



**HAL**  
open science

# Polyphénols et santé vasculaire: mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire

Christine Morand, Dragan Milenkovic

## ► To cite this version:

Christine Morand, Dragan Milenkovic. Polyphénols et santé vasculaire: mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire. *Innovations Agronomiques*, 2014, 42, pp.47-62. 10.17180/n5hq-sz71 . hal-04506893

**HAL Id: hal-04506893**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04506893>**

Submitted on 15 Mar 2024

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

## **Polyphénols et santé vasculaire: mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire**

**Morand C.<sup>1</sup>, Milenkovic D.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine (UNH), Equipe Micronutriments et Santé Cardiovasculaire, INRA - Centre de Recherche Clermont-Ferrand/Theix, CRNH d'Auvergne.

Correspondance : christine.morand@clermont.inra.fr

### **Résumé**

Les polyphénols sont des micro-constituants végétaux abondants dans nos aliments. Ces composés sont reconnus pour leur forte bioactivité qui se traduit au niveau de l'organisme par une large gamme de propriétés biologiques, potentiellement intéressantes pour contribuer aux effets santé des produits végétaux. Les arguments scientifiques les plus convaincants sur les effets santé des polyphénols concernent leur impact sur la protection de la fonction vasculaire.

Cet article rappelle le rôle clé du maintien de l'intégrité et de la fonction vasculaire pour prévenir ou retarder l'apparition des maladies chroniques liées à l'âge, maladies cardiovasculaires, diabète de type 2, déclin cognitif, et l'importance de l'alimentation dans cette prévention. Il illustre également l'intérêt nutritionnel des polyphénols en lien avec la protection vasculaire, fait état des limites des études actuelles et propose une stratégie pertinente pour une avancée des connaissances dans ce domaine. Enfin, les résultats originaux des recherches conduites à l'INRA au niveau clinique et clinique, chez l'animal et *in vitro*, sur l'impact des polyphénols des agrumes sur la protection vasculaire et sur les mécanismes d'action sous-jacents à ces effets sont présentés.

**Mots-clés:** phytomicronutriments, fonction vasculaire, mécanismes d'actions, nutrition préventive

**Abstract: Polyphenols and vascular health: Demonstration of the role of polyphenols in the vascular protective effects of citrus fruits.**

Polyphenols are abundant plant micro-constituents in our food. These compounds are known for their high bioactivity and with a wide range of biological properties in the body of potential interest that contribute to the health effects of plant products. The most convincing scientific evidences regarding the health effects of polyphenols are regarding their impact on the protection of vascular function.

This article points out the key role of maintaining the vascular integrity and function to prevent or delay the onset of chronic diseases associated with aging, such as cardiovascular disease, type 2 diabetes or cognitive decline, and the importance of the food in prevention. It also illustrates the nutritional value of polyphenols related to the vascular protection, describes the limitations of current studies and provides a relevant strategy for future research to increase knowledge in this area. Finally, the original findings of clinical, animal and *in vitro* research conducted at INRA on the impact of citrus polyphenols on vascular protection and action mechanisms underlying these effects are presented.

**Keywords:** phytomicronutrients, vascular function, mechanisms of action, preventive nutrition

## Introduction

L'alimentation est une composante déterminante dans la prévention primaire de nombreuses maladies chroniques associées au vieillissement comme les maladies cardiovasculaires (MCV), le diabète de type 2, les maladies neuro-dégénératives et certains cancers. Les MCV sont la première cause de mortalité et de morbidité dans le monde et d'après les projections de l'OMS, cette situation devrait perdurer dans les vingt prochaines années (Mathers et Loncar, 2006). Des dysfonctionnements vasculaires précoces sont à l'origine du développement des MCV et ils sont également impliqués dans la survenue de troubles cognitifs au cours du vieillissement. A l'avenir, le pourcentage des individus atteints d'une altération des fonctions cognitives devrait dramatiquement augmenter puisque le nombre de personnes de plus de 60 ans devrait tripler d'ici 2100 dans le monde. Pour la France, on estime qu'un français sur quatre de plus de 65 ans sera atteint par un déclin cognitif sévère d'ici 2020. Dans ce contexte, **un défi majeur pour la recherche est d'identifier les modes alimentaires, aliments, nutriments, micronutriments ou autres microconstituants susceptibles de prévenir ou retarder les dysfonctionnements vasculaires précoces.** Ce type de recherche est crucial pour affiner et optimiser les recommandations nutritionnelles et pour fournir les bases scientifiques nécessaires au développement de nouveaux aliments fonctionnels susceptibles de prévenir ou limiter la progression des MCV et le déclin cognitif. Il existe beaucoup de preuves épidémiologiques et cliniques des bienfaits d'une consommation élevée de fruits et légumes pour la santé, notamment cardiovasculaire (Wang et al., 2014). Ces aliments sont sources d'une grande diversité de composés bioactifs, dont les plus abondants sont les polyphénols. Ces composés pourraient contribuer aux effets santé des produits végétaux, notamment par leur rôle dans la préservation de la fonction vasculaire.

L'objectif de cette revue est 1) de situer le rôle de la fonction vasculaire dans le contrôle du développement des MCV et dans l'apparition des troubles cognitifs, 2) de présenter l'état des connaissances sur l'intérêt nutritionnel des polyphénols alimentaires en lien avec la santé vasculaire et 3) de faire le point sur les besoins de recherche dans ce domaine. A cet égard, la dernière partie de l'article est une illustration de la stratégie développée à l'INRA, dans l'Unité de Nutrition Humaine, pour conduire des recherches translationnelles sur l'impact des polyphénols sur la santé vasculaire. Les résultats présentés concernent le rôle des polyphénols dans les effets des agrumes sur la protection vasculaire et les mécanismes responsables de ces effets.

## 1. Relation alimentation - fonction vasculaire - prévention des pathologies

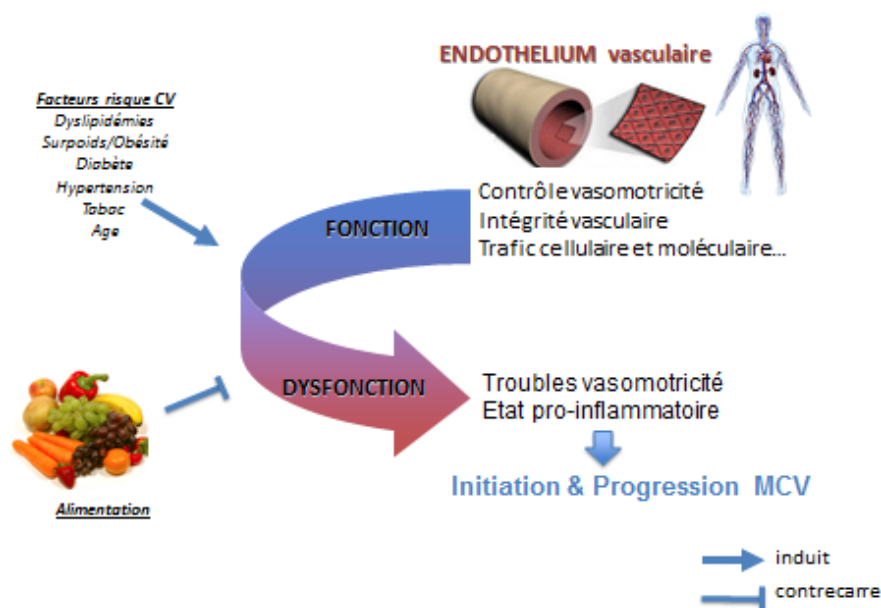
### 1.1 Les MCV, un problème de santé publique modulable par l'alimentation

Au sein de l'Union Européenne (UE), les maladies cardiovasculaires (MCV) sont d'ores et déjà à l'origine de plus de 40% des décès annuels (soit 2 millions de morts) et les coûts directs et indirects liés à ces pathologies atteignent 192 milliards d'euros/an (*European Cardiovascular Disease, Statistics 2012*). Ce coût représente une dépense très importante puisqu'il est supérieur au budget annuel de l'UE. Vu l'augmentation spectaculaire au cours des trois dernières décennies du nombre de personnes en surpoids et obèses dans l'UE, en particulier chez les enfants avec une prévalence du surpoids de 30%, on peut encore s'attendre, dans les années à venir, à une augmentation très significative du nombre d'individus atteints de MCV. Dans ce contexte, il est urgent de définir et mettre en place des stratégies efficaces pour réduire les taux de mortalité prématurée, de morbidité et les pertes de productivité liés au MCV. Relever ce défi est possible puisque, selon l'OMS, 80% de ces pathologies pourraient être évitées en adoptant un mode de vie sain, c'est à dire une activité physique régulière et une alimentation équilibrée. A cet égard, l'OMS préconise une consommation élevée de fruits et légumes, une recommandation relayée au niveau de l'UE par un grand nombre de programmes de politiques de santé publique qui préconisent de consommer au moins 400 g/j de fruits et légumes, ce qui correspond à au moins 5 fruits et légumes sous n'importe quelle forme (frais, jus, conserve, surgelés...).

## 1.2 Préserver la fonction vasculaire : un prérequis pour prévenir les MCV et le déclin cognitif

Pour une meilleure stratégie de prévention des MCV par l'alimentation, il est important de cibler les dysfonctionnements vasculaires précoces à l'origine de ces pathologies. En effet, la plupart des MCV (cardiopathie coronarienne, accident vasculaire cérébral (AVC)) sont des complications de **l'athérosclérose, une pathologie inflammatoire chronique** caractérisée par le développement des plaques d'athérome au niveau des artères (Libby, 2002). Ce dépôt gras sur les parois internes des vaisseaux empêche le sang de parvenir au cœur ou au cerveau. Les facteurs de risque cardiovasculaire (tabac, dyslipidémies, hypertension, obésité, diabète) créent un environnement pro-oxydant et pro-inflammatoire à l'origine de son développement. Les phases précoces du développement de l'athérosclérose sont « silencieuses », les symptômes cliniques ne se manifestant qu'après plusieurs années. La prévention de cette pathologie, plus encore que son traitement, est donc capitale. A cet égard, la qualité de l'alimentation joue un rôle déterminant.

L'**endothélium vasculaire** qui tapisse la paroi de nos vaisseaux est un tissu dynamique **intimement impliqué dans le développement de l'athérosclérose**. En particulier, il joue un rôle clé dans la régulation de la réactivité vasculaire (capacité des vaisseaux à se dilater) ainsi que dans les processus qui régissent les interactions entre cellules immunitaires circulantes et paroi vasculaire. Ces processus sont à l'origine de l'initiation de l'athérosclérose. Dans un environnement favorable, l'endothélium vasculaire assure le maintien du tonus vasculaire et du flux sanguin et il n'exprime pas ou peu de facteurs pro-inflammatoires. Par contre, les facteurs de risque cardiovasculaire induisent une inflammation chronique qui conduit au dysfonctionnement endothélial (Figure 1).



**Figure 1 :** Rôle de l'endothélium vasculaire dans le déclenchement des dysfonctionnements vasculaires précoces à l'origine du développement des maladies cardiovasculaires

Cette **dysfonction endothéliale** se traduit par une réduction de la capacité des vaisseaux à se dilater et par la sécrétion de diverses molécules (molécules d'adhésion, cytokines pro-inflammatoires, facteurs de croissance ou pro-coagulants) qui affectent l'intégrité vasculaire. Le dysfonctionnement endothélial étant à l'origine du déclenchement et de la progression de l'athérosclérose, **la fonction endothéliale constitue « un baromètre » de la santé cardiovasculaire** (Widlansky et al., 2003). Elle peut être évaluée de manière non invasive et améliorée par le traitement précoce de facteurs de risque cardiovasculaire, notamment par une prise en charge nutritionnelle. La dysfonction endothéliale est

également étroitement associée au diabète de type 2. Si la mesure de la fonction endothéliale reflète la vasomotricité, il est également possible d'évaluer chez l'homme de manière non invasive **la rigidité artérielle**, un autre indicateur puissant de la fonction vasculaire. Ce paramètre augmente avec l'âge et il est étroitement corrélé avec le risque de MCV, aussi il est très utilisé pour estimer et suivre l'état du système cardiovasculaire. **La pression sanguine et l'agrégation plaquettaire** sont deux autres composantes qui impactent la santé vasculaire.

Outre la préservation de la santé cardiovasculaire, un bon fonctionnement du système vasculaire est aussi déterminant pour prévenir d'autres types de dysfonctionnements ou pathologies chroniques liés au vieillissement. En particulier, il est bien établi que la présence de facteurs de risque vasculaire (dysfonction endothéliale, rigidité artérielle, hypertension) et une réduction du débit sanguin cérébral (CBF) prédisposent aux atteintes cognitives et augmentent le risque de développer une maladie neurodégénérative (maladie d'Alzheimer, démence vasculaire) (Bangen et al., 2014 ; Gorelik et al., 2011). La présence de facteurs de risque vasculaire en milieu de vie constitue un facteur de risque important de démence en fin de vie. En particulier, la rigidité artérielle centrale est étroitement associée à un vieillissement accéléré du cerveau et à un déclin des performances cognitives (Pase et al., 2012 ; Scuteri et al., 2014). De même, la dysfonction endothéliale est associée à l'apparition de troubles cognitifs modérés chez des sujets âgés (Vandemiale et al., 2013) ainsi qu'à une réduction des performances de la mémoire chez des sujets sains d'âge moyen (Gonzales et al., 2010). L'efficacité du débit sanguin cérébral (CBF) dépend de la vasomotricité endothéliale et de la pression sanguine et elle constitue aussi une composante essentielle pour un fonctionnement optimal du cerveau. Les techniques d'imagerie du cerveau ont montré chez l'homme une corrélation entre CBF et la fonction cognitive (Ruitenbergh et al., 2005). Chez l'adulte, une bonne fonction vasculaire favorise aussi la neurogenèse dans l'hippocampe et la néovascularisation, deux phénomènes importants pour la mémoire (Gage, 2000 ; Palmer et al., 2000).

### *1.3 Les phytomicronutriments des produits végétaux bénéfiques pour la santé vasculaire*

Aujourd'hui, il existe de nombreuses preuves épidémiologiques et cliniques des bienfaits d'une consommation élevée de fruits et légumes pour la santé cardiovasculaire. Cependant, **pour rendre plus efficaces et affiner les politiques de santé publique, il est important d'identifier quels sont les constituants protecteurs des produits végétaux.**

Les fruits et légumes présentent plusieurs intérêts, faible densité énergétique, apport de fibres, minéraux et vitamines, mais ils sont aussi sources d'une grande variété de composés bioactifs appelés phytomicronutriments. Sous ce terme, selon les structures chimiques de base, on regroupe les polyphénols, les terpènes, les microconstituants azotés ou soufrés (Figure 2). **Les phytomicronutriments sont définis comme des composés non essentiels pour les processus de croissance et de développement mais qui, en préservant les fonctions de l'organisme tout au long de la vie, permettraient de vieillir en bonne santé plus longtemps** (Holst et Williamson, 2008). Parmi ces phytomicronutriments, les polyphénols sont de loin les plus abondants et les plus consommés. Au cours des dix dernières années, ils ont d'ailleurs fait l'objet d'un fort engouement de l'industrie agro-alimentaire et de la communauté scientifique, avec des résultats qui mettent en exergue les effets santé potentiels associés à ces composés, notamment en lien avec la protection vasculaire (Morand, 2012).

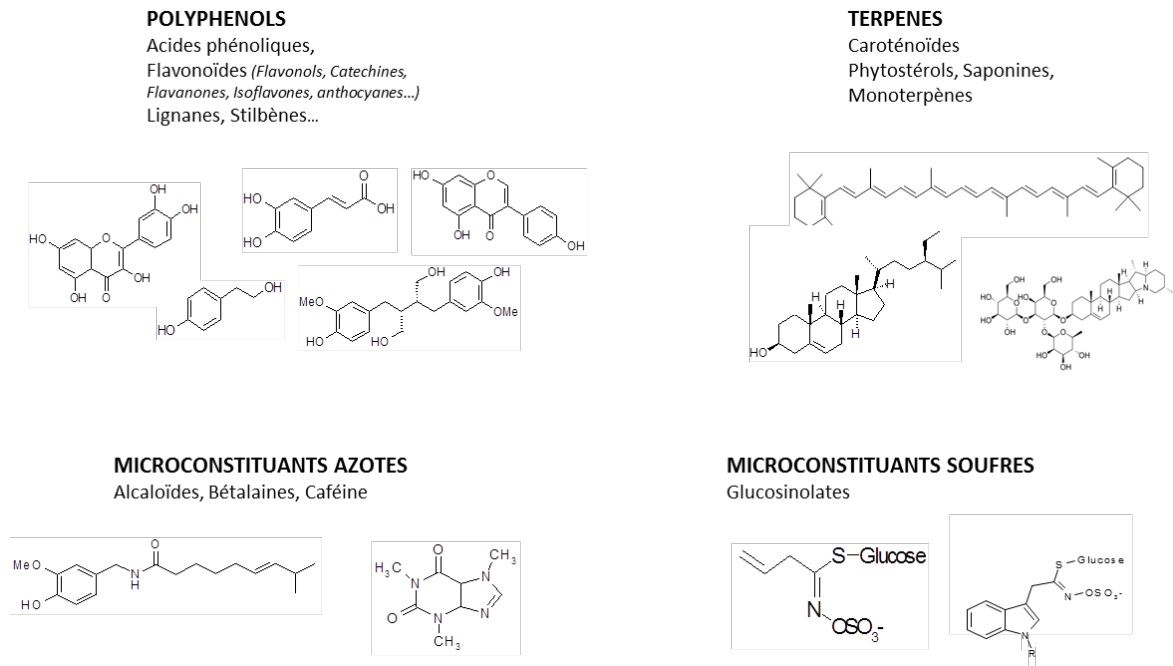


Figure 2 : Structures chimiques typiques des différentes catégories de phytomicronutriments

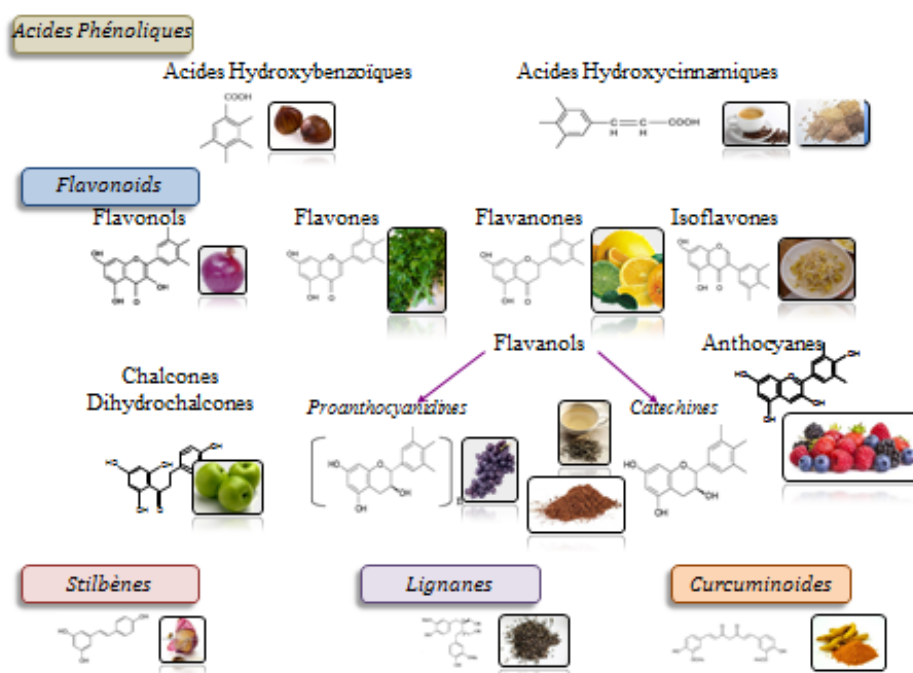
## 2. Intérêt nutritionnel des polyphénols alimentaires en lien avec la protection vasculaire

### 2.1 Les polyphénols alimentaires et leur devenir dans l'organisme

Les polyphénols sont présents exclusivement et en abondance dans tous nos aliments et boissons d'origine végétale. Les teneurs en polyphénols dans les aliments sont affectées par les opérations de fractionnement, raffinage, broyage, fermentation, cuisson, conservation ou maturation qui se traduisent souvent par des réactions d'hydrolyse et d'oxydation des polyphénols. En fonction de leur structure chimique, les polyphénols sont répartis en différentes classes: acides phénoliques, flavonoïdes, lignanes, stilbènes et curcuminoïdes. Les acides phénoliques (café, céréales) et les flavonoïdes sont de loin les plus représentés et les plus abondants dans notre alimentation (Figure 3).

Les flavonoïdes sont les composés pour lesquels les « effets santé » ont été le plus explorés. En fonction de particularités structurales, les flavonoïdes sont répartis en six sous classes: flavanols (fruits, cacao, thé, vin), flavonols (oignon, brocolis, tomate, thé), flavones (tisanes, plantes aromatiques), isoflavones (soja, légumineuses), flavanones (agrumes) et anthocyanes (baies, fruits rouge, vin) (Rodriguez-Matéos et al., 2014). Certaines de ces classes sont spécifiquement présentes dans certaines catégories d'aliments alors que d'autres sont beaucoup plus ubiquitaires.

Les apports qualitatifs et quantitatifs en polyphénols peuvent être très variables selon les habitudes alimentaires. Dans le cadre d'un partenariat entre l'INRA et l'industrie, la base de données Phénol Explorer qui recense les teneurs en polyphénols dans nos aliments a été développée (<http://phenol-explorer.eu/>). L'utilisation de cette base sur une cohorte française a permis d'estimer l'apport moyen en polyphénols à environ 1,2 g/j et la contribution des flavonoïdes à plus de 40% de ces apports journaliers (Perez-Jimenez et al., 2011).



**Figure 3 :** Les différentes familles de polyphénols et leurs principales sources alimentaires

Dans les aliments, les polyphénols sont rarement présents sous forme libre (dite « aglycone ») mais le plus souvent sous forme d'esters (cas des acides phénoliques), de glycosides ou de polymères (cas des flavonoïdes). Ces particularités conditionnent beaucoup l'efficacité de leur absorption (Morand et al., 2012). Ainsi, les polyphénols polymères, les plus abondants dans notre alimentation, ne franchissent pas la barrière intestinale, si bien que leur impact potentiel est limité au tractus digestif. L'absorption des autres formes nécessite l'hydrolyse préalable des liaisons glycosides et esters par le microbiote intestinal. Les formes libres absorbées subissent au niveau intestinal puis hépatique des processus de conjugaison, de sorte que **dans la circulation les polyphénols sont présents sous formes conjuguées**, essentiellement des dérivés méthylés, glucuronidés et sulfatés. D'une façon générale, les taux circulants de polyphénols sont relativement faibles (concentrations maximales allant de 1 à 5  $\mu\text{mol/L}$ ) et ne se maintiennent que par la consommation régulière de produits végétaux, en raison de l'élimination rapide des métabolites plasmatiques (Morand et al., 2012).

L'activité du microbiote vis-à-vis des polyphénols ingérés ne se limite pas à des réactions d'hydrolyse pour permettre leur absorption puisqu'ils peuvent être aussi catabolisés, avec production d'une grande variété de métabolites microbiens (acides aromatiques de petites tailles) ensuite absorbés ou éliminés dans les fèces. Dans certains cas et selon sa composition, le microbiote peut aussi produire des métabolites actifs suite à des réactions de réduction ou de déméthylation. C'est par exemple le cas des lignanes du lin métabolisées par le microbiote en entérodiol et entérolactone, et celui des isoflavones de soja converties en équol. Ces métabolites d'origine microbienne sont reconnus pour leur activité oestrogénique bien supérieure à celle des molécules parents (Morand et al., 2012).

## 2.2 Propriétés biologiques et modes d'action des polyphénols

Historiquement, ce qui a fait la popularité et suscité l'engouement pour les polyphénols alimentaires c'est le fait qu'ils étaient considérés comme des antioxydants puissants, capables de piéger les radicaux libres et ainsi réduire le stress oxydant au niveau de l'organisme. Cette théorie s'appuyait sur la pléthore d'essais *in vitro*, réalisés avec des formes natives de polyphénols jamais retrouvées dans l'organisme et à des concentrations supra-physiologiques. Aujourd'hui, la communauté scientifique s'accorde pour reconnaître que cette théorie est obsolète. Sa remise en cause résulte de la prise en



compte des données essentielles de la biodisponibilité des polyphénols, à savoir leur faible niveau d'absorption couplé à l'intensité de leur métabolisme qui produit des métabolites à potentialité anti-oxydante réduite (Hollman et al., 2011). En effet, **les faibles taux circulants de polyphénols** (maximum quelques  $\mu\text{mol/L}$ ) par rapport à ceux des autres antioxydants endogènes (GSH, acide urique) ou exogènes (Vit E, Vit C) **ne permettent pas d'envisager une action antioxydante directe des polyphénols dans l'organisme**. Ceci toutefois à l'exception du tractus gastro-intestinal où les polyphénols présents en quantité importante peuvent agir en tant que piègeurs de radicaux libres. Aujourd'hui au niveau de l'organisme, **les polyphénols sont perçus comme des molécules « signal »** qui pourraient stimuler les défenses antioxydantes d'une part via l'inhibition des activités enzymatiques pro-oxydantes et d'autre part via la modulation des voies de signalisation intracellulaires contrôlant l'expression des enzymes anti-oxydantes.

Contrairement aux composés pharmacologiques qui agissent spécifiquement via un récepteur ou une voie de signalisation, **les polyphénols ont des modes d'action multi-cibles**. De nombreuses études *in vitro* montrent que les flavonoïdes pourraient affecter leurs cibles biologiques en modulant certaines activités enzymatiques, l'expression de gènes ou bien la signalisation cellulaire, en interagissant avec des récepteurs membranaires ou cellulaires, ou via des régulations épigénétiques (Fraga et Oteiza, 2010). **La diversité de ces mécanismes d'action potentiels explique le large spectre d'activités biologiques des flavonoïdes** observées *in vivo*, parmi lesquelles des activités anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-angiogéniques, anti-prolifératives ou pseudo-estrogéniques : autant d'activités biologiques qui pourraient être potentiellement intéressantes en participant aux effets santé associés à la consommation de produits végétaux (Figure 4).

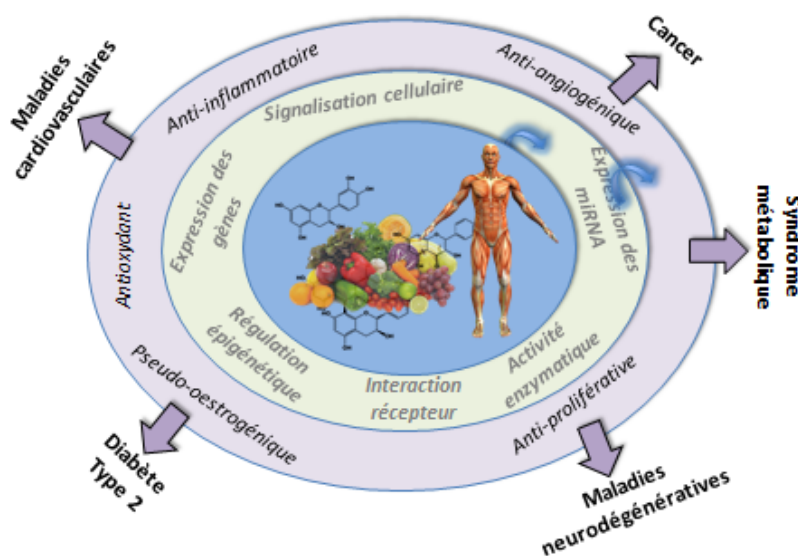


Figure 4: Modes d'action, propriétés biologiques des polyphénols et effets santé potentiels

### 2.3 Les polyphénols : des candidats prometteurs pour la préservation de la santé cardiovasculaire chez l'homme

Si les effets santé des polyphénols semblent concerner un large spectre de maladies chroniques, c'est bien vis à vis de la protection vasculaire que les données épidémiologiques, cliniques, pré-cliniques et mécanistiques sont les plus convergentes et convaincantes (Rodriguez-Mateos et al., 2014). Une récente méta-analyse des études prospectives sur cohortes rapporte **une association inverse entre le niveau de consommation de flavonoïdes spécifiques** (flavanones, anthocyanes, flavonols, flavanols, flavones) **et la mortalité ou le risque de MCV** (Wang et al., 2014). A noter que la plupart de ces



associations sont observées pour des niveaux de consommations de flavonoïdes facilement atteignables dans le cadre d'une alimentation normale.

Un nombre croissant d'essais cliniques contrôlés randomisés examine le rôle des flavonoïdes dans la prévention des MCV, en évaluant leur impact sur des biomarqueurs associés au risque de MCV, pression sanguine, fonction endothéliale, rigidité artérielle, cholestérol sanguin, agrégation plaquettaire (Habauzit et Morand, 2012). Pour l'essentiel, ces études ont été réalisées sur des aliments spécifiques riches en flavonoïdes comme le thé ou le cacao (Morand, 2013), tandis les études portant sur les flavonoïdes des fruits et légumes sont plus rares (Habauzit et al., 2013). De fait, le niveau de preuve clinique varie considérablement selon les classes de flavonoïdes. Ainsi, une méta-analyse de 133 essais cliniques contrôlés randomisés sur les effets d'aliments ou extraits riches en polyphénols sur le risque de MCV a permis de dégager des niveaux de preuves convaincants pour les flavonoïdes du thé vert et ceux du cacao (Hooper et al., 2008). L'analyse de ces données cliniques montrent que la consommation des flavanols du thé vert a un effet bénéfique sur le LDL-cholestérol tandis que celle de cacao riche en flavanols diminue la pression artérielle et améliore la fonction endothéliale, ceci dans des proportions associées à une réduction significative du risque cardiovasculaire global (Morand, 2013). Une relation de cause à effet a été suggérée pour la première fois pour les flavanols du cacao, avec la mise en évidence d'une corrélation positive entre les effets bénéfiques de la consommation de cacao sur la fonction endothéliale et les niveaux plasmatiques de flavanols (Schroeter et al., 2006). L'épicatéchine, le monomère de flavanol majeur du cacao, a été identifié comme l'un des composés actifs directement impliqués dans les effets observés. **Par contre, les données cliniques sont encore insuffisantes pour conclure sur les effets d'autres classes de flavonoïdes apportés par l'alimentation.**

En lien avec la santé cardiovasculaire, des études chez l'animal ont mis en évidence l'impact d'une supplémentation du régime en flavonoïdes pour améliorer le profil des lipides sanguins, augmenter la vasomotricité de l'endothélium, réduire la pression sanguine, ralentir le développement des lésions d'athérosclérose et réduire l'inflammation ou le stress oxydant qui régulent l'homéostasie vasculaire (Del Rio et al., 2012). Ces effets sont variables selon les classes de flavonoïdes, ce qui est à rapprocher des différences structurales entre les classes.

#### *2.4 Limites des connaissances actuelles sur la relation entre polyphénols et protection vasculaire*

La portée des études cliniques disponibles est limitée par le fait que, dans leur quasi-totalité, elles mettent en jeu des aliments ou extraits riches en polyphénols dont la composition est souvent mal caractérisée et sans contrôles adéquats. Dans ces conditions, il n'est pas possible d'établir de lien de causalité entre les effets observés et la consommation des polyphénols d'intérêt (Habauzit et Morand, 2012). D'autres insuffisances méthodologiques sont courantes dans les études publiées, telles une faible puissance, l'absence de double aveugle, un manque de suivi de la compliance, une durée trop courte pour une évaluation clinique pertinente de la fonction vasculaire. A l'avenir, la prise en compte de ces biais est cruciale pour générer des preuves cliniques robustes de l'impact des polyphénols alimentaires sur la fonction vasculaire.

Par ailleurs, les résultats des nombreux travaux sur divers modèles pré-cliniques visant à mettre en évidence leur rôle dans la protection vasculaire, sont particulièrement difficiles à transposer chez l'homme car obtenus dans des conditions non pertinentes sur le plan nutritionnel (doses élevées de polyphénols et mode d'administration inapproprié). De même, pour beaucoup les mécanismes d'action cellulaires et moléculaires proposés pour les polyphénols restent discutables et/ou insuffisants, car basés sur des études *in vitro* réalisées dans des conditions non physiologiques (utilisation de formes natives présentes dans l'aliment mais jamais dans l'organisme, concentrations élevées) et/ou obtenus via des approches ciblées qui ne permettent pas de prendre en compte la complexité de leurs modes d'action. C'est pourquoi, à l'avenir pour appréhender au mieux l'étude des mécanismes d'action des

polyphénols alimentaires, il est nécessaire de prendre en compte les données sur leur biodisponibilité (concentrations circulantes de l'ordre du  $\mu\text{mol/L}$ ) et sur la nature exacte des métabolites circulants (métabolites conjugués, métabolites d'origine microbienne) et de privilégier les approches mécanistiques globales.

### 3. Stratégie de recherche pour démontrer dans un contexte nutritionnel le rôle des polyphénols dans la protection vasculaire

La démonstration et la compréhension du rôle propre des polyphénols dans la préservation de la santé vasculaire nécessitent la conduite d'études cliniques contrôlées et robustes et en parallèle un investissement dans la recherche mécanistique. **C'est dans cette dynamique que s'intègrent les recherches développées par l'Equipe Micronutriments et Santé Cardiovasculaire de l'Unité de Nutrition Humaine de l'INRA.** La finalité de ces recherches est d'apporter des connaissances nouvelles à forte pertinence nutritionnelle/physiologique qui permettront (1) d'élaborer de nouvelles stratégies d'interventions nutritionnelles plus performantes et (2) en identifiant les aliments ou microconstituants particulièrement protecteurs, de développer des aliments fonctionnels pour prévenir ou ralentir les dysfonctionnements vasculaires à l'origine de certaines pathologies chroniques liées au vieillissement (MCV, diabète de type 2, troubles cognitifs).

**Pour démontrer les effets propres des polyphénols d'intérêt sur la fonction vasculaire chez l'Homme, notre démarche est de mettre en place des études d'interventions nutritionnelles contrôlées et randomisées chez l'Homme, dans des conditions expérimentales permettant d'évaluer le rôle des polyphénols d'intérêt au sein de leurs aliments sources.** Ceci implique une caractérisation précise des produits d'étude (ingrédients, aliments) et l'utilisation de contrôles adéquats. Les composés d'intérêt sont identifiés sur la base de leur distribution et teneurs dans les aliments, des niveaux de consommation des aliments sources, de leur biodisponibilité, des propriétés biologiques connues, des données épidémiologiques et cliniques mais aussi de l'absence attendue de toxicité.

L'analyse critique de la pléthore de données obtenues dans des contextes non physiologiques et par des approches réductionnistes ne permet pas de dégager de certitudes, ni d'hypothèses fortes sur les mécanismes d'action des polyphénols. **Pour identifier les mécanismes d'action cellulaires et moléculaires sous-jacents aux effets protecteurs des polyphénols au niveau vasculaire, l'originalité de notre démarche est d'utiliser une approche nutriginomique (transcriptomique) permettant de prendre en compte la multiplicité et l'interconnexion des effets métaboliques induits par la consommation des polyphénols.** Les résultats de ces analyses sont mis en relation avec les mesures histomorphométriques et les paramètres biochimiques liés au risque cardiovasculaire et modulés par la supplémentation du régime en polyphénols chez des modèles murins d'athérosclérose. Le même type d'approche est appliqué aux études cliniques en analysant le transcriptome des leucocytes circulants. Les mécanismes d'actions identifiés dans toutes ces études sont ensuite validés et approfondis *in vitro* sur les modèles cellulaires impliqués dans le contrôle de l'intégrité et de la fonctionnalité vasculaire (cellules endothéliales et monocytes /macrophages). Pour assurer à ces études mécanistiques une forte pertinence physiologique, elles mettent en jeu les métabolites circulants des polyphénols (métabolites conjugués identifiés dans le plasma) à des concentrations atteignables par l'alimentation.

Ainsi, nos travaux ont montré les effets vasoprotecteurs et anti-athérogènes induits par des interventions nutritionnelles avec différents types de polyphénols chez l'Homme et dans des modèles animaux d'athérosclérose. Les effets observés étaient associés à des modifications de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les étapes précoces de la dysfonction vasculaire et l'athérosclérose (Auclair et al., 2009 ; Mauray et al., 2010 ; Chanet et al., 2012 ; Coban et al., 2012 ; Milenkovic et al., 2012). Ces effets nutriginomiques mis en évidence au niveau des leucocytes chez l'Homme et au niveau de l'aorte chez l'animal ont ainsi fait **émerger l'hypothèse d'une action des polyphénols sur**

**les processus cellulaires d'adhésion et de migration transendothéliale. Ces processus régulent les interactions entre monocytes et endothélium qui contrôlent l'intégrité de la paroi vasculaire.** Cette hypothèse d'action a été validée par les résultats des études mécanistiques réalisées sur modèles cellulaires dans des conditions pertinentes sur le plan physiologique. Ces études permettent aussi d'élucider les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la modulation de ces processus cellulaires (Chanet et al., 2013 ; Claude et al., 2014).

La section suivante est consacrée aux résultats des études réalisées à l'INRA sur le rôle des polyphénols des agrumes dans la protection vasculaire, ceci en mettant en œuvre la stratégie de recherche précédemment décrite.

### *3.1 Exemple de résultats marquants : Preuves clinique et pré-clinique du rôle des polyphénols dans les effets des agrumes sur la protection vasculaire et identification des mécanismes d'action.*

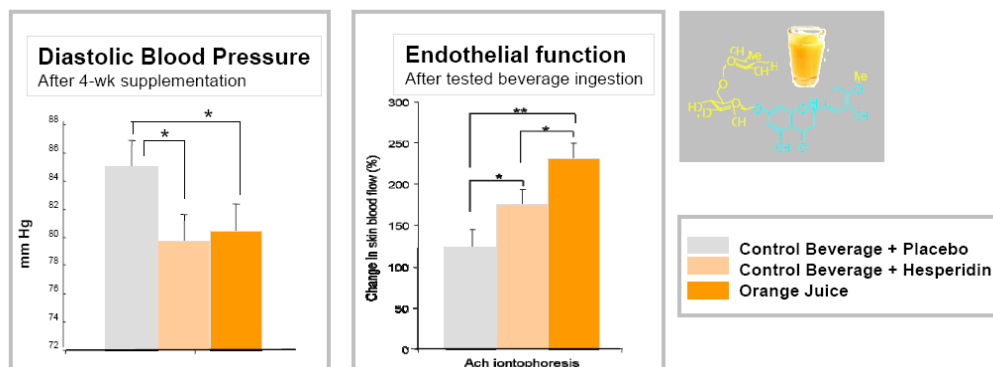
Les agrumes comptent parmi les fruits les plus consommés à travers le monde et ce sont aussi des sources riches et exclusives d'une catégorie particulière de flavonoïdes : les flavanones. Les aglycones de flavanones varient selon les types d'agrumes : l'hespéridine est majoritaire dans l'orange et la clémentine, la naringénine dans le pamplemousse et l'ériodictyol dans le citron. Dans ces fruits ou boissons dérivées, les flavanones sont présentes sous forme de glycosides, qui pour certains donnent un goût amer (par exemple, naringine du pamplemousse) tandis que d'autres sont sans saveur (hespéridine, ériocitrine). Ces composés étant abondants dans les parties solides et comestibles du fruit, leurs teneurs sont nettement plus élevées dans les fruits (150-625 mg/100g) que dans les jus (40-60 mg/100ml) (Chanet et al., 2012b).

Plusieurs études épidémiologiques ont rapporté une relation inverse entre la consommation d'agrumes et la survenue d'événements coronaires ou d'AVC, mais peu d'études ont recherché les associations entre les niveaux d'apports en flavanones et la survenue d'événements cardiovasculaires. D'après les données issues de trois études prospectives conduites sur de larges cohortes américaines ou européennes, des réductions de 15% de la mortalité coronarienne et de 20% de l'incidence des AVC ont été rapportées pour les niveaux d'apports les plus élevés en flavanones (>50 mg/jour) (Morand, 2014). Cependant, les données cliniques sur l'impact des flavanones sur la santé cardiovasculaire sont rares.

Au travers de deux programmes de recherches d'envergure, l'un financé par l'Agence Nationale de la Recherche (PNRA-AGRUVASC) et le second soutenu par le Florida Department of Citrus (FDOC), filière agrume aux Etats-Unis, nous avons produit des **résultats originaux sur le rôle des flavanones des agrumes dans la protection vasculaire et sur les mécanismes d'action mis en jeu au niveau cellulaire et moléculaire** :

- Chez l'homme, **l'hespéridine, le polyphénol majeur de l'orange, contribue aux effets bénéfiques du jus d'orange sur la protection vasculaire.**
- Une étude d'intervention contrôlée a été réalisée chez des hommes sains d'âge moyen et en surpoids, qui ont tous consommé quotidiennement pendant 3 périodes de 4 semaines 500 mL de jus d'orange, 500 mL d'une boisson contrôle + hespéridine ou de 500 mL de boisson contrôle + placebo. L'impact de ces différents traitements sur la pression artérielle et la réactivité endothéliale dans la microcirculation a été recherché en période postprandiale au début de chaque période expérimentale, et à jeun après 4 semaines de supplémentation. Une diminution de la pression artérielle diastolique a été observée après une consommation de 4 semaines de jus d'orange ou boisson contrôle + hespéridine, alors que la réactivité endothéliale mesurée à jeun n'est pas significativement affectée (Figure 5). Par contre, la consommation du jus, tout comme celle d'hespéridine purifiée, induit une augmentation de la vasoréactivité endothéliale en période postprandiale. Ces variations sont positivement corrélées au taux

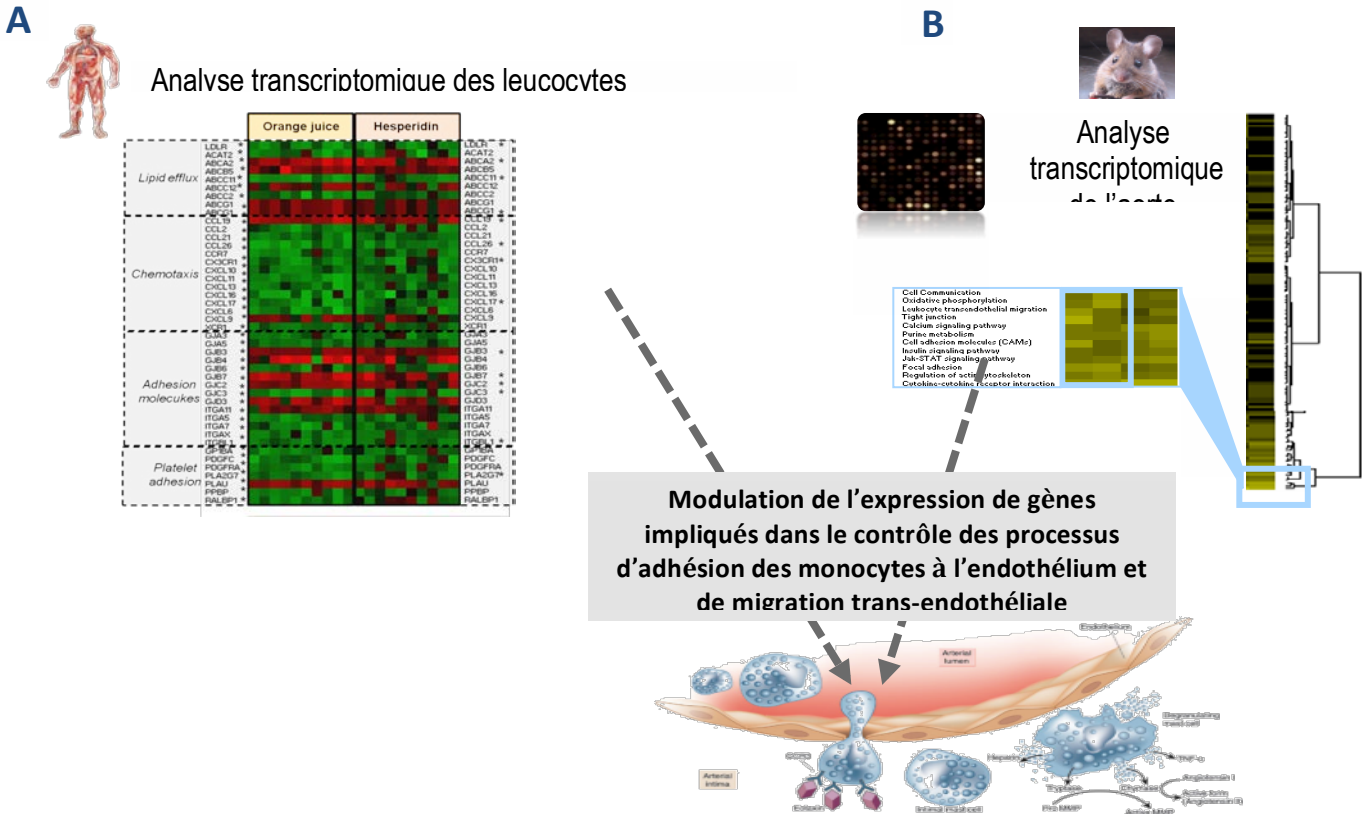
plasmatiques d'hésperidine (Morand et al., 2011).



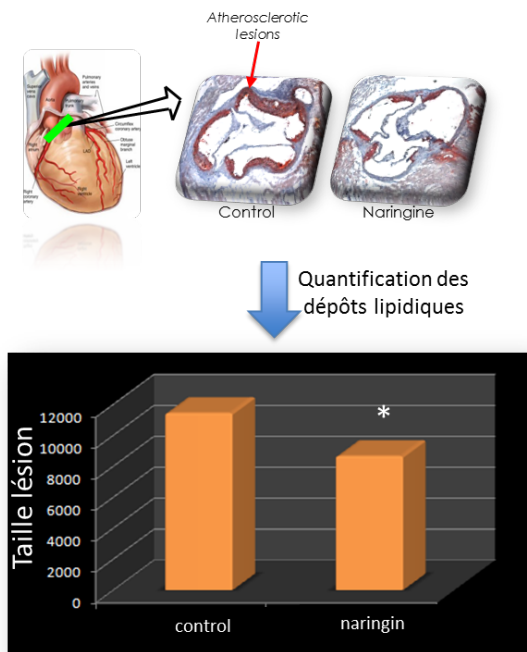
**Figure 5:** Impact du jus d'orange et de l'hésperidine sur la pression artérielle et la réactivité endothéliale chez l'homme (Morand et al., 2011)

- L'analyse nutriginomique réalisée sur les leucocytes isolés du sang des volontaires à la fin de chacune des périodes expérimentales a montré que la consommation d'hésperidine induit aussi d'importantes modifications du profil transcriptomique des leucocytes (Milenkovic et al., 2012). Une grande majorité des gènes modulés par l'exposition à l'hésperidine est également régulée par le jus d'orange. Ces gènes sont impliqués dans les processus d'interactions entre leucocytes et cellules endothéliales (chimiotaxie, adhésion, migration trans-endothéliale), et aussi dans les processus de contrôle de l'efflux de cholestérol. **Ainsi, la consommation d'hésperidine comme celle de jus d'orange oriente le profil d'expression génique des leucocytes vers un profil anti-inflammatoire et anti-athérogène** qui suggère une moindre infiltration des cellules immunitaires circulantes dans la paroi vasculaire et par conséquent la préservation de l'intégrité de l'endothélium vasculaire (Figure 6A).
- **Chez la souris nourrie avec un régime athérogène, la supplémentation avec une dose nutritionnelle de naringine**, le polyphénol majoritaire du pamplemousse, **réduit significativement la progression de la lésion athéromateuse (-30%)** (Figure 7). Cet effet anti-athérogène est associé à une diminution du cholestérol plasmatique, à une réduction des biomarqueurs de la dysfonction endothéliale et à une amélioration de la sensibilité à l'insuline. **Par une approche transcriptomique au niveau de l'aorte des animaux, nous avons montré qu'une forte proportion des gènes différentiellement exprimés en réponse à la naringine est impliquée dans les processus qui contrôlent l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et la migration trans-endothéliale**, deux étapes clés et précoces du développement de l'athérosclérose (Chanet et al., 2012a) (Figure 6B).
- **In vitro, les métabolites de naringénine et d'hésperétine, ceux présents dans le plasma humain après consommation d'agrumes, diminuent l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales exposées à des conditions inflammatoires.** Cet effet s'accompagne aussi de modifications de l'expression génique au niveau endothélial en réponse aux métabolites de flavanones. Les variations d'expression observées suggèrent une réduction du recrutement des monocytes au niveau de l'endothélium vasculaire. L'ensemble de ces données *in vitro* est en parfaite cohérence avec les résultats des études nutriginomiques chez l'homme (leucocytes) et chez l'animal (aorte) après consommation de flavanones. En effet, la moindre adhésion des monocytes aux cellules endothéliales observée *in vitro* valide l'hypothèse d'un effet bénéfique des flavanones pour réduire les phénomènes à l'origine des

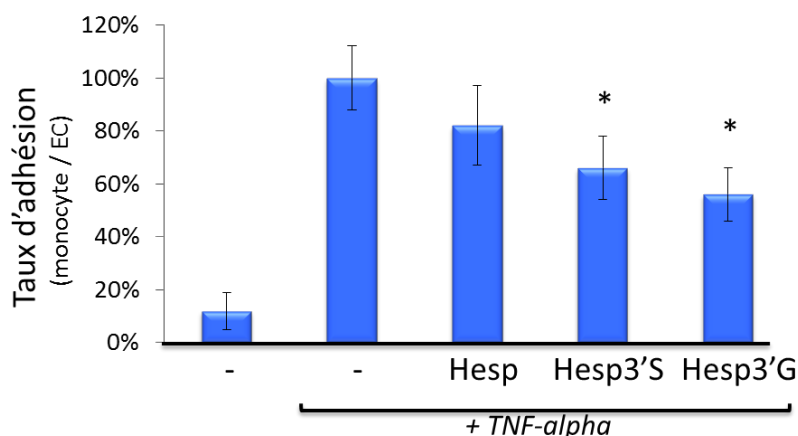
dysfonctionnements vasculaires précoces qui initient le développement de l'athérosclérose (Chanet et al., 2013) (Figure 8).



**Figure 6:** Analyses des profils d'expression des gènes: au niveau des cellules blanches chez l'homme après consommation de jus d'orange ou d'héspéridine (A) ; au niveau de l'aorte chez des souris modèles d'athérosclérose supplémentées avec une dose nutritionnelle de naringine (B). (Milenkovic et al., 2011; Chanet et al., 2012).



**Figure 7:** Impact d'une supplémentation du régime avec une dose nutritionnelle de naringine sur le développement des lésions athéromateuses chez les souris ApoE<sup>-/-</sup> (Chanet et al., 2013).



Hesp: hespéridine ; Hesp3'S: hespéridine-3'sulfate; Hesp3'G: hespéridine-3'glucuronide

**Figure 8:** Impact d'une exposition des monocytes et des cellules endothéliales aux métabolites circulants de l'hespéridine sur le processus d'adhésion cellulaire dans des conditions de stress inflammatoire induit par le TNF-alpha (Chanet et al., 2013).

En démontrant que les flavanones sont largement responsables de l'effet bénéfique des agrumes sur la protection vasculaire et en expliquant leurs mécanismes d'action, ces travaux sont importants à plusieurs titres : (1) pour l'élaboration de recommandations nutritionnelles sur la consommation d'agrumes en prévention des MCV, (2) pour sensibiliser les pouvoirs publics, industriels et consommateurs à la diversité des effets santé des phytomicronutriments, et donc à leur intérêt sur le plan nutritionnel, (3) pour alerter les producteurs d'agrumes et les industriels de la filière sur l'importance de produire des fruits et des jus à haute qualité nutritionnelle, d'une part en sélectionnant des variétés de fruits naturellement riches en flavanones, et d'autre part en utilisant des procédés de transformation qui préservent et optimisent les teneurs en flavanones.

## Conclusion

Les grandes fonctions de l'organisme se développent au cours des premières années de vie, atteignent un pic au début de l'âge adulte et déclinent naturellement ensuite. Le rythme de ce déclin est déterminé, au moins en partie, par notre comportement et notre exposition aux risques tout au long de notre vie, qu'il s'agisse de l'alimentation, de l'activité physique ou de l'exposition aux risques sanitaires (tabac, alcool, drogue). Les effets santé d'une alimentation riche en produits végétaux font consensus (Katz et Meller, 2014). Cependant, pour optimiser ces effets bénéfiques, il est important d'identifier les nutriments, micro-nutriments ou-constituants actifs. La particularité des aliments d'origine végétale est d'être des sources riches et exclusives d'une grande diversité de composés bioactifs qui participent à leurs effets santé. Si les phytomicronutriments ne sont pas essentiels pour la croissance et le développement des grandes fonctions de l'organisme, ils pourraient jouer un rôle déterminant dans le maintien de la santé ou de la réduction du risque de maladie à l'âge adulte et au cours du vieillissement. *In fine*, cela signifie qu'ils pourraient être indispensables pour augmenter la qualité de vie en réduisant l'incidence des maladies chroniques liées à l'âge, et à cet égard participer au concept du « bien vieillir en bonne santé » (Holst et Williamson, 2008).

Les polyphénols sont les composés bioactifs majeurs de nos aliments d'origine végétale. Un nombre croissant de données épidémiologiques, cliniques et mécanistiques soutiennent l'hypothèse selon

laquelle la consommation d'aliments et boissons riches en polyphénols préserve la fonction vasculaire et pourrait ainsi contribuer à la réduction des maladies cardiovasculaires. Ces composés agiraient en améliorant certains facteurs de risque associés au développement de ces pathologies (cholestérolémie, pression artérielle, fonction endothéliale, rigidité artérielle, fonction plaquettaire) (Habauzit et Morand, 2012). Les larges efforts de recherche clinique et expérimentale engagés sur les polyphénols du cacao et du thé, souvent soutenus par l'industrie, ont donné des résultats convaincants. Cependant, pour les autres catégories de polyphénols de notre alimentation, les preuves cliniques sont loin d'être suffisantes, parce que très rares ou bien souvent critiquables en raison de la faiblesse de leur méthodologie.

Par conséquent, des essais cliniques robustes, contrôlés randomisés et sur le long terme avec des aliments riches en polyphénols mais aussi avec des molécules purifiées sont nécessaires pour démontrer le rôle propre d'autres catégories de polyphénols dans les effets de leurs aliments sources sur la protection vasculaire. En parallèle, en couplant approches nutriginomiques et ciblées afin de considérer la complexité de leurs effets biologiques, il est important d'identifier au niveau cellulaire et moléculaire les mécanismes d'action des polyphénols en lien avec leurs effets sur la fonction vasculaire.

Ces recherches sont déterminantes (1) pour établir des recommandations nutritionnelles sur des couples aliments/polyphénols d'intérêt pour la santé vasculaire, avec des implications attendues sur l'incidence des MCV, du diabète de type 2 et du déclin cognitif et (2) pour développer et proposer aux consommateurs des aliments à forte qualité nutritionnelle pour préserver la santé vasculaire, via l'optimisation ou la préservation de la qualité des produits d'origine (teneurs en polyphénols) ou la formulation de nouveaux aliments fonctionnels. Selon les cas, ces nouvelles recommandations nutritionnelles ou nouveaux aliments fonctionnels pourront s'adresser à la population générale ou bien à des groupes ciblés.

### Références bibliographiques

- Auclair S., Milenkovic D., Besson C., Chauvet S., Gueux E., Morand C., Mazur A., Scalbert A., 2009. Catechin reduces atherosclerotic lesion development in apo E-deficient mice: a transcriptomic study. *Atherosclerosis* 204, e21-7.
- Bangen K.J., Nation D.A., Clark L.R., Harmell A.L., Wierenga C.E., Dev S.I., Delano-Wood .L., Zlatar Z.Z., Salmon D.P., Liu T.T., Bondi M.W., 2014. Interactive effects of vascular risk burden and advanced age on cerebral blood flow. *Front Aging Neurosci.* 6,159
- Chanet A., Milenkovic D., Manach C., Mazur A., Morand C., 2012. Citrus flavanones: what is their role in cardiovascular protection? *J Agric Food Chem.* 60, 8809-8822.
- Chanet A., Milenkovic D., Claude S., Maier J.A., Kamran Khan M., Rakotomanomana N., Shinkaruk S., Bérard A.M., Bennetau-Pelissero C., Mazur A., Morand C., 2013. Flavanone metabolites decrease monocyte adhesion to TNF- $\alpha$ -activated endothelial cells by modulating expression of atherosclerosis-related genes. *Br J Nutr.* 110, 587-98.
- Claude S., Boby C., Rodriguez-Mateos A., Spencer J.P., Gérard N., Morand C., 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. *Mol Nutr Food Res.* May 58(5), 1016-1027.
- Coban D., Milenkovic D., Chanet A., Khallou-Laschet J., Sabbe L., Palagani A., Vanden Berghe W., Mazur A., Morand C., 2012. Dietary curcumin inhibits atherosclerosis by affecting the expression of genes involved in leukocyte adhesion and transendothelial migration. *Mol Nutr Food Res.* 56, 1270-1281.
- Del Rio D., Rodriguez-Mateos A., Spencer J.P., Tognolini M., Borges G., 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.



- European Cardiovascular Disease Statistics 2012 edition, 2012. European Heart Network and European Society of Cardiology, European Heart Network AISBL
- Fraga C.G., Galleano M., Verstraeten S.V., Oteiza P.I., 2010. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med.* 31, 435-445.
- Gage F.H., 2000. Structural plasticity: cause, result, or correlate of depression. *Biol Psychiatry.* 48, 713-714.
- Gonzales M.M., Tarumi T., Tanaka H., Sugawara J., Swann-Sternberg T., Goudarzi K., Haley A.P., 2010. Functional imaging of working memory and peripheral endothelial function in middle-aged adults. *Brain Cogn.* 73, 146-151.
- Gorelick P.B., Scuteri A., Black S.E., Decarli C., Greenberg S.M., Iadecola C., Launer L.J., Laurent S., Lopez O.L., Nyenhuis D., Petersen R.C., Schneider J.A., Tzourio C., Arnett D.K., Bennett D.A., Chui H.C., Higashida R.T., Lindquist R., Nilsson P.M., Roman G.C., Sellke F.W., Seshadri S., 2011. American Heart Association Stroke Council, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 42, 2672-2713
- Habauzit V., Morand C., 2012. Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians. *Ther Adv Chronic Dis.* 3, 87-106
- Hollman P.C., Cassidy A., Comte B., Heinonen M., Richelle M., Richling E., Serafini M., Scalbert A., Sies H., 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
- Holst B., Williamson G., 2008. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr Opin Biotechnol.* 19, 73-82.
- Hooper L., Kroon P.A., Rimm E.B., Cohn J.S., Harvey I., Le Cornu K.A., Ryder J.J., Hall W.L., Cassidy A., 2008. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 88, 38-50.
- Katz D.L., Meller S., 2014. Can we say what diet is best for health? *Annu Rev Public Health.* 35, 83-103.
- Libby P., 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 420, 868-74.
- Mathers C.D., Loncar D., 2006. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 3, e442.
- Mauray A., Felgines C., Morand C., Mazur A., Scalbert A., Milenkovic D., 2010. Nutrigenomic analysis of the protective effects of bilberry anthocyanin-rich extract in apo E-deficient mice. *Genes Nutr.* 5, 343-353.
- Milenkovic D., Deval C., Dubray C., Mazur A., Morand C., 2011. Hesperidin displays relevant role in the nutrigenomic effect of orange juice on blood leukocytes in human volunteers: a randomized controlled cross-over study. *PLoS One.* 6, e26669.
- Morand C., Dubray C., Milenkovic D., Lioger D., Martin J.F., Scalbert A., Mazur A., 2011. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr.* 93, 73-80.
- Morand C., 2012. Microconstituants bioactifs des végétaux et prévention de l'athérosclérose. In : *Les Phytomicronutriments - Strigler F., Coxam V., Amiot M.J. (Eds), TEC & DOC / Lavoisier éditions*, pp. 207-214
- Morand C., Rabot C., Thomas M., Siess M.H., Borel P., 2012. Biodisponibilité et métabolisme des microconstituants bioactifs des végétaux In : *Les Phytomicronutriments - Strigler F., Coxam V., Amiot M.J. (Eds), TEC & DOC / Lavoisier éditions*, 49-72.
- Morand C., 2013. Les polyphénols du thé et du cacao ont-ils des effets santé? *Phytothérapie* 11, 92-99.
- Morand C., 2014. Intérêt des aliments riches en flavonoïdes pour le maintien de la santé cardio-métabolique. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 8, 477-482.

- Palmer T.D., Willhoite A.R., Gage F.H., 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* 425, 479-494
- Pase M.P., Herbert A., Grima N.A., Pipingas A., O'Rourke M.F., 2012. Arterial stiffness as a cause of cognitive decline and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Intern Med J.* 42, 808-815.
- Pérez-Jiménez J., Fezeu L., Touvier M., Arnault N., Manach C., Hercberg S., Galan P., Scalbert A., 2011. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am J Clin Nutr.* 93, 1220-1228.
- Rodriguez-Mateos A., Vauzour D., Krueger C.G., Shanmuganayagam D., Reed J., Calani L., Mena P., Del Rio D., Crozier A., 2014. Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Arch Toxicol.* 2014. 88, 1803-1853.
- Ruitenbergh A., den Heijer T., Bakker S.L., van Swieten J.C., Koudstaal P.J., Hofman A., Breteler M.M., 2005. Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: the Rotterdam Study. *Ann Neurol.* 57, 789-794.
- Schroeter H., Heiss C., Balzer J., Kleinbongard P., Keen C.L., Hollenberg N.K., Sies H., Kwik-Urbe C., Schmitz H.H., Kelm M., 2006. Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 1024-1029.
- Scuteri A., Wang H., 2014. Pulse wave velocity as a marker of cognitive impairment in the elderly. *J Alzheimers Dis.* 42, S401-410.
- Vendemiale G., Romano A.D., Dagostino M., de Matthaëis A., Serviddio G., 2013. Endothelial dysfunction associated with mild cognitive impairment in elderly population. *Aging Clin Exp Res.* 25, 247-255.
- Wang X., Ouyang Y., Liu J., Zhu M., Zhao G., Bao W., Hu F.B., 2014. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ.* 349, g4490
- Wang X., Ouyang Y., Liu J., Zhao G., 2014. Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Br J Nutr.* 111,1-11.
- Widlansky M.E., Gokce N., Keaney J.F. Jr, Vita J.A., 2003. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 42, 1149-1160.