (2003). Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *Am J Physiol-Gastr L* 284, G913-G923.

~ U ~

Uchida, K., and Stadtman, E.R. (1992). Modification of Histidine-Residues in Proteins by Reaction with 4-Hydroxynonenal. *P Natl Acad Sci USA* 89, 4544-4548.

~ V ~

Vallance, P., and Leiper, J. (2004). Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1023-1030.

Van Hecke, T., Vanden Bussche, J., Vanhaecke, L., Vossen, E., Van Camp, J., and De Smet, S. (2014). Nitrite Curing of Chicken, Pork, and Beef Inhibits Oxidation but Does Not Affect N-Nitroso Compound (NOC)-Specific DNA Adduct Formation during in Vitro Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 1980-1988.

Venegas-Pino, D.E., Banko, N., Khan, M.I., Shi, Y.Y., and Werstuck, G.H. (2013). Quantitative Analysis and Characterization of Atherosclerotic Lesions in the Murine Aortic Sinus. *Jove-J Vis Exp*.

Vindis, C., Elbaz, M., Escargueil-Blanc, I., Auge, N., Heniquez, A., Thiers, J.C., Negre-Salvayre, A., and Salvayre, R. (2005). Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. *Arterioscl Throm Vas* 25, 639-645.

Vine, D.F., Croft, K.D., Beilin, L.J., and Mamo, J.C. (1997). Absorption of dietary cholesterol oxidation products and incorporation into rat lymph chylomicrons. *Lipids* 32, 887-893.

Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., and Mattivi, F. (2004). Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *J Agric Food Chem* 52, 6532-6538.

Vulcain, E., Goupy, P., Caris-Veyrat, C., and Dangles, O. (2005). Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: Action in the aqueous vs. lipid phase. *Free Radic Res* 39, 547-563.

~ W ~

Waddington, E.I., Croft, K.D., Sienuarine, K., Latham, B., and Puddey, I.B. (2003). Fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque: an analysis of clinical and histopathological correlates. *Atherosclerosis* 167, 111-120.

Wallerath, T., Gath, I., Aulitzky, W.E., Pollock, J.S., Kleinert, H., and Forstermann, U. (1997). Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. *Thromb Haemost* 77, 163-167.

Wang, L., Tu, Y.C., Lian, T.W., Hung, J.T., Yen, J.H., and Wu, M.J. (2006). Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem* 54, 9798-9804.

White, D.A., Fisk, I.D., Makkhun, S., and Gray, D.A. (2009). In vitro assessment of the bioaccessibility of tocopherol and fatty acids from sunflower seed oil bodies. *J Agric Food Chem* 57, 5720-5726.

Williams, K.J., and Tabas, I. (1995). The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 551-561.

Williams, M.J.A., Sutherland, W.H.F., McCormick, M.P., de Jong, S.A., Walker, R.J., and Wilkins, G.T. (1999). Impaired endothelial function following a meal rich in used cooking fat. *Journal of the American College of Cardiology* 33, 1050-1055.

Williamson, G., and Clifford, M.N. (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *Br J Nutr* 104 Suppl 3, S48-66.

Witztum, J.L. (1991). The Role of Oxidized Ldl in Atherosclerosis. *Hypercholesterolemia, Hypocholesterolemia, Hypertriglyceridemia, Invivo Kinetics* 285, 353-365.

Witztum, J.L., and Steinberg, D. (1991). Role of Oxidized Low-Density-Lipoprotein in Atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 88, 1785-1792.

Witztum, J.L., and Steinberg, D. (2001). The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 11, 93-102.

Wojdylo, A., Oszmianski, J., and Laskowski, P. (2008). Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 6520-6530.

Wood, R.J. (2005). Bioavailability: definition, general aspects and fortificants. *Encyclopedia of human nutrition 2nd edition Oxford, Caballero B., Prentice A., Allen L., Elsevier Ltd.*

Wu, G., and Morris, S.M., Jr. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 ( Pt 1), 1-17.

Wu, Y., Kaveti, S., and Engen, J.R. (2006). Extensive deuterium back-exchange in certain immobilized pepsin columns used for H/D exchange mass spectrometry. *Anal Chem* 78, 1719-1723.

~ X ~

Xu, X.P., Meisel, S.R., Ong, J.M., Kaul, S., Cercek, B., Rajavashisth, T.B., Sharifi, B., and Shah, P.K. (1999). Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 99, 993-998.

~ Y ~

Yuan, X.M., Li, W., Brunk, U.T., Dalen, H., Chang, Y.H., and Sevanian, A. (2000). Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products. *Free Radic Biol Med* 28, 208-218.

Yuhanna, I.S., Zhu, Y., Cox, B.E., Hahner, L.D., Osborne-Lawrence, S., Lu, P., Marcel, Y.L., Anderson, R.G., Mendelsohn, M.E., Hobbs, H.H., *et al.* (2001). High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 7, 853-857.

~ Z ~

Zhan, J., Liu, Y.J., Cai, L.B., Xu, F.R., Xie, T., and He, Q.Q. (2017). Fruit and vegetable consumption and risk of cardiovascular disease: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Crit Rev Food Sci* 57, 1650-1663.

Zhang, H.M., Cao, J., Fei, Z.H., and Wang, Y.Q. (2012). Investigation on the interaction behavior between bisphenol A and pepsin by spectral and docking studies. *J Mol Struct* 1021, 34-39.

Zhang, Z.Q., and Smith, D.L. (1993). Determination of Amide Hydrogen-Exchange by Mass-Spectrometry - a New Tool for Protein-Structure Elucidation. *Protein Sci* 2, 522-531.

Zhong, H., Lu, J., Xia, L., Zhu, M., and Yin, H. (2014). Formation of electrophilic oxidation products from mitochondrial cardiolipin in vitro and in vivo in the context of apoptosis and atherosclerosis. *Redox Biol* 2, 878-883.

Zhou, L.S., and Elias, R.J. (2013). Antioxidant and pro-oxidant activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate in food emulsions: Influence of pH and phenolic concentration. *Food Chemistry* 138, 1503-1509.

---

## ***Oxydation des acides gras polyinsaturés n-6 au cours de la digestion et altération de la fonction vasculaire. Stratégie antioxydante par supplémentation en polyphénols de pomme***

---

Selon l'OMS, d'ici 2030, près de 23,6 millions de personnes décéderont de maladies cardiovasculaires chaque année représentant la première cause de mortalité ainsi qu'un enjeu majeur de santé publique. Parmi celles-ci, les pathologies ischémiques sont les plus fréquentes. Elles ont pour origine une dysfonction endothéliale favorisant le développement de l'athérosclérose. Le principal facteur de risque associé à ces pathologies est un régime de type occidental riche en acides gras polyinsaturés n-6, sensibles à l'oxydation, et en fer héminique apporté par la viande rouge. A l'opposé, une alimentation riche en fruits, légumes et céréales peut être source d'antioxydants naturels comme les polyphénols. Parmi les polyphénols, les procyanidines (PCs, flavonoïdes) apparaissent comme corrélés à une réduction des maladies coronariennes et des accidents vasculaires cérébraux. Ainsi, les objectifs de ce travail de thèse étaient : 1) d'évaluer la formation de produits d'oxydation lipidique dans le tractus gastro-intestinal au cours de la digestion puis leur effet chronique après absorption intestinale sur la fonction vasculaire ; 2) d'évaluer l'influence d'une supplémentation alimentaire en PCs de pomme comme stratégie antioxydante primaire afin de prévenir la formation de produits d'oxydation lipidique et d'ainsi préserver la fonction vasculaire. Des premiers résultats ont été acquis dans un système constitué par une émulsion huile de tournesol-dans-eau et du fer héminique (méthmyoglobine) et dans des conditions simulant les phases initiale et médiane de digestion à pH 5 et 3, respectivement. Il apparaît que l'oxydation lipidique, évaluée à travers la formation des diènes conjugués lipidiques (DC) et du 4-hydroxynonéal (4-HNE), est amorcée plus rapidement à pH 3 qu'à pH 5, que la pepsine accélère l'accumulation des DC à pH 5 par la formation d'une forme de micro-méthmyoglobine plus accessible aux acides gras. Les trois matrices (pomme fraîche, purée et extrait phénolique) ajoutées à dose nutritionnelle montrent une capacité inhibitrice plus faible à pH 5 en présence de pepsine alors que celle-ci semble augmentée à pH 3. Cette stratégie antioxydante a ensuite été évaluée en modèle *in vitro* de digestion gastro-intestinale démontrant une réduction de 73-96% de la formation du 4-HNE en fin de phase gastrique et de 60-95% en fin de phase intestinale. Enfin, une étude chronique a été conduite pour évaluer *in vivo* l'impact de l'oxydation lipidique dans un modèle de souris ApoE<sup>-/-</sup>. L'oxydation des lipides lors de la digestion était associée à une augmentation du taux plasmatique de LDLox et du stress oxydant ayant pour conséquence une altération de la fonction endothéliale. Cette altération de l'endothélium était associée à une augmentation du développement des plaques d'athérome potentiellement instables. De manière intéressante, la supplémentation en polyphénols (purée ou extrait phénolique) prévenait l'augmentation du taux de LDLox, l'exacerbation des altérations endothéliales ainsi que la taille de la plaque d'athérome. En conclusion, les polyphénols de pomme limiteraient la formation de 4-HNE absorbable au cours de la digestion protégeant à long terme la fonction vasculaire. Nos résultats sont en faveur d'une réintroduction de fruits riches en PCs (pomme, poire) dans une alimentation de type occidental.

***Mots clés*** : oxydation lipidique, digestion gastro-intestinale, dysfonction endothéliale, athérosclérose, polyphénols de pomme.

---

## ***n-6 polyunsaturated fatty acid oxidation during digestion and vascular function impairment. Antioxidant strategy by a supplementation in apple polyphenols***

---

According to the WHO, in 2030, nearly 23.6 million people will die of cardiovascular disease each year representing the leading cause of death as well as a major public health problem. Among these, ischemic diseases are the most common. They are the consequences of an endothelial dysfunction that promotes atherosclerosis development. The main risk factor associated with these pathologies is a Western diet rich in n-6 polyunsaturated fatty acids sensitive to oxidation by heme iron provided by red meat. In contrast, a diet rich in fruits, vegetables and grains can be a source of natural antioxidants such as polyphenols. Among polyphenols, procyanidins (PCs, flavonoids) appear correlated with a reduction of coronary heart disease and stroke. Thus, the aims of this work were: 1) to evaluate the potential formation of lipid oxidation products in the gastrointestinal tract during digestion, and their effects on the vascular function after absorption; 2) to evaluate the effects of a supplementation in apple PCs as a primary antioxidant strategy to prevent deleterious effects of lipid oxidation on the vascular function. First results were obtained in a sunflower oil-in-water emulsion as a model system with post-prandial stress brought by the addition of heme iron (metmyoglobin) in digestion conditions simulating the early and median phases of gastric digestion at pH 5 and 3, respectively. It appears that lipid oxidation, evaluated through the formation of lipid-derived conjugated dienes (CD) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) is initiated more quickly at pH 3 than at pH 5. Pepsin promotes faster CD accumulation at pH 5 through the formation of a micro-metmyoglobin form that is likely more accessible to fatty acids. The three matrices (fresh apple, puree and phenolic extract) added at nutritional dose show a lower inhibitory capacity at pH 5, while higher at pH 3, in the presence of pepsin. This antioxidant strategy was then evaluated in a model of *in vitro* gastrointestinal digestion demonstrating a reduction of 73-96% in 4-HNE formation at the end of the gastric phase and 60-95% at the end of the intestinal phase. Finally, a chronic *in vivo* study was conducted to evaluate the impact of lipid oxidation in an ApoE<sup>-/-</sup> mouse model. The increase of lipid oxidation during digestion led to an increase in plasmatic oxidative stress and oxLDL levels resulting in an impairment of the endothelial function. This endothelial dysfunction was associated with an increased formation of atheromatous plaques that are potentially unstable. Interestingly, polyphenol supplementation (puree or phenolic extract) prevented the increase of plasmatic oxLDL as well as the development of endothelial impairments. Consequently, this treatment was able to prevent the development of atherosclerosis observed in our model. In conclusion, apple polyphenols could limit 4-HNE formation and absorption during digestion protecting the vascular function in the long-term. Our results are in favor of a reintroduction of PCs-rich fruits (apple, pear) in the Western diet.

***Keywords***: lipid oxidation, gastrointestinal digestion, endothelial dysfunction, atherosclerosis, apple polyphenols.