



Les listes de contenu sont disponibles sur
ScienceDirect

Nutrition



Recherche nutritionnelle de base

La spiruline enrichie en silicium alimentaire améliore les marqueurs précoces de l'athérosclérose chez les hamsters suivant un régime riche en graisses



Joris VidéPh.D. ^a, Anne Virsolvy Ph.D. ^b, Cindy Romain Ph.D. ^a, Jeanne Ramos Ph.D. ^c, Nicolas Jouy Ph.D. ^d, Sylvain Richard Ph.D. ^b, Jean-Paul Cristol Ph.D. ^a, Sylvie Gaillet Ph.D. ^a, Jean-Max Rouanet Ph.D. ^{a,*}

^a Nutrition et Métabolisme, UMR 204 NUTRIPASS, Prévention de la malnutrition et des pathologies liées, Université de Montpellier, Montpellier, France

^b INSERM U1046, Université de Montpellier, Montpellier, France

^c Anatomie-Pathologie, Centre hospitalier-universitaire Guy de Chauliac, Montpellier, France

^d Phyco-Biotech, Rue Maurice Bfart, Montpellier, France

Informations sur l'article

Historique de l'article :

Reçu le 23 décembre 2014

Accepté le 25 mars 2015

Mots-clés :

Hamsters

Athérosclérose

Stress oxydatif

Inflammation du foie

Spiruline enrichie en silicium

Résumé

Objectif : cette étude visait à étudier les effets de la spiruline alimentaire enrichie en silicium (SES) sur l'athérosclérose.

Méthodes : des hamsters (six par groupe) suivant un régime riche en graisses (HF) recevaient quotidiennement de la SES ou de la spiruline non enrichie (57 mg/kg de poids corporel dans les deux cas). Cela correspondait à 0,57 mg de silicium/kg de poids corporel par jour. **Résultats :** le régime HF a induit une dyslipidémie, une résistance à l'insuline, un stress oxydatif et un dysfonctionnement vasculaire. Par rapport au groupe HF, la SES a atténué les augmentations de la lipidémie et a empêché l'insulinorésistance (IR) ($P = 0,001$). La SES a protégé contre le stress oxydatif en réduisant l'activité de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase du cœur ($P = 0,006$) et du foie ($P < 0,0001$) et en épargnant l'activité de la superoxyde dismutase ($P = 0,0017$) et de la glutathion peroxydase ($P = 0,01861$). La SES a diminué l'inflammation, en abaissant les niveaux de facteur de nécrose tumorale- α ($P = 0,0006$) et d'interleukine 6 ($P = 0,0112$), en diminuant les cellules polymorphonucléaires et en empêchant l'activité du facteur nucléaire- κ B ($P = 0,0259$). La SES a corrigé le niveau plasmatique de la protéine 1 chimio-attractrice monocyttaire ($P = 0,0380$), qui a été augmenté par le régime HF. Enfin, la supplémentation en SES a permis de prévenir les fonctions vasculaires et endothéliales évaluées respectivement par la réponse contractile à l'agoniste phényléphrine et la relaxation induite par l'acétylcholine.

Conclusion : la SES protège contre le déséquilibre métabolique, l'inflammation, le stress oxydatif et les dysfonctionnements vasculaires induits par un régime alimentaire HF, et pourrait prévenir les processus athérogènes. Des effets synergiques entre la spiruline et le silicium ont été observés.

© 2015 Elsevier Inc. Tous droits réservés.

Introduction

La cyanobactérie *Spirulina platensis* est commercialement disponible pour la consommation humaine. Elle représente l'une des sources

de protéines d'origine végétale les plus riches (60-70 %), de lipides (7 %) et d'hydrates de carbone (20 %) et constitue une bonne source de vitamines et de minéraux tels que le calcium, le magnésium, le phosphore, le potassium, le sodium et le zinc [1]. Cette microalgue est l'une des sources de nutriments les plus puissantes et est utilisée comme supplément alimentaire nutraceutique [2] sans effets secondaires toxiques [3], bien qu'il n'y ait pas suffisamment de preuves scientifiques pour recommander une supplémentation chez l'homme. La spiruline est particulièrement adaptée à la production de composés bioactifs et d'éléments nutritionnels spécifiques qu'elle est capable d'accumuler sous une forme biotransformée de manière organique. Plusieurs rapports ont décrit l'enrichissement réussi de la biomasse de spiruline en sélénium [4], en fer ou en chrome. Ainsi, de nouveaux types de suppléments alimentaires ont été développés et pourraient constituer une source riche d'oligo-éléments [5]. Comme cela a été signalé précédemment, il existe

J.V. a été soutenu par une subvention CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la Recherche, n° 0084/2012) de Phyco-Biotech (Montpellier, France) et de l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie. N.J. est un employé de Phyco-Biotech R&D. J.V., A.V., C.R., N.J., J.R., S.G. et J-M.R. ont contribué à la production, la collecte, l'assemblage, l'analyse et l'interprétation des données. J.V., A.V., J-P.C., S.R., S.G. et J-M.R. ont contribué à la rédaction et à la révision du manuscrit. Tous les auteurs ont approuvé la version finale du manuscrit. S.G. et J-M.R. ont contribué à parts égales à ce travail.

* Correspondance avec l'auteur. Tél./fax : þ33 467-143-521.

Adresse électronique : jm.rouanet@univ-montp2.fr (J.-M. Rouanet).

de nombreuses preuves

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2015.03.014>

0899-9007/© 2015 Elsevier Inc. Tous droits réservés.

indiquant que le silicium peut être un nutriment essentiel pour les animaux supérieurs, y compris les humains [6].

Le silicium se trouve naturellement sous des formes insolubles mais non biodisponibles. La principale forme soluble est l'acide orthosilicique $\text{Si}(\text{OH})_4$, qui a tendance à se polymériser à haute concentration (>2 mM Si), correspondant à la forme absorbée par l'homme soit dans l'eau potable et les aliments, soit apparaissant après l'hydrolyse des nutriments dans l'intestin [7]. Bien que les véritables carences alimentaires soient inconnues, un manque de diversification alimentaire et une faible consommation de fruits et légumes pourraient entraîner une couverture insuffisante des besoins en silicium. En général, les principales sources alimentaires de silicium sont les bananes, les céréales et la bière [8,9]. Chez l'homme, l'apport quotidien est d'environ 20 à 50 mg et le corps en a besoin de 9 à 14 mg/jour [10,11].

L'importance biologique du silicium doit être considérée dans le contexte de sa répartition dans le corps. Les concentrations les plus élevées se trouvent dans les os et les tissus conjonctifs tels que l'aorte, la trachée, les tendons et la peau, où le silicium apparaît comme un acteur dans les processus de renouvellement par la synthèse du collagène et de l'élastine [6]. Il a été rapporté que la supplémentation en silicium avait des effets bénéfiques sur ces tissus, en particulier sur les os [12] et la peau [13]. En revanche, la carence en silicium a été associée à des effets néfastes sur la minéralisation et la croissance des os [14] ainsi que sur l'élasticité et la cicatrisation de la peau [6]. L'importance du silicium a également été démontrée dans la physiopathologie cardiovasculaire et en particulier dans la prévention de l'athérosclérose [15]. Des études ont montré une relation inverse entre l'ingestion de silicium et le développement de l'athérosclérose [16,17]. De plus, la supplémentation en silicium réduit l'hypertension et augmente l'expression des gènes antihypertenseurs et antiathérogènes dans l'aorte des rats spontanément hypertendus [18].

Ainsi, l'incorporation de silicium dans la spiruline pourrait être un moyen de produire un supplément alimentaire biodisponible. Ainsi, en cohérence avec les effets bénéfiques du silicium et les propriétés antioxydantes, hypolipidémiques et anti-inflammatoires de la spiruline [19], nous nous sommes concentrés sur un modèle d'athérosclérose précoce pour évaluer les effets d'une supplémentation en spiruline enrichie en silicium (SES). Nous avons évalué les effets préventifs bénéfiques potentiels de la SES sur certains troubles et dysfonctionnements majeurs induits par un régime alimentaire riche en graisses (HF) dans le modèle du hamster doré.

Matériels et méthodes

Animaux, régimes alimentaires et

conception expérimentale Production

des matériels

Pour produire la SES, la spiruline (PhycoBiotech, Lunel, France) a été cultivée dans un photobioréacteur de 130 L sous éclairage continu sur le milieu de Zarrouk à 22°C et pH 10,5 en présence de 1 g/L de métasilicate de sodium ($\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si}$). Ce milieu contenait du NaHCO_3 , 16,8 g/L ; K_2HPO_4 , 0,5 g/L ; NaNO_3 , 2,5 g/L ; K_2SO_4 , 1,0 g/L ; NaCl , 1,0 g/L ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L ; CaCl_2 , 0,04 g/L ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L ; EDTA, 0,08 g/L ; H_3BO_3 , 2,86 mg/L ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 220 mg/L ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 79 mg/L ; MoO_3 , 15 mg/L ; et Na_2MoO_4 , 21 mg/L, et recevait une légère aération (30 l/min) et un ajout de 0,03 % de CO_2 . À la fin de la culture, la biomasse a été récupérée et filtrée à travers une membrane de 20 mm, puis lavée soigneusement avec de l'eau distillée, congelée et lyophilisée. La SES obtenue contenait 1 % de silicium, alors que la spiruline ordinaire contenait $<0,023$ % de silicium (limite inférieure de détection), comme indiqué par le fabricant.

Élevage et entretien des animaux

Vingt-quatre hamsters doré syrien sevrés (Janvier-Labs, Le Genest-St-Isle,

France), pesant chacun **90 g**, ont été répartis aléatoirement en quatre groupes de six animaux (six animaux par cage plastique). Ils ont été logés à $23 \pm 1^\circ\text{C}$, soumis à un cycle lumière/obscurité de 12 heures et manipulés conformément aux règles de l'Union européenne et selon les directives des National Institutes of Health [20] et du Comité de protection des animaux de l'Université de Montpellier (France) (numéro d'autorisation C 34 249).

Conception des protocoles pour les animaux

Trois groupes ont reçu un régime athérogène HF (HFD), composé de 200 g/kg de caséine, 3 g/kg de L-méthionine, 393 g/kg d'amidon de maïs, 154 g/kg de saccharose, 50 g/kg de cellulose, 100 g/kg d'huile de noix de coco hydrogénée, 2 g/kg de cholestérol, 35 g/kg de mélange de minéraux et 10 mg/kg de mélange de vitamines, pendant 12 semaines. À titre de référence, un quatrième groupe a reçu un régime alimentaire standard (STD) composé de 236 g/kg de caséine, 3,5 g/kg de L-méthionine, 300 g/kg d'amidon de maïs, 30 g/kg de maltodextrine 10, 290,5 g/kg de saccharose, 50 g/kg de cellulose, 45 g/kg d'huile végétale, 35 g/kg de mélange de minéraux et 10 g/kg de mélange de vitamines. Dans les deux régimes, les mélanges de minéraux et de vitamines ont été formulés conformément aux directives de l'American Institute of Nutrition-93 [21]. Les cinq groupes avaient libre accès à la nourriture et à l'eau du robinet, qui contenait <0,023 % de silicium (limite inférieure de détection).

Les hamsters de chaque groupe ont reçu quotidiennement par gavage 1 ml soit d'eau du robinet (groupes STD et HFD), soit de spiruline brute (Sp) en suspension dans l'eau du robinet à 57 mg/kg de poids corporel (groupe HF-Sp), soit de la SES en suspension dans l'eau du robinet à 57 mg/kg de poids corporel (groupe HF-SES). La concentration de spiruline a été déterminée selon une étude antérieure [22] et sa teneur en silicium (1%), et correspondait à un apport quotidien de 40 mg pour une personne de 70 kg [23].

Procédures

analytiques

Analyse du plasma

À la fin de la période expérimentale, des échantillons de sang ont été prélevés à jeun par ponction cardiaque. Le plasma a été préparé par centrifugation à 2 000 g pendant 10 min. Le cholestérol total et le cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL-C) ont été déterminés dans le plasma (10 ml) à l'aide de kits enzymatiques (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Royaume-Uni) selon le fabricant ; le HDL-C a été mesuré après précipitation du cholestérol des lipoprotéines de très basse et de basse densité (LDL-C) à l'aide d'un réactif phosphotungstique. Les triacylglycérols et les taux de glucose ont été mesurés dans le plasma (10 ml) à l'aide d'un kit enzymatique Randox et de réactifs de la société Thermo Electron Corporation (Cergy Pontoise, France), respectivement. L'activité de la paraoxonase (PON) a été déterminée en utilisant le paraoxone comme substrat et mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 412 nm, comme décrit précédemment [24]. L'insulinémie (10 ml de plasma) a été déterminée à l'aide de kits de dosage immunoenzymatique (ELISA) (Mer-codia AB, Uppsala, Suède). La concentration en protéine chimio-attractrice des monocytes du plasma (MCP)-1 a été mesurée à l'aide d'un kit ELISA spécifique selon le fabricant (R&D Systems, Europe, Lille, France) et de 100 ml de plasma.

L'évaluation du modèle homéostatique de l'insulinorésistance (HOMA-IR) a été déterminée à partir des valeurs à jeun de l'insuline et du glucose, comme décrit précédemment [25] et selon :

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \frac{\Sigma \text{glucose à jeun} \text{ mmol/L} \times \Sigma \text{insuline à jeun} \text{ mU/L}}{22:5}$$

Anatomo-pathologie du foie

Le foie a été excisé ; certains échantillons ont été prélevés pour l'histologie, tandis que d'autres ont été conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation ultérieure. Pour l'analyse pathologique, des échantillons de foie ont été fixés dans un tampon neutre à 10 % de formaldéhyde et enrobés de paraffine, et des sections en série de 3 mm d'épaisseur ont été préparées. Les sections ont été déparaffinées et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine.

Activité des enzymes antioxydantes du foie

Des échantillons de foie non fixés ont été homogénéisés (5 %, p/v) dans un tampon de phosphate de potassium 0,1 mol/L (pH 7,4) et l'homogénat a été centrifugé à 13 000 g pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant a ensuite été stocké à -80 °C pour l'analyse ultérieure de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la glutathion peroxydase (GPx) à l'aide de kits commerciaux (Randox Laboratories LTD, Crumlin, Royaume-Uni), et pour quantifier les niveaux de facteur de nécrose tumorale hépatique (TNF)- α et d'interleukine (IL)-6 à l'aide des kits ELISA spécifiques conformément aux instructions du fabricant (R&D Systems Europe, Lille, France).

Inflammation du foie

Pour tester l'activité du facteur nucléaire (NF)- κ B, le tissu hépatique a été homogénéisé (7,5 % p/v) dans un tampon hypotonique (pH 7,9) contenant 20 mM de HEPES, 10 mM d'EDTA, 10 mM de KCl, 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéase, 0,1 % de dithiothréitol et 0,1 % d'Igepal. Des extraits nucléaires ont ensuite été obtenus en homogénéisant le culot dans un tampon de lyse (pH 7,9) contenant 20 mM de HEPES, 1 mM d'EDTA, 200 mM de NaCl, 10 % de glycérol, 1 mM de dithiothréitol et 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéase. L'activité du NF- κ B a été déterminée à partir d'extraits nucléaires à l'aide d'un kit de dosage immunologique commercial (Active

Stress oxydatif hépatique et cardiaque

La production d'anions superoxydes hépatiques et cardiaques ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a été évaluée par l'intensité de la chimiluminescence améliorée par lucigénine (10 mM de lucigénine) comme décrit précédemment [24]. Les résultats ont été exprimés en unités relatives de luminescence/mg de protéine.

Réactivité vasculaire

L'aorte thoracique a été utilisée pour étudier ex vivo les réponses aux agonistes ou aux antagonistes de la contraction artérielle. Immédiatement après le prélèvement, les tissus artériels ont été immergés dans un tampon salin phosphaté, d'un pH de 7,4, contenant (en mM) 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 0,5 KH₂ PO₄, Na₂ HPO₄, 2,5 CaCl₂, 10 HEPES et 10 glucose. Le tissu aortique a été débarrassé de la graisse et du tissu conjonctif et coupé en anneaux de 2 à 3 mm de large. Des anneaux aortiques ont été montés dans des chambres standard de bain d'organes (EMKA Technologies, Paris, France), maintenus à 37 °C et barbotés en continu avec de l'O₂, puis les changements de tension isométrique ont été enregistrés comme décrit précédemment [25]. Chaque segment artériel a été soumis à une période d'équilibre de 60 minutes à la tension basale optimale pré-déterminée de 1 g. La fonction contractile de chaque segment a été évaluée avec 1 mM de phényléphrine (PE) et la présence d'endothélium a été confirmée par la vasorelaxation induite après application d'acétylcholine (ACh ; 1 mM). Après plusieurs lavages et une période de stabilisation de 20 à 30 minutes, les réponses aux doses ont été réalisées par des augmentations cumulatives de la concentration de l'agoniste PE (plage de 0,01 à 10 mM). La fonction endothéliale a été évaluée en étudiant les effets relaxants des augmentations cumulées de la concentration d'ACh (1 nM-10 mM) dans les artères contractées avec une concentration submaximale active de PE (10 mM). Des relaxations indépendantes de l'endothélium au nitroprussiate de sodium (SNP ; 1 nM- 100 mM) ont été étudiées dans des anneaux dénudés d'endothélium précédemment contractés avec de la PE (10 mM). Chaque protocole a été réalisé en triple exemplaire dans des tissus provenant de six animaux différents par groupe.

Analyse statistique

Toutes les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. Une analyse de la variance à un facteur a été suivie d'une comparaison multiple ; le test post hoc Student-Newman-Keuls a été utilisé pour comparer les différences entre les groupes. Les différences ont été considérées comme étant statistiquement significatives à $P < 0,05$.

Résultats

Ration alimentaire et poids corporel

Le régime HF a augmenté de manière significative la ration alimentaire de 27 % ($P 0,0062$) et la prise de poids de ~ 80 % ($P < 0,001$) 80% des hamsters du groupe HF par rapport au groupe STD (Tableau 1). Les groupes HF-SES et HF-Sp ont montré un gain de poids significativement inférieur

à celui du groupe HF témoin, soit 52 % ($P = 0,0001$)

et 44 % ($P 0,0008$), respectivement, bien qu'il n'y ait pas eu de différences dans la ration alimentaire (Tableau 1).

Analyse du plasma

Les hamsters nourris au régime HF présentaient une dyslipidémie par rapport à ceux du groupe STD (Tableau 1). À l'exception du LDL-C, la supplémentation en SES a amélioré ces paramètres, alors que la spiruline non.

Par rapport au groupe STD, le groupe HF a montré un taux de glucose plasmatique à jeun supérieur de 40 % ($P 0,0256$) et une augmentation de 194 % de l'insulinémie ($P < 0,0002$), ce qui a entraîné une augmentation de 126 % de l'insulinorésistance (IR) telle que mesurée par HOMA-IR ($P 0,0075$; Tableau 1). Bien que la glycémie ait été élevée dans le groupe HF-SES, le taux d'insuline plasmatique (72 %, $P < 0,0001$) et l'HOMA-IR (56 %, $P 0,0010$)

et l'HOMA-IR étaient identiques à ceux du groupe STD. Ces paramètres sont les mêmes entre les groupes HF et HF-Sp.

L'activité PON dans le plasma est résumée dans le Tableau 1. Son activité a été réduite d'environ 32 % dans le groupe témoin HF par rapport au groupe STD ($P 0,001$), ce qui n'est pas apparu dans les groupes HF-SES et HF-Sp.

Chez les hamsters nourris au régime HF, les taux plasmatiques de MCP-1 ont augmenté de 420 % ($P < 0,0001$) par rapport au groupe (Tableau 1). Le niveau a été abaissé de 28 % dans le groupe HF-SES ($P 0,0380$), tandis que le groupe HF-Sp a montré un effet plus faible par rapport au groupe HF.

Stress oxydatif hépatique et cardiaque

Dans le foie, la production d'O₂^{•-} (c'est-à-dire l'activité de la NADPH oxydase) a augmenté de 98 % ($P < 0,0001$) dans le groupe HF par rapport au groupe STD. Cette production a été réduite dans les groupes HF-SES et

Tableau 1
Paramètres biochimiques nutritionnels, plasmatiques et hépatiques dans les différents groupes*

| | STD | HF | HF-SES | HF-Sp |
|---|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Prise de poids corporel (g) | 32,7 \pm 5,2 ^a | 58,7 \pm 7,2 ^b | 28,6 \pm 4,3 ^a | 33,0 \pm 2,8 ^a |
| (g/j) Ration alimentaire | 4,9 \pm 0,2 ^a | 6,2 \pm 0,6 ^b | 5,5 \pm 0,6 ^b | 5,5 \pm 0,5 ^b |
| (g/j) Plasma | | | | |
| TC (mmol/L) | 3,19 \pm 0,15 ^a | 7,26 \pm 0,26 ^b | 6,11 \pm 0,37 ^c | 6,81 \pm 0,23 ^b |
| HDL-C (mmol/L) | 1,97 \pm 0,23 ^a | 3,26 \pm 0,18 ^b | 2,52 \pm 0,16 ^c | 3,03 \pm 0,12 ^b |
| LDL-C (mmol/L) | 1,22 \pm 0,23 ^a | 4,00 \pm 0,32 ^b | 3,59 \pm 0,37 ^b | 3,78 \pm 0,24 ^b |
| TG (mmol/L) | 1,06 \pm 0,06 ^a | 1,73 \pm 0,27 ^b | 1,14 \pm 0,03 ^a | 1,60 \pm 0,29 ^{ab} |
| PON (U/mL) | 172,8 \pm 10,2 ^a | 118,2 \pm 11,6 ^b | 146,9 \pm 9,9 ^{ab} | 151,0 \pm 7,7 ^a |
| Glucose (mmol/L) | 7,78 \pm 0,13 ^a | 10,88 \pm 0,67 ^b | 12,28 \pm 0,91 ^b | 12,04 \pm 1,46 ^b |
| Insuline (pmol/L) | 155,4 \pm 43,1 ^a | 456,7 \pm 79,8 ^b | 127,8 \pm 43,9 ^a | 178,0 \pm 30,5 ^a |
| HOMA-IR | 9,98 \pm 2,90 ^a | 22,55 \pm 4,90 ^b | 9,92 \pm 0,80 ^a | 12,06 \pm 2,53 ^c |
| MCP-1 (pg/mL) ^y | 30,5 \pm 11,5 ^a | 59,5 \pm 19,4 ^b | 114,2 \pm 7,7 ^c | 133,0 \pm 22,4 ^{bc} |
| Foie | | | | |
| Inflammation | | | | |
| TNF- α (pg/mg protéine) | 52,1 \pm 7,9 ^a | 122,8 \pm 14,6 ^b | 63,0 \pm 7,7 ^a | 102,9 \pm 19,2 ^b |
| protéine) IL-6 (pg/mg protéine) | 220,7 \pm 14,7 ^a | 362,6 \pm 22,2 ^b | 254,3 \pm 31,2 ^a | 344,5 \pm 30,2 ^b |
| protéine) NF- κ B (ng/g foie) | 6,2 \pm 0,5 ^a | 8,5 \pm 0,5 ^b | 6,7 \pm 0,4 ^{ac} | 8,2 \pm 0,4 ^{bc} |
| Statut d'oxydation | | | | |
| O ₂ ^{•-} (RLU/mg protéine) ^z | 55,36 \pm 3,95 ^{ac} | 109,60 \pm 5,74 ^b | 39,94 \pm 5,31 ^a | 63,04 \pm 4,27 ^c |
| État oxydatif cardiaque | | | | |
| O ₂ ^{•-} (RLU/mg protéine) ^z | 61,98 \pm 4,16 ^a | 124,18 \pm 9,58 ^b | 81,25 \pm 5,94 ^c | 99,33 \pm 5,10 ^d |
| Activité enzymatique | | | | |
| antioxydante SOD (U/mg protéine) | 39,8 \pm 4,1 ^a | 2,8 \pm 3,2 ^b | 34,3 \pm 6,3 ^a | 23,5 \pm 0,4 ^a |
| GPx (U/mg protéine $\times 10^{-2}$) | 79,1 \pm 5,6 ^a | 138,6 \pm 9,8 ^b | 107,5 \pm 5,8 ^c | 102,6 \pm 9,1 ^{ac} |

GPx, glutathion peroxydase ; HDL-C, cholestérol à lipoprotéines de haute densité ; HF, haute teneur en graisse ; HOMA-IR, évaluation du modèle homéostatique de

l'insulinorésistance ; IL, interleukine ; LDL-C, cholestérol à lipoprotéines de basse densité ; MCP, protéine chimio-attractrice monocyte ; NF, facteur nucléaire ; PON, activité de la paraoxonase ; RLU, unité relative de luminescence ; SES, spiruline enrichie en silicium ; SOD, superoxyde dismutase ; Sp, spiruline ; STD, régime standard ; TC, cholestérol total ; TG, triacylglycérol ; TNF, facteur de nécrose tumorale

* Les valeurs sont des moyennes \pm SEM (n = 6). Pour chaque traitement alimentaire, les moyennes sur une ligne avec des lettres différentes diffèrent, $P < 0,05$. Les TC, HDL-C, LDL-C, TG, PON et HOMA-IR dans le plasma ont été mesurés après un jeûne de nuit, à la fin de la période de traitement de 12 semaines.

^y Niveaux MCP-1 du plasma.

^z Production d' $O_2^{\bullet-}$ (c'est-à-dire l'activité de la NADPH oxydase, exprimée en RLU).

HF-Sp (64 % ; $P < 0,0001$ et 42 % ; $P < 0,0001$, respectivement) par rapport au groupe HF (Tableau 1).

Dans le ventricule cardiaque gauche, la production d' $O_2^{\bullet-}$ a augmenté de 101 % ($P < 0,0001$) dans le groupe HF par rapport au groupe STD. Elle a été réduite de 35 % ($P = 0,0060$) et de 20 % ($P < 0,0001$) dans le groupe de hamsters recevant le régime HF-SES et HF-Sp, respectivement, par rapport au groupe HF (Tableau 1).

Activité des enzymes antioxydantes du foie

Dans le groupe HF, les activités de la SOD du foie et de la GPx ont augmenté de 35 % ($P = 0,0171$) et 75 % ($P < 0,0001$), respectivement, par rapport au groupe (Tableau 1). Dans les groupes HF-SES et HF-Sp, l'activité de la SOD a baissé de 35 % ($P = 0,0017$) et 55 % ($P < 0,0001$), respectivement, et l'activité de la GPx a baissé de 23 % ($P = 0,01861$) et 24 % ($P = 0,0049$), respectivement (Tableau 1). En outre, dans ces deux groupes, le niveau d'activité de la SOD correspondait à celui mesuré dans le groupe STD.

Stéatose et inflammation du foie

Les hamsters STD ne présentaient aucun signe histologique de stéatose hépatique (Fig. 1). En revanche, la présence d'une stéatose microvasculaire d'intensité sévère est apparue dans le groupe HF, accompagnée d'une réaction inflammatoire faible comme le révèle la présence de cellules polymorphonucléaires (PMN). Aucune réduction marquée du degré

de stéatose n'est apparue dans le foie des groupes HF-SES et HF-Sp, bien que certaines cellules PMN aient pu être observées à un degré moindre.

Les concentrations de TNF- α et d'IL-6 dans les foies du groupe HF ont significativement augmenté de 135 % ($P < 0,0001$) et de 64 % ($P = 0,0015$), respectivement, par rapport au groupe STD (Tableau 1). Cet état inflammatoire de faible intensité n'a été évité que dans le groupe HF-SES, qui présentait des taux de cytokines similaires à ceux du groupe STD.

Dans le groupe HF, l'activité du NF- κ B a augmenté (36 %, $P = 0,0051$)

par rapport au groupe STD. Dans le groupe HF-SES, une telle augmentation a été évitée, mais pas dans le groupe HF-Sp, et l'activité hépatique NF- κ B (21 %, $P = 0,0259$) a atteint le niveau du groupe STD (Tableau 1).

Réactivité vasculaire

L'athérosclérose a induit des altérations fonctionnelles des propriétés vasomotrices des vaisseaux sanguins affectant à la fois l'endothélium vasculaire et le muscle lisse. Dans notre modèle, le HFD a induit de telles modifications dans les réponses vasomotrices de l'aorte du hamster. La contraction induite par la PE était plus faible dans le groupe HF ($2,57 \pm 0,13$ g) que chez les animaux STD ($3,16 \pm 0,19$ g ; Fig. 2a), ce qui correspond à une réduction de 39 % de la réponse contractile ($P = 0,0477$). Cette réduction n'a pas été observée dans le groupe HF-SES ($3,38 \pm 0,15$ g), pour lequel la réponse à la PE était identique à celle du groupe STD ($P = 0,344$ par rapport à STD et $P = 0,0005$ par rapport à HF). Les propriétés vasorelaxantes des artères ont également

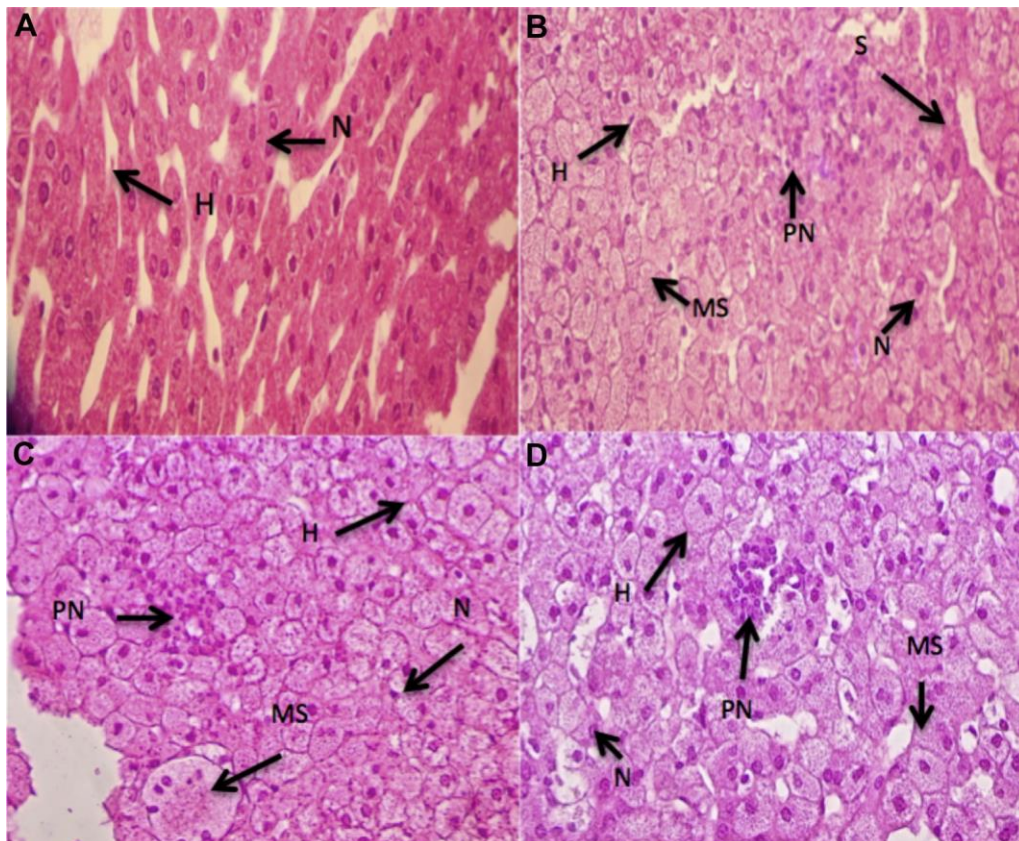


Fig. 1. Évaluation histologique de la stéatose hépatique dans les groupes STD (A), HF (B), HF-SES (C) et HF-Sp (D). Les images illustrées représentent des coupes du foie (grossissement 40 \times) et montrent une stéatose hépatique modérée à sévère chez les animaux HF (B) avec stéatose microvasculaire (MS), capillaires sinusoidaux (S) et

inflammation indiquée par la présence généralisée de cellules polynucléaires (PN), par rapport aux animaux STD (A). La stéatose hépatique n'est pas empêchée par la supplémentation en Sp (C) et en SES (D), bien que le nombre de cellules PN soit réduit. HF, haute teneur en graisse ; SES, spiruline enrichie en silicium ; Sp, spiruline ; STD, standard.

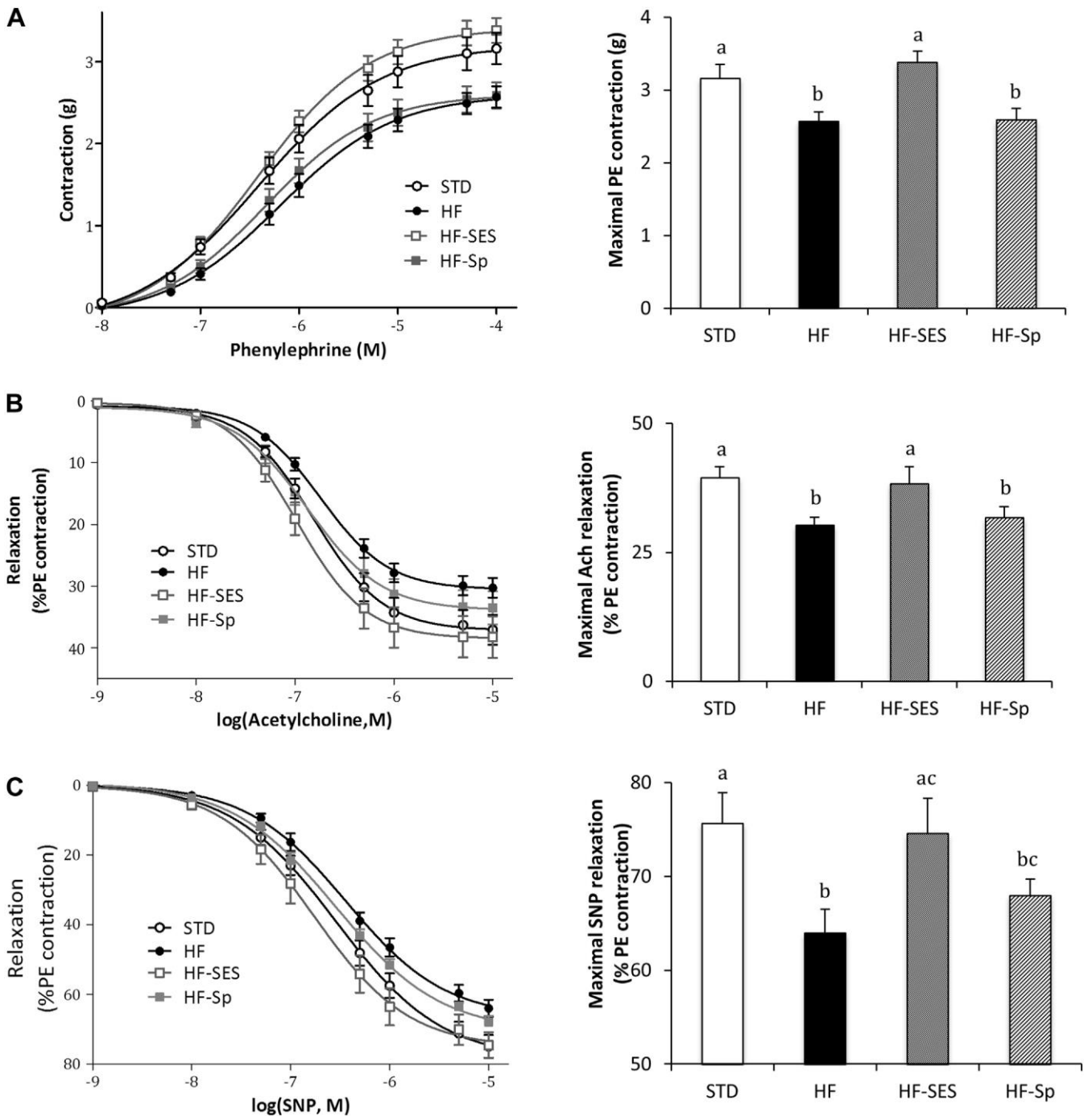


Fig. 2. Réactivité vasculaire de l'aorte de hamster dans les groupes STD, HF, HF-SES et HF-Sp. (A) La contractilité a été évaluée en réponse à des concentrations cumulatives de PE. La relaxation endothélio-dépendante en réponse à des doses cumulées d'Ach (B) et la relaxation dépendante du muscle lisse en réponse au SNP (C) ont été étudiées sur des artères précédemment contractées par PE (10 mM). Cadres de gauche : courbes dose-réponse. Cadres de droite : contraction ou relaxation maximale obtenue pour chaque groupe dans diverses conditions. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM (n = 6). Ach, acétylcholine ; HF, haute teneur en graisse ; PE, phényléphrine ; SES, spiruline enrichie en silicium ; SNP, nitroprussiate de sodium ; Sp, spiruline ; STD, standard.

été altérées dans le groupe HFD. L'addition cumulative d'Ach et de SNP a entraîné une relaxation de l'aorte dépendante de la concentration, précédemment contractée par PE (Fig. 2B, C). Le groupe HFD a montré une réponse endothélio-dépendante réduite à l'Ach par rapport au groupe STD (Fig. 2B). La relaxation maximale obtenue pour le groupe HFD a été réduite de 23 % par rapport à la réponse à l'Ach dans le groupe STD ($P = 0,0042$). Cette réduction a été observée dans le groupe HF-Sp (19 %, $P = 0,0334$) mais pas dans le

groupe HF-SES, dans lequel la relaxation à l'Ach était identique à celle du groupe STD ($P = 0,396$). De la même manière, le SNP a induit une relaxation dose-dépendante de l'aorte de rat précédemment contractée par PE. Dans le groupe HF, l'effet relaxant du SNP a été plus faible que dans le groupe STD, la relaxation a été réduite de 15 % ($P = 0,0218$) par rapport au groupe STD. Dans le groupe HF-SES, la relaxation au SNP était identique à celle du groupe STD ($P = 0,974$), alors que dans le groupe HF-Sp, aucune différence n'a été

observée dans le groupe HF Φ (P 0,338). Le HFD a induit des dysfonctionnements vasculaires et endothéliaux, qui ont été complètement évités par une supplémentation en SES.

Discussion

Nous avons étudié les effets de la SSE sur les troubles induits par un HFD et associés à l'athérosclérose précoce chez le hamster. Nous avons montré qu'une supplémentation en SES permettait de prévenir des troubles tels que la dyslipidémie, le stress oxydatif, l'inflammation, l'IR et les dysfonctionnements vasculaires. Bien que certaines améliorations en matière de dyslipidémie, de stress oxydatif et d'inflammation puissent être attribuées à la spiruline, en soi [26], la prévention de l'IR et des dysfonctionnements vasculaires reflète plus probablement un effet supplémentaire du silicium. Nos résultats corroborent spécifiquement la pertinence de l'enrichissement de la spiruline en silicium et soulignent l'efficacité de ce supplément alimentaire dans la prévention des facteurs de risque cardiovasculaire.

Comme prévu, le HFD, caractérisé par des niveaux élevés d'acides gras saturés et de cholestérol, a induit une dyslipidémie avec une augmentation des triacylglycérols, du HDL-C et du LDL-C. La spiruline, enrichie ou non, a permis d'éviter partiellement cela. Le HFD, qui favorise un taux élevé de glucose plasmatique et d'insuline, a également induit une IR, comme l'a révélé le HOMA-IR. Bien que la supplémentation en SES n'ait pas permis d'éviter l'augmentation de la glycémie, l'IR a été évitée en raison de la réduction de l'insulinémie. La diminution de la sensibilité à l'insuline induite par le HFD est généralement associée à d'autres troubles tels que le stress oxydatif et l'inflammation de faible intensité, qui contribuent tous deux au développement de l'athérosclérose [27]. Dans notre modèle, le HFD a effectivement induit un stress oxydatif cardiaque et hépatique, comme le montre la surproduction d' $O_2^{\circ-}$. Le système NADPH oxydase est une source majeure de production d' $O_2^{\circ-}$ et toute augmentation de son activité conduit à un stress oxydatif comme montré précédemment avec une activité et une expression accrues de la sous-unité p22^{phox} NADPH oxydase [28].

Dans la présente étude et comme le montre une étude précédente [19], la spiruline brute et la SES ont toutes deux amélioré l'état oxydatif du foie et du cœur en diminuant la production d' $O_2^{\circ-}$. En général, la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est contrée par l'induction du système de défense antioxydant pour rétablir l'homéostasie redox, qui comprend les activités SOD, GPx et catalase effectivement augmentées par les régimes HF [29]. Ici, au sein du groupe HFD, les activités de la SOD et de la GPx ont été renforcées. Cependant, cette induction n'a pas empêché la surproduction hépatique d' $O_2^{\circ-}$, $O_2\circ-$, suggérant que la production de ROS pourrait submerger les mécanismes de défense enzymatique, ce déséquilibre entraînant un stress oxydatif hépatique.

Chez les hamsters nourris à la spiruline brute ou à la SES, les activités GPx et SOD étaient plus faibles que chez les animaux HFD. Ainsi, dans ces groupes, les diminutions de la production hépatique et cardiaque d' $O_2^{\circ-}$ ne sont pas liées à une augmentation des défenses antioxydantes enzymatiques, mais plutôt à un effet d'épargne dû à leurs propriétés antioxydantes directes [30]. Cela a été rapporté dans d'autres études [24,31] où la consommation d'antioxydants alimentaires (phénoliques) a diminué les enzymes antioxydantes endogènes, piégeant les radicaux d'oxygène et réduisant le besoin de défense antioxydante cellulaire.

L'activité PON est un autre marqueur du stress oxydatif. La PON joue un rôle majeur dans l'activité antioxydante des HDL [32]. Elle est capable d'hydrolyser les phospholipides oxydés et les produits de peroxydation des lipides, inhibant ainsi l'oxydation des LDL et HDL. Ainsi, la PON pourrait protéger contre l'athérosclérose, et la modulation de son activité fait partie des cibles thérapeutiques actuelles [33]. Les régimes HF associés au stress oxydatif sont connus pour diminuer l'activité des PON [34] et dans ce cas, cette activité a été fortement réduite dans le groupe HFD.

Il est bien connu que l'IR associée au stress oxydatif hépatique est liée au développement de la maladie du foie gras non alcoolique (NAFLD), qui est présentée comme un facteur de risque indépendant pour l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires, bien que les relations mécanistes ne soient pas entièrement comprises [35]. Nous avons détecté une stéatose hépatique dans le groupe HFD, comme en témoigne l'accumulation de lipides dans les tissus. Malgré la présence de cellules PMN, aucun signe de fibrose n'a été détecté dans le foie, ce qui suggère que le stade de la stéatohépatite non alcoolique (NASH) n'est pas encore atteint. L'état inflammatoire de faible intensité est confirmé par les niveaux de cytokines (TNF- α et IL-6) qui ont été augmentés par rapport aux hamsters STD. La supplémentation en spiruline, enrichie ou non, n'offre aucune protection contre la stéatose hépatique, même si le nombre de cellules PMN a été réduit. Cependant, les augmentations des niveaux de cytokines ont été évitées dans le groupe SES.

La théorie proposée précédemment [36] suggérait que dans la NASH, une boucle d'amplification existe entre l'IR et le stress oxydatif et entraîne une surproduction de cytokines inflammatoires. Dans la présente étude, la prévention de l'IR et la production atténuée d' $O_2^{\circ-}$ observées dans le groupe HF-SES liées à une production plus faible de cytokines inflammatoires pourraient traduire une protection contre la NASH induite par le HFD.

Le NF- κ B, un facteur de transcription sensible au stress oxydatif, est un régulateur clé de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire, et les cytokines induites par le NF- κ B contribuent largement au fardeau des maladies inflammatoires, notamment l'athérosclérose [37]. Dans notre étude, la supplémentation en SES a empêché de manière significative l'activation du NF- κ B hépatique induite par le HFD et l'hérédité des cytokines pro-inflammatoires. L'effet anti-oxydant de la SES a probablement contribué à l'inhibition de l'activation du NF- κ B.

De plus, la MCP-1 joue un rôle essentiel dans le développement des maladies cardiovasculaires. La MCP-1, par son activité chimiotactique, induit la diaphyse des monocytes de la lumière vers l'espace sous-endothélial, où ils deviennent des cellules spumeuses, initiant le développement de stries graisseuses qui conduisent à la formation de plaques athérosclérotiques [38]. Ici, la supplémentation en SES a réduit le niveau plasmatique de la MCP-1, ce qui suggère que la SES pourrait limiter le développement de l'athérosclérose. En plus de la dyslipidémie, de l'IR, du stress oxydatif et de l'inflammation, le régime HF est connu pour induire un dysfonctionnement vasculaire [25,39]. En effet, dans notre modèle, nous avons observé un véritable dysfonctionnement caractérisé par une altération des réponses à l'agoniste et à l'antagoniste contractile, ainsi qu'au vaso-décontractant endothélial. La supplémentation en SES a efficacement empêché ces altérations, ces effets reflétant à la fois l'évitement du dysfonctionnement endothélial et le remodelage vasculaire connu pour être induit par le HFD [39]. Aucun effet bénéfique n'a été observé lors de la supplémentation en spiruline brute, ce qui suggère que les effets préventifs de la SES sur le dysfonctionnement vasculaire pourraient être attribuables à l'enrichissement en silicium.

Dans un travail précédent, il a été rapporté qu'après un apport de silice soluble par voie orale ou de sable de corail chez des rats spontanément hypertendus, la pression sanguine était réduite, et que cet apport améliorait l'expression des gènes aortiques correspondants [18]. Dans notre étude, en utilisant un modèle différent et une supplémentation en silicium par SES, nous avons montré une prévention des fonctions vasculaires et endothéliales évaluées respectivement par la réponse

contractile à l'agoniste phényléphrine et la relaxation induite par l'Ach. Cela pourrait corroborer les résultats antérieurs [18].

Une autre étude a montré que des lapins auxquels on avait administré du silicium par voie intraveineuse ou orale, à des doses et sous une forme chimique différentes de celles utilisées ici, présentaient une réduction de la taille des plaques athérosclérotiques [17]. L'utilisation d'un modèle différent et d'un mode d'approvisionnement différent rend la comparaison difficile. Toutefois, nos résultats renforcent les conclusions précédentes [17]

et, en outre, nous avons montré des effets positifs sur l'IR, la NAFLD, la réactivité vasculaire et l'inflammation.

Conclusion

Les résultats de cette étude ont démontré qu'en plus des avantages nutritionnels intrinsèques de la spiruline, la supplémentation en SES avait de réels bénéfices, notamment sur l'IR et la fonction vasculaire. L'étude a révélé l'efficacité du silicium en synergie avec la spiruline dans un modèle d'athérosclérose précoce du hamster induite par le régime alimentaire, où la SSE prévenait les troubles métaboliques, oxydatifs, inflammatoires et le dysfonctionnement vasculaire. Ces propriétés ouvrent des perspectives intéressantes dans le contexte de la carence en silicium où l'apport est suffisant mais la biodisponibilité limitée.

Remerciements

Les auteurs remercient la société Phyco-Biotech pour son intérêt dans ce travail et son don généreux de spiruline.

Références

- [1] Dillon JC, Phuc AP, Dubacq JP. Nutritional value of the alga spirulina. *World Rev Nutr Diet* 1995;77:32–46.
- [2] Kay RA. Microalgae as food and supplement. *Clin Rev Food Sci Nutr* 1991;30:555–73.
- [3] Chamorro GA, Herrera G, Salazar M, Salazar S, Ulloa V. Subchronic toxicity study in rats fed Spirulina. *J Pharm Belg* 1988;43:29–36.
- [4] Chen T, Wong YS, Zheng W. Purification and characterization of selenium-containing phycoerythrin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. *Phytochemistry* 2006;67:2424–30.
- [5] Mazo VK, Gmoshinski IV, Zorin SN. New food sources of essential trace elements produced by biotechnology facilities. *Biotechnol J* 2007;2:1297–305.
- [6] Seaborn CD, Nielsen FH. Silicon: a nutritional beneficence for bones, brains and blood vessels? *Nutr Today* 1993;28:13–8.
- [7] Reffitt DM, Jugdaohsingh R, Thompson RP, Powell JJ. Silicic acid: its gastrointestinal uptake and urinary excretion in man and effects on aluminium excretion. *J Inorg Biochem* 1999;76:141–7.
- [8] Jugdaohsingh R, Anderson SHC, Tucker KL, Elliott H, Kiel DP, Thompson RPH, et al. Dietary silicon intake and absorption. *Am J Clin Nutr* 2002;75:887–93.
- [9] Sripanyakorn S, Jugdaohsingh R, Dissayabutr W, Anderson SHC, Thompson RPH, Powell JJ. The comparative absorption of silicon from different foods and food supplements. *Br J Nutr* 2009;102:825–34.
- [10] Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc* 2001;101:294–301.
- [11] Pérez-Granados AM, Vaquero MP. Silicon, aluminium, arsenic and lithium: essentiality and human health implications. *J Nutr Health Aging* 2002;6:154–62.
- [12] Jugdaohsingh R. Silicon and bone health. *J Nutr Health Aging* 2007;11:99–110.
- [13] Calomme MR, Vanden Berghe DA. Supplementation of calves with stabilized orthosilicic acid. Effect on the Si, Ca, Mg, and P concentrations in serum and the collagen concentration in skin and cartilage. *Biol Trace Elem Res* 1997;56:153–65.
- [14] Carlisle EM. In vivo requirement for silicon in articular cartilage and connective tissue formation in the chick. *J Nutr* 1976;106:478–84.
- [15] Loeper J, Goy-Loeper J, Rozensztajn L, Fragny M. The antiatheromatous action of silicon. *Atherosclerosis* 1979;33:397–408.
- [16] Schwarz K, Ricci BA, Punsar S, Karvonen MJ. Inverse relation of silicon in drinking water and atherosclerosis in Finland. *Lancet* 1977;1:538–9.
- [17] Loeper J, Goy J, Fragny M, Troniou R, Bedu O. Study of fatty acids in atheroma induced in rabbits by an atherogenic diet with or without silicon I.V. treatment. *Life Sci* 1988;42:2105–12.
- [18] Maehira F, Motomura K, Ishimine N, Miyagi I, Eguchi Y, Teruya S. Soluble silica and coral sand suppress high blood pressure and improve the related aortic gene expressions in spontaneously hypertensive rats. *Nutr Res* 2011;31:147–56.
- [19] Deng R, Chow T-J. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae Spirulina. *Cardiovasc Ther* 2010;28:e33–45.
- [20] National Research Council. Guide for the care and the use of laboratory animals; National Institutes of Health Publication no.85–123 (rev.). Washington DC: U.S. Government Printing Office; 1985.
- [21] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939–51.
- [22] Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2007;22:659–61.
- [23] EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Silicon. *EFSA J* 2004;60:1–11.
- [24] Romain C, Bresciani L, Gaillet S, Feillet-Coudray C, Calani L, Bonafos B, et al. Moderate chronic administration of Vineatrol-enriched red wines improves metabolic, oxidative, and inflammatory markers in hamsters fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:1212–25.
- [25] Suh JH, Virsolvy A, Goux A, Cassan C, Richard S, Cristol JP, et al. Polyphenols prevent lipid abnormalities and arterial dysfunction in hamsters on a high-fat diet: a comparative study of red grape and white persimmon wines. *Food Funct* 2011;2:555–61.
- [26] Belay A. The potential application of Spirulina (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J Am Nutraceut Assoc* 2002;5:27–48.
- [27] Romain C, Gaillet S, Carillon J, Vidé J, Ramos J, Izard J-C, et al. Vineatrol and cardiovascular disease: beneficial effects of a vine-shoot phenolic extract in a hamster atherosclerosis model. *J Agric Food Chem* 2012;60:11029–36.
- [28] Décordé K, Ventura E, Lacan D, Ramos J, Cristol J-P, Rouanet J-M. An SOD rich melon extract Extramel prevents aortic lipids and liver steatosis in diet-induced model of atherosclerosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20:301–7.
- [29] Agbor GA, Akinfiresoye L, Sortino J, Johnson R, Vinson JA. Piper species protect cardiac, hepatic and renal antioxidant status of atherogenic diet fed hamsters. *Food Chem* 2012;134:1354–9.
- [30] Gad AS, Khadrawy YA, El-Nekeety AA, Mohamed SR, Hassan NS, Abdel-Wahhab MA. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and Spirulina in rats. *Nutrition* 2011;27:582–9.
- [31] Pedret A, Valls RM, Fernández-U, Romeu M, Giral M, et al. Polyphenol-rich foods exhibit DNA antioxidative properties and protect the glutathione system in healthy subjects. *Mol Nutr Food Res* 2012;56:1025–33.
- [32] Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:473–80.
- [33] She Z-G, Chen H-Z, Yan Y, Li H, Liu D-P. The human paraoxonase gene cluster as a target in the treatment of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2012;16:597–632.
- [34] Thomàs, Gianotti M. Paraoxonase 1 response to a high-fat diet: gender differences in the factors involved. *Mol Med* 2007;13:203–9.
- [35] Bhatia LS, Curzen NP, Calder PC, Byrne CD. Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor? *Eur Heart J* 2012;33:1190–200.
- [36] Day CP, James OFW. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842–5.
- [37] Pamukcu B, Lip GYH, Shantsila E. The nuclear factor-kappa B pathway in atherosclerosis: a potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease. *Thromb Res* 2011;128:117–23.
- [38] Panee J. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine* 2012;60:1–12.
- [39] Damjanovic M, Barton M. Fat intake and cardiovascular response. *Curr Hypertens Rep* 2008;10:25–31.