



**HAL**  
open science

# Potentiel antidiabétique de métabolites de polyphénols : les urolithines

Morgane Bayle

► **To cite this version:**

Morgane Bayle. Potentiel antidiabétique de métabolites de polyphénols : les urolithines. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT018 . tel-02475845

**HAL Id: tel-02475845**

**<https://theses.hal.science/tel-02475845v1>**

Submitted on 12 Feb 2020

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

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



# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**Docteur**

Délivrée par l'**Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale  
**Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé**

Et de l'unité de recherche  
**Institut des Biomolécules Max Mousseron**

Spécialité : **Pharmacologie fondamentale et  
thérapeutique**

Présentée par Morgane Bayle

**Potentiel Antidiabétique de  
Métabolites de Polyphénols :  
les Urolithines**

Soutenue le 10 juillet 2017 devant le jury composé de



Mr Pierre-Louis Teissède, Professeur, Université Bordeaux  
Mme Valérie Schini-Kerth, Professeur, Université Strasbourg  
Mme Magalie Ravier, Chargée de recherches, IGF Montpellier  
Mr Roberto Gomeni, Professeur, Université Caroline du Nord  
Mr Jean-François Quignard, Professeur, Université Bordeaux  
Mr Marc Criton, Chef de projet, AxLR-SATT Montpellier  
Mme Catherine Oiry, Professeur, Université Montpellier  
Mr Gérard Cros, Professeur, Université Montpellier

Président, Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur  
Co-directeur



## Remerciements

Ce travail a été effectué à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron, au laboratoire de pharmacologie dirigé par Gérard Cros, co-directeur de cette thèse, à qui je témoigne toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie et permise de réaliser cette thèse. Gérard, merci pour vos conseils avisés et votre soutien permanent.

Je voudrais témoigner un grand merci à Catherine Oiry qui a dirigé ce travail durant ces quatre années. Merci pour ta disponibilité et ton implication. Ta bienveillance et ta gentillesse à mon égard m'ont touchée.

Je souhaiterais également remercier Richard Magous et Jérémie Neasta pour leur implication dans le projet et leurs conseils. Jérémie, merci pour tes encouragements, ta disponibilité et l'intérêt que tu as porté à ce travail.

Je remercie également Valérie Schini-Kerth et Pierre-Louis Teissède qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que Magalie Ravier, Jean-François Quignard, Roberto Gomeni et Marc Criton qui ont bien voulu faire partie du jury.

Je remercie Anne Virsolvy, Jean-François Quignard, Françoise Bressolle, Roberto Gomeni, Michel Audran, Bénédicte Marion et Céline Roques pour leur collaboration à ce travail de thèse.

Merci à Gyslaine Bertrand et à René Gross de m'avoir formée à des techniques qui ont permis d'apporter une qualité supplémentaire au travail.

Je remercie également Joseph, Audrey, Guillaume et de façon plus générale, l'ensemble des personnes du laboratoire de pharmacologie avec qui j'ai passé de bons moments et qui ont contribué à une bonne humeur quotidienne.

Un grand merci à mes parents ainsi qu'à ma famille qui m'ont toujours soutenue et aidée dans mes études.

Pour finir, un merci particulier à Julien, qui a vécu ce doctorat à mes côtés et sur qui j'ai pu compter en toutes circonstances. Tu as été un soutien permanent et m'as apportée une aide précieuse dans les derniers moments de rédaction.

## Résumé

Notre travail de thèse avait pour objet l'étude du potentiel anti-diabétique des urolithines A, B, C et D, métabolites de polyphénols formés par le microbiote colique à partir des tanins de l'acide ellagique (présents notamment dans la grenade et les noix).

Notre travail a permis de décrire les effets des urolithines sur différents modèles expérimentaux :

Sur un modèle de cellules  $\beta$  insulino-sécrétrices (lignée INS-1), les urolithines induisent une amplification concentration-dépendante de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Elles amplifient l'effet d'autres sécrétagogues comme un analogue du GLP-1 ou une sulfonurée (médicaments utilisés dans le diabète). Les urolithines sont également capables de stimuler la sécrétion d'insuline sur des cellules  $\beta$  ne répondant plus au glucose du fait d'une gluco-toxicité.

L'effet insulino-sécrétoire des urolithines a été confirmé sur îlots de Langerhans isolés.

L'urolithine C étant apparue comme le composé le plus prometteur, nous avons poursuivi la caractérisation de son activité sur un modèle *ex vivo* mimant la situation physiologique, le pancréas isolé perfusé. Alors que l'effet sécrétoire de l'urolithine C n'apparaît pas en présence de 5 mM de glucose, l'urolithine C (20  $\mu$ M) amplifie la sécrétion d'insuline dans des conditions de stimulation modérée de la sécrétion d'insuline par le glucose (8,3 mM). Cet effet est strictement dépendant du glucose, la sécrétion d'insuline retournant immédiatement à son niveau basal lors du passage de 8,3 à 5mM de glucose en présence d'urolithine C.

D'un point de vue mécanistique, il semblerait que l'effet insulino-sécrétoire de l'urolithine C soit médié par une augmentation de la sensibilité et de l'ouverture des canaux calciques de type L.

Des études de pharmacocinétique ont permis de mettre au point une méthodologie de dosage plasmatique de l'urolithine C dans le plasma de rat par chromatographie liquide / ionisation electrospray /spectrographie de masse en tandem. Cette méthodologie a été appliquée à une première étude pharmacocinétique chez le rat après injection de 10 mg/kg d'urolithine C par voie intra-péritonéale. Cette étude montre notamment que le profil pharmacocinétique suit un modèle à 3 compartiments et suggère un stockage tissulaire du composé.

Notre première approche pharmacologique *in vivo* suggère que l'urolithine C pourrait avoir un effet de type « insulino-sensibilisant » évoqué à la fois lors des IPGTT par la réduction de l'insulinémie sans augmentation de la glycémie, ainsi que par l'effet prolongateur de la durée de vie du ver *C. elegans*, suggérant un mécanisme d'action lié à la stimulation de la voie AMPK.

Des études plus approfondies seront nécessaires pour conforter cette hypothèse.

**Mots clés :** diabète, métabolites de polyphénols, urolithines, cellule  $\beta$ .

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>12</b>
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>16</b>
<b>CHAPITRE 1 : LA PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE BETA PANCREATIQUE.....</b>	<b>17</b>
1.1. LE PANCREAS.....	17
1.2. LES ILOTS DE LANGERHANS.....	17
1.3. LA CELLULE B PANCREATIQUE.....	19
1.3.1. Hétérogénéité de la masse cellulaire $\beta$ .....	19
1.3.2. Structure et biosynthèse de l'insuline.....	20
1.3.3. Action de l'insuline.....	21
1.3.4. Contrôle physiologique de la sécrétion d'insuline.....	22
1.3.4.1. Sécrétion basale d'insuline.....	22
1.3.4.2. Régulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose.....	22
1.3.4.2.1. La voie $K^+$ ATP dépendante : voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline ou « triggering pathway ».....	23
1.3.4.2.2. La voie $K^+$ ATP indépendante : voie d'amplification de la sécrétion d'insuline ou « amplifying pathway ».....	24
1.3.4.3. Régulation hormonale de la sécrétion d'insuline.....	26
1.3.4.4. Régulation nerveuse de la sécrétion d'insuline.....	28
1.3.4.5. Régulation de la sécrétion d'insuline par les acides gras.....	29
1.3.4.6. Régulation de la sécrétion d'insuline par les acides aminés.....	31
1.3.5. Exocytoses des granules de sécrétion d'insuline.....	32
1.3.6. Le rôle du calcium dans la cellule $\beta$ .....	36
1.3.6.1. Le calcium d'origine extracellulaire.....	36
1.3.6.2. Le calcium d'origine intracellulaire.....	43
1.3.6.3. Activation de voies de signalisation impliquées dans la sécrétion d'insuline.....	44
<b>CHAPITRE 2 : LE DIABETE DE TYPE 2.....</b>	<b>45</b>
2.1. DEFINITIONS – EPIDEMIOLOGIE.....	45
2.2. PHYSIOPATHOLOGIE DU DIABETE DE TYPE 2.....	47
2.2.1. La résistance à l'insuline.....	48
2.2.1.1. Rôle des cytokines pro-inflammatoires.....	49
2.2.1.2. Rôle des acides gras libres et des dérivés lipidiques.....	50
2.2.1.3. Influence du microbiote intestinal.....	51
2.2.2. Le Défaut de sécrétion d'insuline.....	55
2.2.2.1. Les différentes anomalies de sécrétion d'insuline.....	55
2.2.2.2. Les mécanismes de la dysfonction cellulaire $\beta$ .....	56
2.3. LES COMPLICATIONS LIEES AU DIABETE DE TYPE 2.....	60
2.3.1. Les macroangiopathies.....	60
2.3.2. Les microangiopathies.....	60
2.3.2.1. La neuropathie diabétique.....	60
2.3.2.2. La rétinopathie diabétique.....	61
2.3.2.3. La néphropathie diabétique.....	61
2.4. PRISE EN CHARGE DU PATIENT DIABETIQUE DE TYPE 2.....	61
2.5. LES MODELES ANIMAUX DE DIABETE DE TYPE 2.....	66

2.5.1. Les modèles obèses monogéniques .....	66
2.5.2. Les modèles obèses polygéniques .....	67
2.5.3. Les modèles obèses induits par l'alimentation .....	68
2.5.4. Les modèles non obèses .....	68
<b>CHAPITRE 3 : LES POLYPHENOLS .....</b>	<b>69</b>
3.1. DEFINITION ET CLASSIFICATION .....	69
3.2. BIODISPONIBILITE DES POLYPHENOLS CHEZ L'HOMME .....	73
3.2.1. Absorption intestinale et métabolisme .....	73
3.2.2. Elimination .....	75
3.3. POLYPHENOLS ET DIABETE.....	75
3.3.1. Etudes épidémiologiques.....	75
3.3.2. Etudes d'intervention .....	76
3.3.3. Activités des polyphénols sur le métabolisme glucidique : mécanismes d'action potentiels...	77
3.4. LES UROLITHINES : .....	80
3.4.1. Structure chimique et rôle du microbiote intestinal.....	80
3.4.2. Absorption et distribution.....	84
3.4.3. Activités biologiques .....	85
3.4.3.1. Activités <i>in vitro</i> .....	85
3.4.3.2. Activités <i>in vivo</i> : .....	88
3.4.4. Liens entre l'état de santé des individus et la capacité de production des urolithines par le microbiote intestinal .....	89
<b>CHAPITRE 4 : REVUE "PROTECTION OF PANCREATIC B-CELL FUNCTION BY DIETARY POLYPHENOLS" .....</b>	<b>91</b>

**PARTIE EXPERIMENTALE..... 121**

<b>CHAPITRE 1 : ARTICLE EN PRÉPARATION "THE ELLAGITANNIN METABOLITE UROLITHIN-C IS A GLUCOSE-DEPENDENT REGULATOR OF INSULIN SECRETION THROUGH L-TYPE CALCIUM CHANNEL ACTIVATION" .....</b>	<b>122</b>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>CHAPITRE 2 : ARTICLE "DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A LIQUID CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY IONIZATION-TANDEM MASS SPECTROMETRY METHOD FOR THE DETERMINATION OF UROLITHIN C IN RAT PLASMA AND ITS APPLICATION TO A PHARMACOKINETIC STUDY" .....</b>	<b>154</b>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>CHAPITRE 3 : RESULTATS COMPLEMENTAIRES : APPROCHE <i>IN VIVO</i> DE LA PHARMACOLOGIE DE L'UROLITHINE C .....</b>	<b>164</b>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

3.1. EFFET DE L'UROLITHINE C (10 MG/KG, VOIE I.P.) SUR LA TOLERANCE AU GLUCOSE ET L'INSULINEMIE DETERMINEES <i>IN VIVO</i> CHEZ LE RAT WISTAR. ....	164
3.2. EFFET DE L'UROLITHINE C SUR LA MODULATION DE LA LONGEVITE DE <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> .....	168
3.3. CONCLUSION .....	172

**DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE..... 173**

**BIBLIOGRAPHIE ..... 177**

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 : Structure d'un îlot de Langerhans de rat</b> (Bilous and Donnelly, 2014). .....	18
<b>Figure 2 : Architecture d'un îlot humain (à gauche) et d'un îlot de souris (à droite)</b> (adapté de Brissova et al., 2005). ( <i>cellules <math>\beta</math>, vert ; cellules <math>\alpha</math>, rouge ; cellules <math>\delta</math>, bleu</i> ) .....	19
<b>Figure 3 : Hypothèse de l'existence de sous-types de cellules <math>\beta</math></b> (Bonner-Weir and Aguayo-Mazzucato, 2016) .....	20
<b>Figure 4 : Représentation schématique de la libération biphasique de la sécrétion d'insuline induite par le glucose</b> (Bilous and Donnelly, 2014). .....	23
<b>Figure 5 : Représentation schématique de la sécrétion d'insuline induite par le glucose</b> (Wang and Thurmond, 2009).....	24
<b>Figure 6 : Régulation paracrine de la sécrétion d'insuline</b> (DiGrucchio et al., 2016). .....	27
<b>Figure 7 : Voies de signalisation médiées par l'activation du GPR40 par les AGL</b> (Mancini and Poitout, 2013). .....	30
<b>Figure 8 : Modulation de la sécrétion d'insuline</b> (Magnan and Ktorza, 2005). .....	31
<b>Figure 9 : Réorganisation des filaments d'actine lors d'une stimulation au glucose permettant l'accessibilité du granule d'insuline à la syntaxine</b> (Wang and Thurmond, 2009). .....	33
<b>Figure 10 : Implication du réseau de microtubules dans le recrutement des granules d'insuline à la membrane plasmique sous l'influence du métabolisme du glucose</b> (Wang and Thurmond, 2009). .....	33
<b>Figure 11 : Modèle du cycle de fusion des vésicules de sécrétion</b> (Galli et al., 2002).....	35
<b>Figure 12 : Principaux mécanismes par lesquels le glucose entraîne des variations de la concentration cytosolique de calcium</b> (Gilon et al., 2014).....	36
<b>Figure 13 : Structure d'un Cav1</b> (Catterall, 2005). .....	38
<b>Figure 14 : Implication des TRPM dans la sécrétion d'insuline</b> (MacDonald, 2011). .....	42
<b>Figure 15 : Evolution de la prévalence du diabète dans différentes régions du monde entre 1980 et 2014</b> (World Health Organization, 2016). .....	47
<b>Figure 16 : Physiopathologie du diabète de type 2</b> (Donath, 2014). .....	48
<b>Figure 17 : Voies impliquées dans la résistance à l'insuline médiée par les lipides au niveau des tissus cibles</b> (Johnson and Olefsky, 2013). .....	51
<b>Figure 18 : Effets bénéfiques des acides gras à chaîne courte sur la sensibilité à l'insuline</b> (Canfora et al., 2015). .....	55
<b>Figure 19 : Prise en charge thérapeutique du patient diabétique de type 2</b> (HAS, 2013). .....	65
<b>Figure 20 : Classification des polyphénols en fonction de leur structure chimique de base</b> (Crozier et al., 2009). .....	70
<b>Figure 21 : Structure des principaux sous-groupes de flavonoïdes consommés par l'Homme</b> (Del Rio et al., 2013). .....	72
<b>Figure 22 : Mécanisme d'absorption de composés (poly)phénoliques au niveau de l'intestin grêle</b> (Del Rio et al., 2013). .....	75
<b>Figure 23 : Exemples d'ellagitanins consommés par l'Homme</b> (Landete, 2011). .....	81
<b>Figure 24 : Représentation schématique du métabolisme des ellagitanins et de l'acide ellagique par le microbiote intestinal chez l'Homme</b> (Espín et al., 2013). .....	83

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADP	adenosine diphosphate
AC	adénylate cyclase
Actine-F	actine fibrillaire
Actine-G	actine globulaire
AGCC	acide gras à chaîne courte
AGL	acide gras libre
AGS	acide gras saturé
AMP	adenosine monophosphate
AMPc	AMP cyclique
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATF6	Activating Transcription Factor 6
ATP	adenosine triphosphate
AVC	accident vasculaire cérébral
Ca <sub>v</sub>	canal calcique dépendant du volatge
CaMK II	protéine kinase II dépendante du calcium et de la calmoduline
CBG	β-glucosidase cytosolique
CCK	cholécystokinine
COMT	catéchol-O-méthyltransférases
COX-2	cyclo-oxygénase 2
CPT-1	carnitine-palmitoyl transferase-1
CuZn-SOD	CuZn superoxyde dismutase
DAG	diacylglycérol
DPP4	dipeptidylpeptidase 4
EGCC	epigallocatechine-3-O-gallate
Epac	exchange protein directly activated by cAMP
EphA2	ephrin type-A receptor 2

LISTE DES ABREVIATIONS

ERK 1/2	extracellular signal-regulated kinases 1/2
FFAR1	free fatty acid receptor 1
G6P	glucose-6-phosphate
GIP	glucose-dependent insulintropic polypeptide
GLP-1	glucagon-like peptide-1
GLUT	transporteur du glucose
GPx	glutathione peroxydase
GRP	gastrin releasing peptide
GRX1	glutaredoxine 1
GTP	guanosine triphosphate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène
HAS	Haute Autorité de Santé
HbA1c	hémoglobine glyquée
HCSP	highly calcium-sensitive pool
HDL	high density lipoprotein
HOCl	acide hypochloreux
IKK $\beta$	I $\kappa$ B kinase $\beta$
IL	interleukine
iNOS	oxyde nitrique synthétase inductible
i.p	intrapéritonéal
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5 triphosphate
IP <sub>3</sub> R	récepteur de l'IP <sub>3</sub>
IRE 1 $\alpha$	inositol requiring enzyme 1 $\alpha$
IRS	insulin receptor substrate
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K <sub>ATP</sub>	canal potassique dépendant du voltage
KCl	chlorure de potassium
LPB	LPS-binding protein
LPH	lactase phlorizine hydrolase
LPS	lipopolysaccharide

LISTE DES ABREVIATIONS

MAG	monoacylglycérol
MAPK	mitogen activated protein kinase
Mn-SOD	Mn- superoxyde dismutase
Mn	manganèse
mPGES-1	microsomal prostanglandin E synthase-1
MRP	multidrug resistance protein
NAC	N-acétyl-cystéine
NFκB	nuclear factor-kappa B
NO <sup>•</sup>	radical oxyde nitrique
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	anion superoxyde
OH <sup>•</sup>	radical hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONOO <sup>-</sup>	peroxyde nitrite
Orai 1	calcium release-activated calcium channel protein 1
PACAP	pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
PDX-1	pancreatic and duodenal homeobox 1
PERK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase
PI-3 kinase	phosphatidylinositol-3 kinase
PIP <sub>2</sub>	phosphatidyl inositol 4-5 biphosphate
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLA <sub>2</sub>	phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	phospholipase C
PPAR <sub>γ</sub>	peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$
PTGES	prostaglandine E synthase
RHM	recruited hepatic macrophages
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RP	reserve pool

LISTE DES ABREVIATIONS

---

RRP	readily releasable pool
RyR	récepteur de la ryanodine
SERCAs	sarco-endoplasmic reticulun ATPase
SGLT2	sodium /glucose transporteur de type 2
SIRT-1	sirtuine 1
SOCE	store-operated Ca <sup>2+</sup> entry channel
SRP	signal recognition particle
SSTR	récepteur à la somatostatine
SULT	sulfotransférases
SUR1	Sulfonylurea receptor 1
TLR-4	Toll-Like receptor 4
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
TRP	transient receptor potential channel
UCP-2	uncoupling protein 2
UGT	uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransférases
UPR	Unfolded Protein Response
VIP	vasoactive intestinal polypeptide
VLDL	lipoprotéines de très faible densité

## **INTRODUCTION**

J'ai réalisé ma thèse au sein de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), CNRS-UMR 5247 de Montpellier, au laboratoire de pharmacologie sous la direction des Professeurs Catherine Oiry et Gérard Cros. L'une des thématiques du laboratoire est d'identifier des molécules d'origine alimentaire (en particulier les polyphénols) qui seraient capables de protéger ou de restaurer la fonctionnalité de la cellule  $\beta$  pancréatique altérée au cours du diabète de type 2.

Le diabète de type 2 est une maladie chronique qui résulte d'une anomalie du métabolisme glucidique. Le diabète est le premier facteur de décès par maladies cardio-vasculaires ainsi que la première cause d'amputation et de cécité. Il s'agit d'un véritable problème de santé publique qui touche près de 380 millions de personnes dans le monde. Selon la Fédération Internationale du Diabète, la population du globe comptera 592 millions de diabétiques à l'horizon 2035 (dont plus de 90% de diabétiques de type 2).

L'histoire naturelle du diabète de type 2 correspond à une augmentation progressive de la glycémie qui va atteindre puis dépasser les seuils définissant le diabète (glycémie à jeun  $> 1.26$  g/L). La physiopathologie du diabète de type 2 est caractérisée par une réduction de la sensibilité des tissus-cibles à l'action de l'insuline, associée à une incapacité des cellules  $\beta$  pancréatiques à compenser cette baisse de sensibilité par une sécrétion d'insuline appropriée. L'hyperglycémie chronique qui en résulte est responsable d'une glucotoxicité induisant un stress oxydatif, notamment au niveau des tissus-cibles de l'insuline et des cellules  $\beta$  insulino-sécrétrices, ce qui va accroître l'insulino-résistance et aggraver le déficit sécrétoire en réduisant la masse cellulaire  $\beta$ .

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif du diabète type 2. Les médicaments disponibles ont pour objectif de normaliser la glycémie afin d'éviter la survenue de complications liées à l'hyperglycémie chronique. Cependant, il n'existe pas de traitement idéal en raison de possibles effets indésirables (tels que des crises d'hypoglycémie), et d'une perte progressive de l'efficacité des anti-diabétiques qui va nécessiter des associations médicamenteuses. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques ou de nouveaux médicaments reste nécessaire.

Plusieurs études ont identifié les polyphénols (métabolites secondaires présents dans les végétaux et consommés par l'Homme) comme des molécules naturelles capables de présenter des activités antidiabétiques. Ces études, réalisées *in vitro* et *in vivo*, suggèrent en effet que les

polyphénols pourraient améliorer le métabolisme glucidique notamment en améliorant la sensibilité à l'insuline, en stimulant la sécrétion d'insuline et en protégeant la cellule  $\beta$ .

Sur le plan pharmacocinétique, les polyphénols sont en grande majorité détectés au niveau plasmatique, tissulaire et urinaire sous forme de métabolites, suggérant le rôle majeur de ces métabolites dans les effets-santé qui leur sont attribués. C'est pourquoi la recherche des effets biologiques des métabolites de polyphénols a été très active.

Avant mon arrivée au laboratoire, un screening de l'activité insulino-sécrétoire de 30 métabolites de polyphénols avait été réalisé sur la lignée cellulaire  $\beta$  INS-1. Cette étude avait identifié 4 métabolites amplifiant la sécrétion d'insuline induite par le glucose : les urolithines A, B, C et D.

L'objectif de ma thèse a donc été, dans un premier temps, de mieux caractériser *in vitro* les effets insulino-sécrétoires des urolithines, afin de déterminer plus précisément leurs activités antidiabétiques potentielles en condition physiologique et en condition de stress oxydant. Dans un deuxième temps, après avoir sélectionné l'urolithine C comme étant le composé le plus prometteur, nous avons approfondi sa connaissance par l'étude de ses effets sur un modèle *ex vivo*, le pancréas isolé perfusé, de son devenir pharmacocinétique *in vivo*, de son activité régulatrice de la glycémie et de l'insulinémie chez l'animal non diabétique et de ses effets sur le modèle *in vivo* de *Caenorhabditis elegans*.

Ce travail est divisé en trois parties :

**Une première partie bibliographique** dans laquelle nous aborderons les thèmes suivants :

- Physiologie de la cellule  $\beta$  et sécrétion d'insuline ;
- Physiopathologie du diabète de type 2 ;
- Polyphénols et leurs métabolites (urolithines).

Cette partie bibliographique sera complétée par la revue bibliographique publiée en 2015 dans *Phytochem. Rev.* intitulée :

« Protection of pancreatic  $\beta$ -cell function by dietary polyphenols » par Margherita Dall'Asta, Morgane Bayle, Jérémie Neasta, Francesca Scazzina, Renato Bruni, Gerard Cros, Daniele Del Rio et Catherine Oiry.

Une deuxième **partie expérimentale** dans laquelle nous présenterons les résultats sous la forme de deux articles et d'un chapitre de résultats complémentaires :

- Article 1 : « The ellagitannin metabolite urolithin-C is a glucose-dependent regulator of insulin secretion through L-type calcium channel activation ».
- Article 2 : « Development and validation of a liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for the determination of urolithin C in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study » publié en 2016 dans *Journal of Pharmaceutical et Biomedical Analysis*.
- Résultats complémentaires *in vivo* :
  - Tests de tolérance au glucose chez le rat Wistar après une injection en aigu de l'urolithine C par voie intra-péritonéale.
  - Effet de l'urolithine C sur la modulation de la longévité de *Caenorhabditis elegans*.

Nous terminerons ce travail par une **Discussion et Conclusion générale**.

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Chapitre 1 : La physiologie de la cellule beta pancréatique**

---

### **1.1. Le pancréas**

Le pancréas est un organe situé dans la cavité abdominale en position rétro péritonéale. Sur le plan anatomique, il est composé de droite à gauche de quatre parties :

- La tête, partie la plus large et située dans le cadre duodéal,
- L'isthme ou le col, qui sépare la tête du corps,
- Le corps oblique vers le haut, la gauche et l'arrière,
- La queue, qui se prolonge dans la même direction que le corps jusqu'à la rate.

Cet organe est à la fois une glande exocrine et endocrine.

Le pancréas exocrine représente 98 % du poids total du pancréas. Il est composé de cellules acineuses formant des acini, responsables de la production du suc pancréatique. Ce liquide biologique composé de bicarbonates et d'enzymes (protéolytiques, lipolytiques et glycolytiques) est déversé par le canal pancréatique dans le duodénum et joue un rôle dans la digestion.

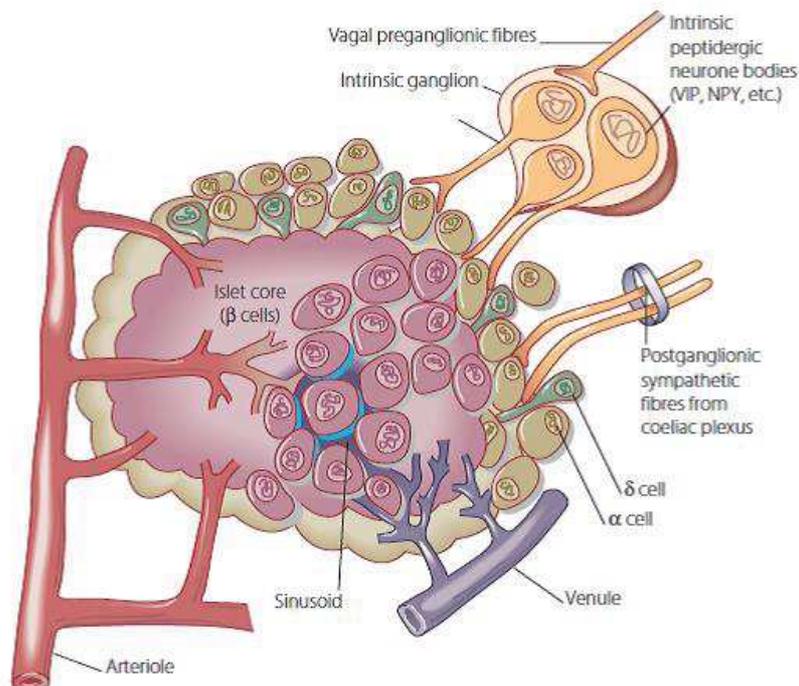
Le pancréas endocrine constitue 2 % du poids total du pancréas. Il est impliqué dans la synthèse et la libération d'hormones régulatrices de l'homéostasie glucidique. L'activité endocrine est médiée par les cellules des îlots de Langerhans.

### **1.2. Les îlots de Langerhans**

Les îlots de Langerhans sont des amas de cellules endocrines dispersés dans la partie exocrine. Ils sont composés principalement de quatre types cellulaires (**figure 1**) :

- Les cellules  $\beta$  sécrétrices d'insuline (hormone hypoglycémisante),
- Les cellules  $\alpha$  sécrétrices de glucagon (hormone hyperglycémisante)
- Les cellules  $\delta$  sécrétrices de somatostatine (hormone inhibitrice de la sécrétion d'insuline et de glucagon),
- Les cellules PP sécrétrices du polypeptide pancréatique.

D'autres cellules nommées cellules  $\epsilon$  et sécrétant la ghréline ont été décrites plus tardivement (Wierup et al., 2002).

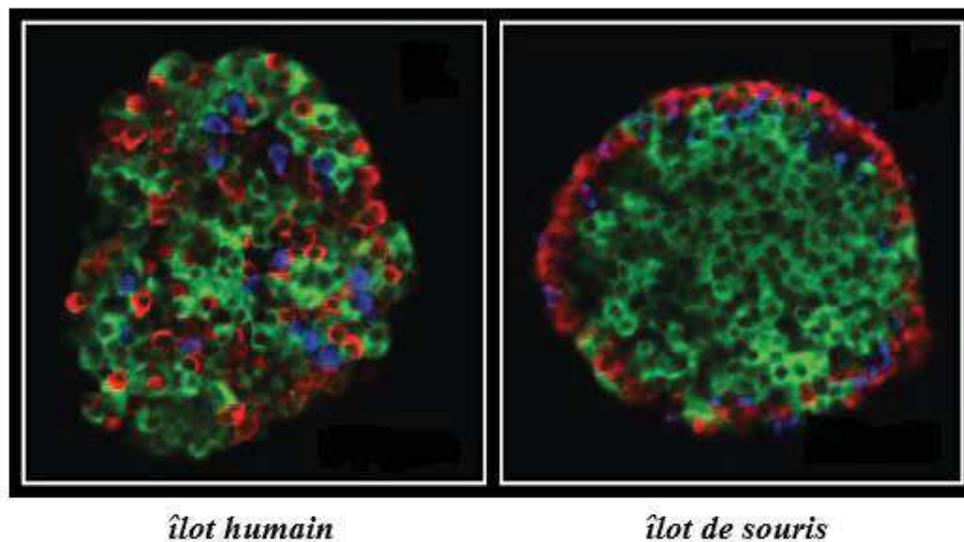


**Figure 1 : Structure d'un îlot de Langerhans de rat** (Bilous and Donnelly, 2014).

La distribution et l'abondance de chaque type cellulaire est variable en fonction des espèces (Steiner et al., 2010) . Chez le rat et la souris, les cellules  $\beta$  représentent 60 à 80 % de la masse insulaire et se trouvent au cœur de l'îlot. Les cellules  $\alpha$  (15 à 20 %), les cellules  $\delta$  (moins de 10 %) et les cellules PP (moins de 1 %) sont situées à la périphérie (**figure 2**).

Chez l'Homme, les cellules  $\beta$  sont moins nombreuses (environ 50 %) et les cellules  $\alpha$  sont présentes en plus grand nombre (30 à 40 %). Les cellules  $\delta$  représentent moins de 10 % et les cellules PP sont très peu présentes. A la différence des rongeurs, tous les types cellulaires sont présents à la fois au centre et au pourtour de l'îlot (Brissova et al., 2005; Ionescu-Tirgoviste et al., 2015; Steiner et al., 2010) (**figure 2**).

Les îlots de Langerhans sont richement vascularisés et reçoivent au moins 10 % du flux sanguin irriguant le pancréas. Les vaisseaux pénètrent au cœur des îlots et permettent aux hormones sécrétées d'avoir un effet paracrine et endocrine. Les îlots sont aussi innervés par les fibres du système sympathique et parasympathique pouvant ainsi contrôler la fonctionnalité des cellules.



**Figure 2 : Architecture d'un îlot humain (à gauche) et d'un îlot de souris (à droite)** (adapté de Brissova et al., 2005). (*cellules  $\beta$ , vert ; cellules  $\alpha$ , rouge ; cellules  $\delta$ , bleu*)

### 1.3. La cellule $\beta$ pancréatique

#### 1.3.1. Hétérogénéité de la masse cellulaire $\beta$

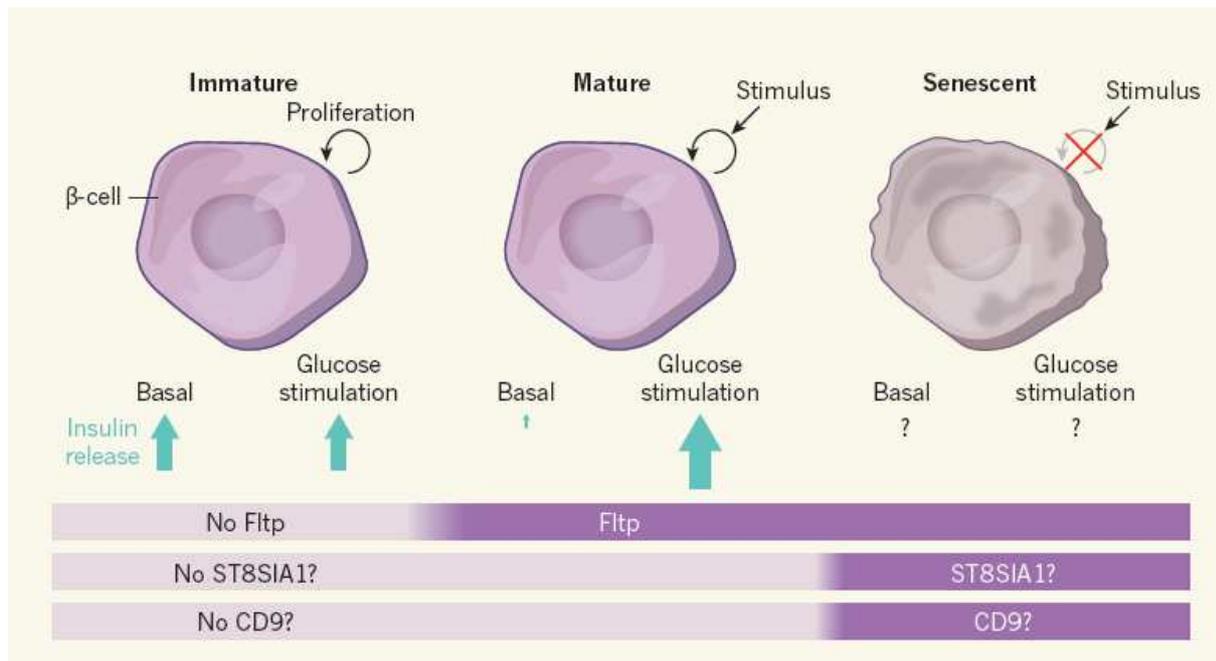
Les cellules  $\beta$  ont longtemps été considérées comme une population homogène bien que des études suggéraient la présence d'une hétérogénéité fonctionnelle (Pipeleers, 1992; Schuit et al., 1988). Récemment, des études ont montré l'existence de sous-types de cellules  $\beta$ .

En effet, des cellules  $\beta$  immatures fortement prolifératives ainsi que des cellules  $\beta$  matures quiescentes ont été identifiées à l'intérieur des îlots humains. La présence de la protéine Flattop (Fltp) semble être un marqueur de la transition des cellules immatures vers des cellules matures (Bader et al., 2016).

Dernièrement, des cellules  $\beta$  immatures appelées cellules Hubs (10 % de la masse cellulaire  $\beta$ ) ont été identifiées dans des îlots humains et de souris comme étant des cellules permettant de synchroniser la sécrétion d'insuline de l'ensemble des cellules  $\beta$  matures. Grâce à un rôle « pacemaker », elles orchestrent la réponse au glucose des cellules  $\beta$  sécrétrices d'insuline (Johnston et al., 2016).

En parallèle, une équipe de chercheurs a démontré l'existence de quatre sous-types de cellules  $\beta$  ( $\beta$ 1-4) identifiables par l'expression différentielle de deux marqueurs de surface : CD9 (une glycoprotéine) et ST8SIA1 (un glycosphingolipide) (Dorrell et al., 2016). Leur rôle est inconnu dans la cellule  $\beta$ . Il semblerait que les cellules  $\beta$ 1 ( $CD9^- / ST8SIA1^-$ ) soient les plus

abondantes avec une faible sécrétion basale d'insuline et une forte sécrétion d'insuline induite par le glucose. Les cellules du sous-type  $\beta 4$  ( $CD9^+$  /  $ST8SIA1^+$ ) seraient les moins nombreuses avec un comportement sécrétoire inverse (Dorrell et al., 2016). Aucun lien n'a été effectué entre ces sous-types cellulaires et leur état de maturité. Il se pourrait que le sous-type  $\beta 4$ , ayant une faible sécrétion d'insuline en présence de glucose, corresponde finalement à des cellules quiescentes (Bonner-Weir and Aguayo-Mazzucato, 2016) (**figure 3**).



**Figure 3 : Hypothèse de l'existence de sous-types de cellules  $\beta$**  (Bonner-Weir and Aguayo-Mazzucato, 2016)

### 1.3.2. Structure et biosynthèse de l'insuline

L'insuline est un peptide de 51 acides aminés dont le poids moléculaire est de 5,8 kDa. Elle est composée de deux chaînes : la chaîne A de 21 acides aminés et la chaîne B de 30 acides aminés. Ces chaînes sont reliées entre elles par deux ponts disulfures. Un troisième pont est présent sur la chaîne A.

Le gène de l'insuline code pour un précurseur de 110 acides aminés : la pré-pro-insuline de 11,5 kDa. Celle-ci comporte une partie N-terminale majoritairement hydrophobe qui interagit avec un complexe : *Signal Recognition Particle* (SRP). Le SRP facilite le passage de la pré-pro-insuline dans la lumière du réticulum endoplasmique dans lequel elle subit des étapes de maturation. Des enzymes protéolytiques clivent la séquence signal, formant ainsi la pro-

insuline constituée des chaînes A et B de l'insuline et reliées entre elles par le peptide C. La pro-insuline est ensuite transportée dans l'appareil de Golgi où elle entre dans des vésicules de sécrétion immatures. Elle y sera clivée pour libérer le peptide C. Les vésicules deviennent ensuite des vésicules matures lisses. L'insuline présente dans ces granules forme des cristaux (structure hexamérique) constitués de six monomères d'insuline reliés au centre par deux atomes de zinc (Li, 2014).

### 1.3.3. Action de l'insuline

L'insuline est une hormone qui régule le stockage des nutriments dans le foie, le muscle et le tissu adipeux. Elle agit sur le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines à travers l'activation du récepteur de l'insuline. Ce récepteur membranaire à activité tyrosine kinase est composé de deux sous-unités  $\alpha$  et de deux sous-unités  $\beta$ . Lorsqu'il est activé, il phosphoryle et recrute différents substrats protéiques de la famille des *Insulin Receptor Substrate* (IRS). Leur phosphorylation s'effectue sur les résidus tyrosine et favorise l'activation de deux voies de signalisation principales :

- La voie de la PI-3 kinase (phosphatidylinositol-3 kinase) /Akt qui joue un rôle essentiel dans les actions métaboliques de l'insuline et dans le transport d'ions,
- La voie des MAPK qui est essentiellement impliquée dans la différenciation et la prolifération cellulaire.

L'action de l'insuline est strictement anabolique et intervient dans le métabolisme des glucides, lipides et protéines (Dimitriadis et al., 2011).

Au niveau du métabolisme du glucose, son action hypoglycémiante fait intervenir différents mécanismes :

- Elle augmente l'entrée du glucose à l'intérieur des cellules musculaires et des adipocytes en stimulant la translocation de son transporteur GLUT-4 à la membrane plasmique.
- Elle augmente la glycolyse dans le muscle squelettique et le tissu adipeux en stimulant l'activité de l'hexokinase et de la 6-phosphofructokinase.
- Elle favorise le stockage du glucose en stimulant la synthèse de glycogène (glycogénogenèse) dans le muscle, le tissu adipeux et le foie.

- Au niveau du foie, elle inhibe la dégradation du glycogène (glycogénolyse) et la formation de glucose (néoglucogenèse) à partir de résidus non glucidiques comme les acides aminés ou le glycérol.

Au niveau du métabolisme des lipides, l'insuline favorise le stockage des graisses via plusieurs mécanismes :

- Elle inhibe la lipolyse dans le tissu adipeux et diminue par conséquent le taux d'acides gras libres circulants.
- Elle diminue le taux de lipoprotéines de très faible densité (VLDL) impliquées dans le transport des lipides du foie vers d'autres tissus.
- Elle diminue l'oxydation des acides gras dans les cellules musculaires et les hépatocytes.
- Elle stimule la synthèse de cholestérol hépatique.

Au niveau du métabolisme des protéines, cette hormone agit à différents niveaux :

- Elle favorise le transport de certains acides aminés dans les tissus.
- Elle augmente la synthèse de protéines dans le muscle, le tissu adipeux et le foie.
- Elle diminue la dégradation des protéines au niveau des muscles squelettiques.

### **1.3.4. Contrôle physiologique de la sécrétion d'insuline**

#### **1.3.4.1. Sécrétion basale d'insuline**

A l'état basal, les cellules  $\beta$  sécrètent l'insuline selon un mode pulsatile. L'oscillation de l'insulinémie permet de prévenir l'internalisation du récepteur de l'insuline et le développement de l'insulino-résistance (Gilon et al., 2002). Cette sécrétion présente des oscillations environ toutes les 15 minutes, associées à des oscillations plus amples et plus lentes dont la périodicité est d'environ 120 minutes (Lefèbvre et al., 1987).

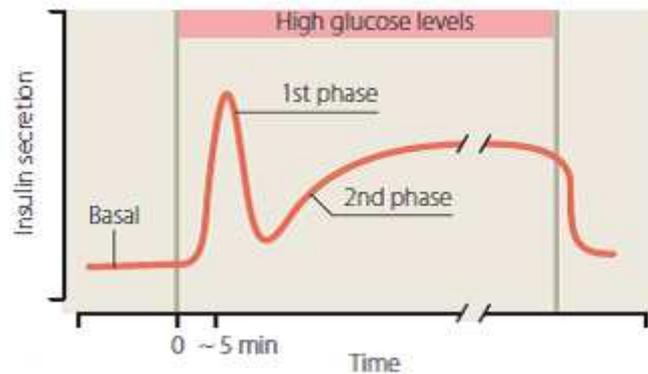
#### **1.3.4.2. Régulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose**

Le glucose est le principal stimulant de la sécrétion d'insuline. La sécrétion d'insuline induite par le glucose présente un profil sécrétoire biphasique. Cette caractéristique est retrouvée *in vivo* lors d'un clamp hyperglycémique et *ex vivo* sur des îlots isolés ou sur le modèle du pancréas isolé perfusé.

La première phase (pic précoce qui dure environ dix minutes) est caractérisée par une élévation rapide de l'insulinémie. Elle est suivie par une deuxième phase dont l'élévation de

l'insulinémie est plus lente et progressive et tend vers une concentration d'équilibre jusqu'à l'arrêt de la stimulation (**figure 4**).

La sécrétion d'insuline induite par le glucose est composée d'une voie de déclenchement et d'une voie d'amplification.



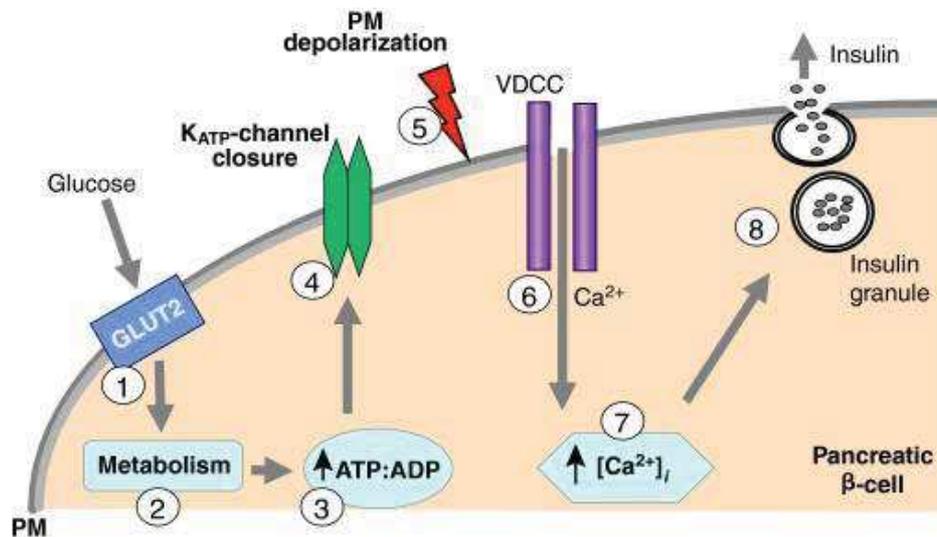
**Figure 4 : Représentation schématique de la libération biphasique de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Bilous and Donnelly, 2014).**

#### 1.3.4.2.1. La voie $K^+$ ATP dépendante : voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline ou « triggering pathway »

Le glucose déclenche la sécrétion d'insuline par une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans la cellule  $\beta$  (**figure 5**). Cette voie est relativement bien décrite dans la littérature. Lorsque la glycémie s'élève, à la suite d'un repas par exemple, la captation du glucose par la cellule  $\beta$  augmente. Le glucose entre dans la cellule grâce à un transporteur spécifique. Il s'agit du transporteur GLUT2 chez les rongeurs et des formes GLUT1 et GLUT3 chez l'Homme (McCulloch et al., 2011). Une fois dans la cellule, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase, enzyme décrite comme le détecteur du glucose (*glucose sensor*) (Matschinsky, 1996). Le G6P est majoritairement utilisé par la voie de la glycolyse et la respiration oxydative mitochondriale. Le G6P est transformé en fructose-6-phosphate qui aboutit à la formation de pyruvate. Une fois dans la mitochondrie, le pyruvate est converti en acétyl-Coenzyme A, substrat utilisé dans le cycle de Krebs conduisant à la formation d'ATP et par conséquent à l'augmentation du ratio ATP/ADP.

Cette augmentation conduit à la fermeture des canaux  $K^+$  voltage dépendants (canaux  $K_{ATP}$ ). Ces canaux sont composés de quatre sous-unités Kir6.2 formant le canal ionique et de quatre sous-unités régulatrices SUR1 (Sulfonylurea receptor 1).

L'inactivation des canaux  $K_{ATP}$  est à l'origine d'une dépolarisation de la membrane plasmique responsable d'une ouverture des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC ou  $Ca_v$ ) de type L et d'une entrée massive de calcium dans la cellule. L'élévation de la concentration de calcium au niveau intracellulaire déclenche le mécanisme d'exocytose et donc la sécrétion d'insuline.



**Figure 5 : Représentation schématique de la sécrétion d'insuline induite par le glucose** (Wang and Thurmond, 2009)

*PM : plasmic membrane ; VDCC : voltage dependant calcium channel*

#### 1.3.4.2.2. La voie $K^+$ ATP indépendante : voie d'amplification de la sécrétion d'insuline ou « amplifying pathway »

Outre ces mécanismes déclencheurs, il existe une voie métabolique amplificatrice de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, indépendante de la fermeture des canaux  $K_{ATP}$ . Cette voie a été mise en évidence grâce à différentes approches pharmacologiques (Henquin, 2000, 2009) :

- La première approche a consisté à utiliser une concentration saturante de sulfonylurées ( $2 \mu\text{M}$ ), molécule pharmacologique qui se lie au niveau de la sous-unité SUR-1 du canal  $K_{ATP}$ . Son action entraîne la fermeture des canaux  $K_{ATP}$ , la dépolarisation de la membrane et l'élévation de la concentration cytosolique de calcium.
- La deuxième approche a consisté à maintenir les canaux  $K_{ATP}$  ouverts grâce à l'action de diazoxide et utiliser une forte concentration extracellulaire de KCl ( $30 \text{ mM}$ ) afin de dépolariser la membrane plasmique des cellules  $\beta$ .

Dans ces conditions, des concentrations croissantes de glucose augmentent encore la sécrétion d'insuline avec une faible variation de la concentration intracellulaire de calcium.

Ces données suggèrent l'existence de facteurs métaboliques générés par le glucose, amplifiant la sécrétion d'insuline de manière indépendante des canaux  $K_{ATP}$ . Tous les mécanismes amplificateurs n'ont pas été identifiés mais plusieurs candidats sont proposés :

D'une part, il semblerait que des **intermédiaires du cycle de Krebs** comme le NADPH (Maechler et al., 2006) et le malonyl-CoA (El Azzouny et al., 2016; Ferdaoussi and MacDonald, 2017) soient impliqués dans l'augmentation des capacités sécrétoires :

- La génération cytosolique de NADPH contribue à l'amplification de la sécrétion d'insuline par l'implication d'une protéine d'oxydoréduction appelée glutaredoxine 1 (GRX1) (Ivarsson et al., 2005; Reinbothe et al., 2009). Des études récentes montrent que GRX1 augmente l'activité d'une protéine (SENP1) favorisant le mécanisme d'exocytose (Ferdaoussi and MacDonald, 2017).
- Le malonyl-CoA, produit à partir du citrate provenant du cycle de Krebs, inhibe la carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1). La CPT-1 permet le passage des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie favorisant la  $\beta$  oxydation des lipides. Dans le cas où la concentration intracellulaire de malonyl-CoA augmente, la  $\beta$  oxydation des lipides est inhibée, provoquant alors une augmentation de monoacylglycérol (MAG) dans le cytosol. Le MAG favorise l'exocytose des granules d'insuline par la translocation d'une protéine présynaptique, Munc13-1, qui joue un rôle dans l'amorçage des vésicules de sécrétion (Kang et al., 2006).
- Par contre, le glutamate ne semble pas impliqué dans cette phase d'amplification (Bertrand, 2002), bien que des études le décrivent comme messenger intracellulaire impliqué dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Maechler and Wollheim, 1999).

D'autre part, **l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium** favorise la libération de calcium provenant du réticulum endoplasmique via un phénomène appelé «  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$ -release » (Graves and Hinkle, 2003).

Enfin, **le glucose active également certaines voies de signalisation** impliquant l'activation de différentes protéines kinases :

- En effet, le glucose active la phospholipase C  $\beta$  (PLC $\beta$ ) au niveau de la cellule  $\beta$  (Zawalich and Zawalich, 1996) qui hydrolyse le phosphatidyl inositol 4-5 biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol 1,4,5 triphosphate (IP<sub>3</sub>) et diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> et le DAG jouent un rôle dans la sécrétion d'insuline. L'augmentation d'IP<sub>3</sub> favorise l'efflux de calcium du réticulum endoplasmique vers le cytosol et le DAG active la PKC qui sensibilise la machinerie d'exocytose (Wan et al., 2004).
- La cellule  $\beta$  exprime également diverses isoformes d'adénylate cyclase (AC) sensibles au calcium et notamment l'AC VIII (Delmeire et al., 2003). Son activation par le calcium issu de la métabolisation du glucose provoque une élévation d'AMP cyclique intracellulaire (AMPc). L'AMPc va jouer un rôle amplificateur sur les mécanismes de sécrétion grâce à ses deux effecteurs : la protéine kinase A (PKA) et l'Epac (ou AMPc-GEF).

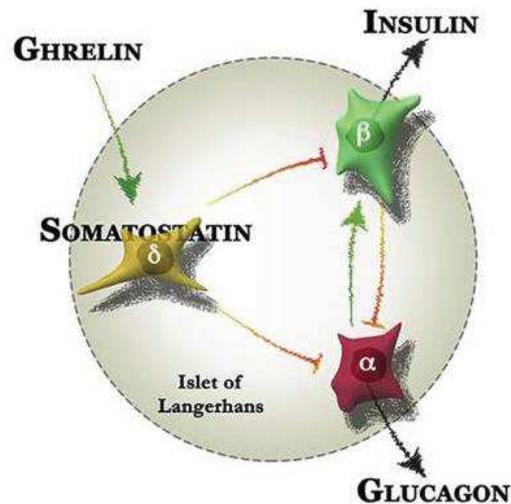
#### **1.3.4.3. Régulation hormonale de la sécrétion d'insuline**

- *Régulation autocrine et paracrine par les hormones insulaires :*

Les différents types cellulaires présents dans les îlots de Langerhans produisent des hormones impliquées dans la régulation de la sécrétion d'insuline (**figure 6**).

La somatostatine, produite par les cellules  $\delta$ , inhibe la sécrétion d'insuline en interagissant avec ses récepteurs couplés à une protéine G<sub>i</sub> appelés SSTR2 et SSTR3. L'activation de ces récepteurs inhibe la voie de l'adénylate cyclase et induit une baisse de la production d'AMPc. De plus, l'urocortine 3, co-sécrétée avec l'insuline par les cellules  $\beta$  matures, stimule la sécrétion de somatostatine (van der Meulen et al., 2015).

Le glucagon, sécrété par les cellules  $\alpha$ , est une hormone hyperglycémiant qui stimule la sécrétion d'insuline lorsque la glycémie s'élève (Quesada et al., 2006). Son récepteur couplé à une protéine G<sub>s</sub>, active la voie de l'adénylate cyclase qui conduit à l'augmentation d'AMPc. Des données récentes proposent que la ghréline, sécrétée entre autre par l'estomac (majorité) et par les cellules  $\epsilon$  des îlots de Langerhans, inhiberait la sécrétion d'insuline et de glucagon *via* une sécrétion de somatostatine (DiGrucchio et al., 2016).



**Figure 6 : Régulation paracrine de la sécrétion d'insuline** (DiGruccio et al., 2016).

- *Les incrétines :*

Le GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide-1*), le GIP (*Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*) et la CCK (*Cholécystokinine*) sont des hormones gastro-intestinales sécrétées respectivement par les cellules L, les cellules K et les cellules I de l'intestin grêle. Ces hormones ont un effet insulino-sécrétoire notamment par l'intermédiaire de la production d'AMPc.

Elles sont sécrétées au cours du repas et sont présentes à de faibles concentrations en condition de jeûne.

Le récepteur du GLP-1, exprimé à la membrane de la cellule  $\beta$ , est un récepteur couplé aux protéines G et activant classiquement la protéine  $G_s$  à l'origine de l'activation de la voie de l'adénylate cyclase favorisant la production d'AMPc capable d'activer la PKA ou Epac.

Le GLP-1 requiert la présence de glucose pour exercer son action sur la sécrétion d'insuline (activité gluco-dépendante). En présence d'une faible concentration de glucose, la membrane de la cellule  $\beta$  est hyperpolarisée (-70 mV) en raison de l'ouverture des canaux  $K_{ATP}$ . Dans ce cas, la dépolarisation induite par le GLP-1 n'est pas suffisante pour atteindre le seuil permettant l'excitation de la membrane et la sécrétion d'insuline. En revanche, en synergie avec le glucose, le GLP-1 potentialise la sécrétion d'insuline (Holst, 2007).

Les expériences menées *in vitro* et *in vivo* utilisent majoritairement le GLP-1 à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. A des doses beaucoup plus faibles mais physiologiques (1-10 pM), le GLP-1 pourrait également moduler la sécrétion d'insuline de manière PKA indépendante en activant la voie de la  $PLC\beta$  (Shigeto et al., 2017).

La CCK agit au niveau de la cellule  $\beta$  en se liant à son récepteur CCK<sub>1</sub> qui est un récepteur couplé aux protéines G, et en particulier couplé à G<sub>s</sub> et G<sub>q</sub>. La production d'AMPc d'une part et la production d'IP<sub>3</sub> d'autre part, favorisent la sécrétion d'insuline (Dufresne, 2006; Ning et al., 2015).

- *Autres régulations hormonales :*

Il existe d'autres régulations endocrines comme par exemple celles induites par la leptine et l'hormone de croissance qui ont un effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline.

Au contraire, les œstrogènes favorisent la sécrétion d'insuline (Fu et al., 2013).

#### **1.3.4.4. Régulation nerveuse de la sécrétion d'insuline**

Les fibres nerveuses présentes au sein des îlots de Langerhans permettent une régulation sympathique et parasympathique de la sécrétion d'insuline.

La régulation parasympathique est médiée par des neurotransmetteurs comme l'acétylcholine (neuromédiateur majoritaire), le VIP (*Vasoactive Intestinal Polypeptide*), le PACAP (*Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide*) et le GRP (*Gastrin Releasing Peptide*). Cette régulation a plutôt un rôle positif sur la sécrétion d'insuline (Gilon and Henquin, 2001). L'acétylcholine interagit avec le récepteur muscarinique M<sub>3</sub> couplé à une protéine G<sub>q</sub> favorisant l'exocytose des granules d'insuline via l'activation de la PLC $\beta$ .

L'acétylcholine active également la voie de phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) aboutissant à la production d'acide arachidonique et de lysophosphatidylcholine, lequel dépolarise la membrane plasmique par un mécanisme dépendant du sodium. Lorsque la membrane est déjà dépolarisée par un sécrétagogue comme le glucose, la dépolarisation additionnelle induit une élévation soutenue de la concentration de calcium cytosolique et donc une amplification de la sécrétion d'insuline.

La régulation nerveuse sympathique majoritairement médiée par la noradrénaline, mais aussi par la galanine et le peptide Y, inhibe la sécrétion basale et la sécrétion induite par le glucose via l'activation de récepteurs  $\alpha_2$  adrénergiques couplés à une protéine G<sub>i</sub> diminuant la production d'AMPc (Gilon and Henquin, 2001).

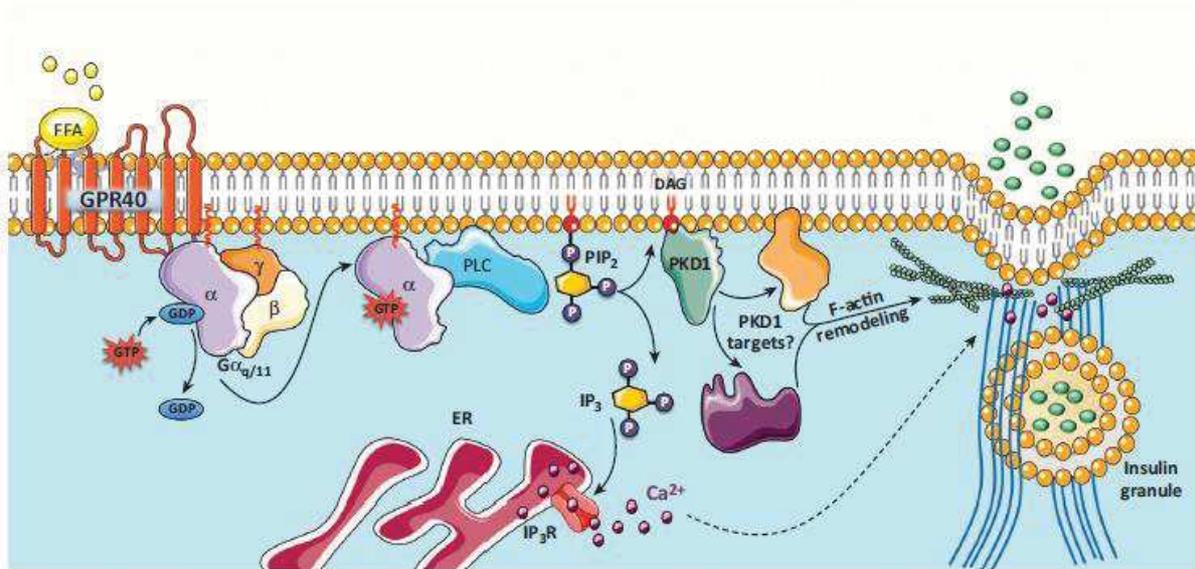
#### 1.3.4.5. Régulation de la sécrétion d'insuline par les acides gras

Les acides gras libres (AGL) potentialisent la sécrétion d'insuline induite par le glucose par l'intermédiaire d'un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G appelé GPR40 ou FFAR1 (free fatty acid receptor 1). Ce récepteur, activé par les AGL à moyenne et longue chaîne, active la voie de la PLC $\beta$ . Le DAG généré active des protéines kinases qui phosphorylent et activent PKD1 impliquée dans l'exocytose des granules d'insuline par le remodelage des filaments d'actine (dépolymérisation). La production d'IP<sub>3</sub> favorise l'efflux de Ca<sup>2+</sup> du réticulum endoplasmique vers le cytosol (Mancini and Poitout, 2013) (**figure 7**).

L'implication des AGL dans la sécrétion d'insuline a été démontrée *in vivo*. En effet, la surexpression de GPR40 chez des souris transgéniques normales ou diabétiques améliore la tolérance au glucose et la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Nagasumi et al., 2009).

Récemment, des chercheurs ont montré l'existence d'un nouveau mécanisme dans lequel le récepteur GPR40 favoriserait l'ouverture de canaux TRPC3, à l'origine d'une dépolarisation de la membrane plasmique et de la potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Yamada et al., 2016).

De plus, le métabolisme intracellulaire des AGL génère la synthèse de molécules lipidiques signal comme l'acyl-CoA à longue chaîne et le DAG. L'acyl-CoA à longue chaîne pourrait acyler des protéines essentielles à la fusion des granules d'insuline (Fu et al., 2013). Le DAG, par activation de la PKC, est également impliqué dans la sécrétion d'insuline. Le DAG se lie également à la protéine pré-synaptique Munc13-1 pour favoriser la sécrétion d'insuline (Rhee et al., 2002).



**Figure 7 : Voies de signalisation médiées par l'activation du GPR40 par les AGL** (Mancini and Poitout, 2013).

En résumé, la présence de nombreux récepteurs (à des hormones, neurotransmetteurs, acides gras libres...) présents à la membrane de la cellule  $\beta$ , permet la modulation de la sécrétion d'insuline en inhibant ou activant des voies de signalisation à l'intérieur de la cellule telles que la voie de l'adénylate cyclase et de l'AMPC et la voie de la PLC (**figure 8**).

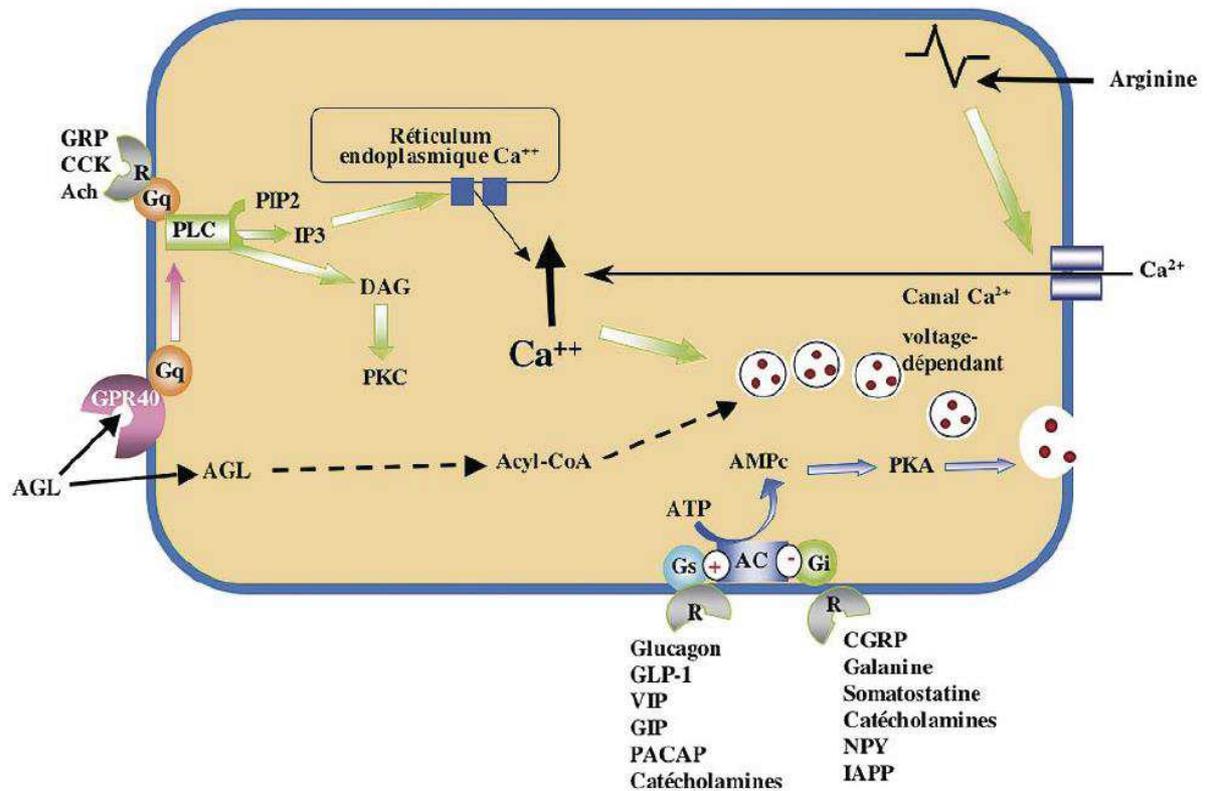


Figure 8 : Modulation de la sécrétion d'insuline (Magnan and Ktorza, 2005).

#### 1.3.4.6. Régulation de la sécrétion d'insuline par les acides aminés

Les acides aminés seuls n'ont qu'un faible effet sur la sécrétion d'insuline. En revanche, l'association de certains acides aminés entre eux comme la leucine et la glutamine peut potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

La leucine peut activer la glutamate déshydrogénase qui convertit le glutamate en  $\alpha$ -cetoglutarate (Sener and Malaisse, 1980). En parallèle, la glutamine est convertie en glutamate dans le cytosol par la glutaminase. La glutamine entre dans le cycle de Krebs grâce à l' $\alpha$ -cetoglutarate et permet la production d'ATP impliqué dans l'amplification de la sécrétion d'insuline.

De manière indirecte, un jeûne favorise le catabolisme des protéines des muscles squelettiques et des acides aminés libres dont l'alanine et la glutamine qui entraînent la sécrétion de glucagon par les cellules  $\alpha$  des îlots de Langerhans. L'élévation de glucagon augmente le taux de glucose sanguin qui déclenchera la sécrétion d'insuline.

La lysine et l'arginine sont deux acides chargés positivement capables de pénétrer facilement dans la cellule  $\beta$ . Une fois dans la cellule, leur charge positive permet de dépolariser la membrane plasmique et favoriser l'entrée de calcium dans la cellule (Smith et al., 1997).

### 1.3.5. Exocytoses des granules de sécrétion d'insuline

Les granules d'insuline sont répartis en deux pools :

- Le pool rapidement mobilisable : RRP (*Readily Releasable Pool*),
- Le pool de réserve : RP (*Reserve Pool*),
- Le pool hypersensible au calcium : HCSP (*Highly Calcium-Sensitive Pool*).

La première phase de sécrétion d'insuline correspondrait au relargage des granules des pools HCSP et RRP, alors que la deuxième phase impliquerait le pool RP (Rorsman and Renström, 2003).

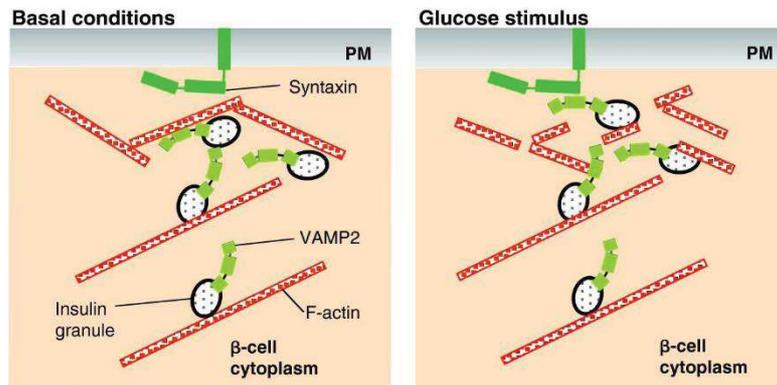
L'exocytose est le phénomène au cours duquel l'insuline présente dans le cytoplasme est déversée dans le milieu extracellulaire. Pour cela, la membrane des vésicules de sécrétion fusionne avec la membrane plasmique pour libérer le contenu en insuline.

Le mécanisme moléculaire de l'exocytose a été relativement bien décrit dans les neurones et semble similaire à ce qui se produit dans la cellule  $\beta$ . Il requiert l'intervention de plusieurs acteurs.

#### - *Rôle du cytosquelette*

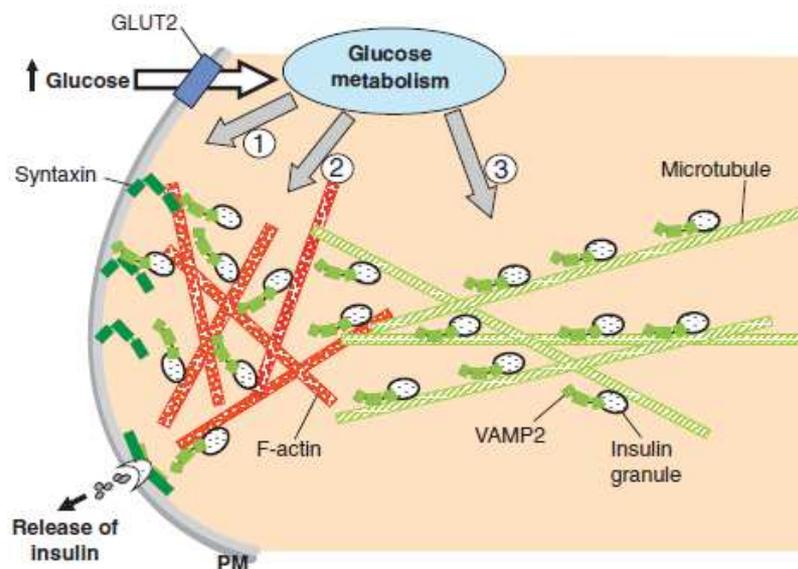
Les filaments d'actine sont reconnus depuis plusieurs années comme jouant un rôle dans l'exocytose des granules d'insuline. L'actine polymérisée ou actine-F (actine fibrillaire) forme un réseau dense qui bloque le mouvement des granules vers la membrane plasmique empêchant alors l'exocytose. En effet, certaines drogues (latrunculine, cytochalasin B ou E) qui augmentent le ratio actine-G (globulaire) / actine-F (fibrillaire) potentialisent la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

De plus, le réseau de filaments d'actine rend la protéine syntaxine (cf. protéines du complexe SNARE) inaccessible aux granules d'insuline qui est nécessaire au phénomène d'exocytose. Le glucose déclenche la sécrétion d'insuline en favorisant la réorganisation des filaments d'actine permettant ainsi l'accessibilité de la syntaxine au granule d'insuline (Thurmond et al., 2003) (**figure 9**).



**Figure 9 : Réorganisation des filaments d'actine lors d'une stimulation au glucose permettant l'accessibilité du granule d'insuline à la syntaxine (Wang and Thurmond, 2009).**

Le réseau de microtubules joue également un rôle important dans la deuxième phase de sécrétion d'insuline. Le glucose permet la polymérisation des microtubules favorisant le déplacement des granules d'insuline du pool de réserve vers la membrane plasmique. C'est la kinésine, une protéine dépendante de l'ATP, qui permet le déplacement des granules d'insuline le long des microtubules vers les filaments d'actine (Donelan et al., 2002) (**figure 10**).



**Figure 10 : Implication du réseau de microtubules dans le recrutement des granules d'insuline à la membrane plasmique sous l'influence du métabolisme du glucose (Wang and Thurmond, 2009).**

- *Rôle des petites GTPases*

Il existe plusieurs familles de petites GTPases telles que les Rho GTPases, les Rab GTPases et les Ras-like GTPases qui interviennent à différentes étapes de l'exocytose. Les GTPases sont activées grâce à un échangeur de guanine qui permet de transformer le GDP en GTP.

Les Rho GTPases telles que Cdc42 et Rac1 participent à la régulation du remodelage des filaments d'actine induit par le glucose. Cdc42 associée à la protéine VAMP-2 (vesicle associated membrane protein) est impliquée dans l'amorçage des granules d'insuline à la membrane plasmique (Nevins and Thurmond, 2005).

Les protéines Rab3A et Rab27, de la famille des Rab GTPases, sont également impliquées dans le mécanisme d'exocytose. Une étude a montré que des souris *Rab3A*<sup>-/-</sup> présentaient une intolérance au glucose avec une altération des deux phases de la sécrétion d'insuline.

De plus, la périfusion d'îlots de souris *Ra1A*<sup>-/-</sup> (protéine de la famille des Ras-Like GTPases) avec du glucose, conduit à un profil biphasique de la sécrétion d'insuline considérablement altéré (Lopez et al., 2008).

- *Les protéines du complexe SNARE*

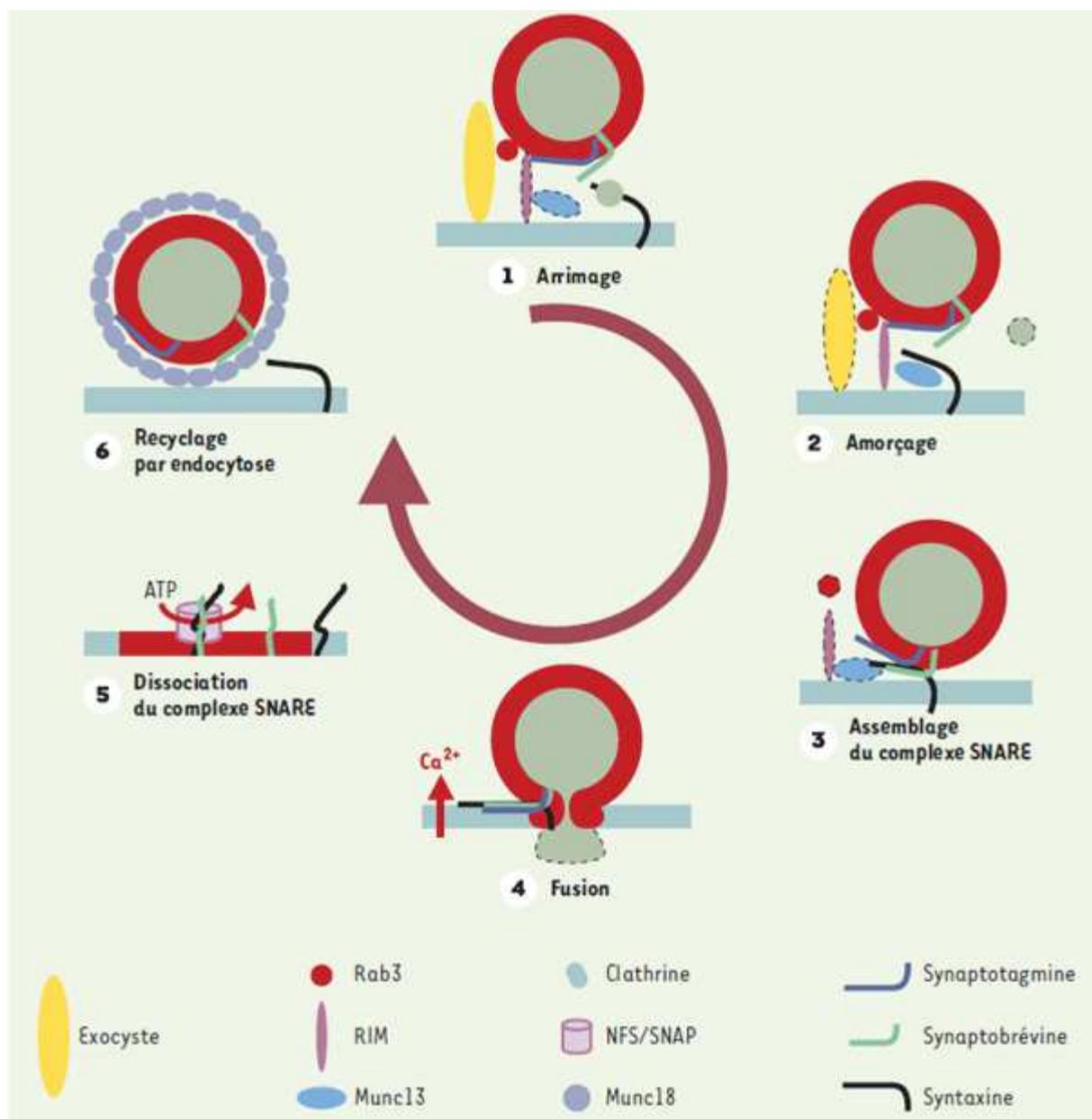
Le complexe SNARE est un complexe qui implique les protéines v-SNARE et t-SNARE. Il permet de rapprocher la membrane des vésicules à la membrane plasmique et d'induire leur fusion pour déclencher l'exocytose. Pour cela, il crée une « tresse » très stable composée de quatre hélices  $\alpha$  provenant des protéines t-SNARE et v-SNARE :

- une hélice provenant de la synaptobrevine ou VAMP-2
- une hélice provenant de la syntaxine
- deux hélices provenant de la SNAP-25

Plusieurs protéines SNARE ont été identifiées. Les protéines SNARE, localisées sur la membrane plasmique des vésicules contenant l'insuline, sont des v-SNARE (vesicle-SNARE). Il s'agit de la synaptobrevine également appelée VAMP-2. Les protéines SNARE localisées à la membrane plasmique sont des t-SNARE (target-SNARE). Il s'agit de la syntaxine et SNAP-25.

La fusion membranaire est composée de six étapes : l'arrimage (*docking*), l'amorçage (*priming*), l'assemblage du complexe SNARE, la fusion proprement dite, la dissociation du complexe SNARE et le recyclage des vésicules par endocytose (**figure 11**).

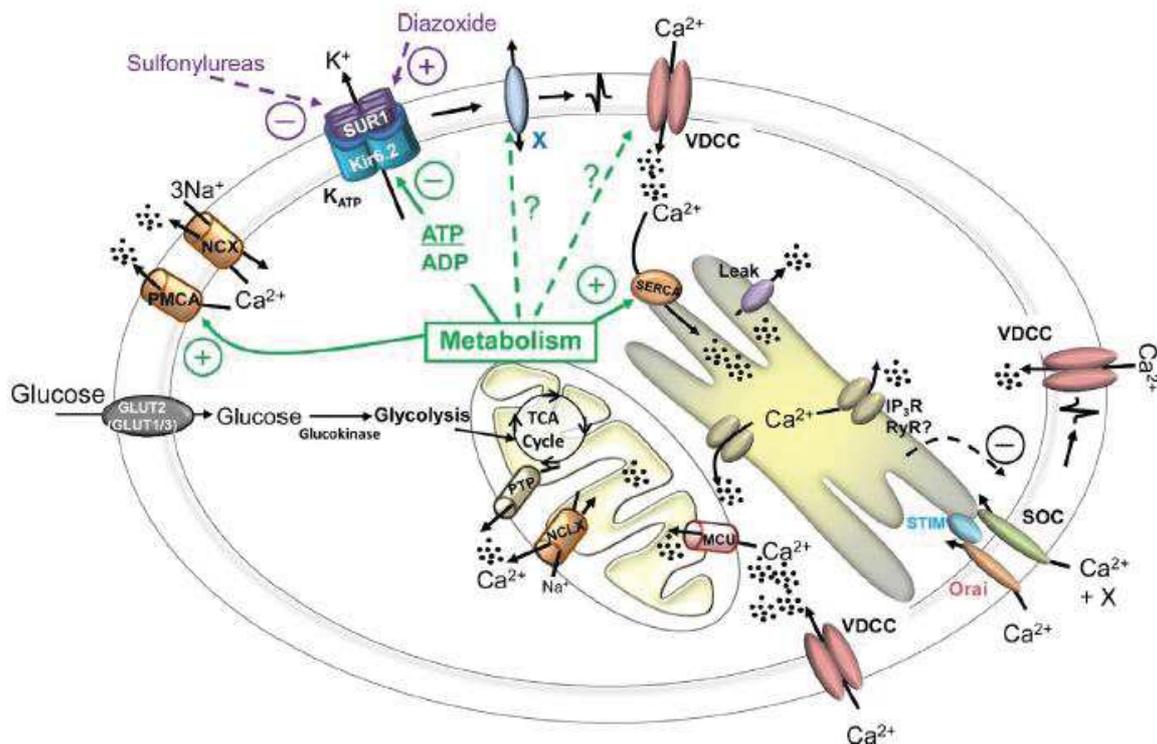
Au cours de l'arrimage, la syntaxine interagit avec Munc-13 permettant d'acquérir une conformation favorable à la fusion. De cette façon, la syntaxine est activée et interagit avec SNAP-25 et la synaptobrevine pour former l'assemblage du complexe SNARE dans un état encore incomplet. C'est l'entrée de calcium, secondaire à une stimulation, qui activera la synaptotagmine (protéine senseur de calcium) et qui s'associera au complexe SNARE et à la membrane plasmique permettant la fusion et la libération de l'insuline. Le complexe SNARE sera ensuite dissocié puis les vésicules seront recyclées par endocytose (Galli et al., 2002).



**Figure 11 : Modèle du cycle de fusion des vésicules de sécrétion** (Galli et al., 2002).

### 1.3.6. Le rôle du calcium dans la cellule $\beta$

L'augmentation de calcium intracellulaire au niveau de la cellule  $\beta$ , joue un rôle primordial dans le contrôle de la sécrétion d'insuline. Il peut provenir du milieu extracellulaire grâce à l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage ( $Ca_v$ ) et de canaux TRP indépendants du voltage. L'augmentation du calcium intracellulaire peut également provenir d'organites tels que le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (**figure 12**).



**Figure 12 : Principaux mécanismes par lesquels le glucose entraîne des variations de la concentration cytosolique de calcium (Gilon et al., 2014)**

#### 1.3.6.1. Le calcium d'origine extracellulaire

##### a) Les canaux calciques voltage dépendant (VDCC ou $Ca_v$ )

Lorsque la dépolarisation induite par le glucose atteint le seuil d'activation de canaux dépendants du voltage, des potentiels d'action apparaissent. Ces potentiels d'action sont dus notamment à l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC ou  $Ca_v$ ). Des concentrations modérées et stimulantes de glucose (entre 7 et 15 mM) entraînent une ouverture intermittente des  $Ca_v$  à l'origine de potentiels d'action discontinus à l'origine des oscillations de la concentration cytosolique de calcium. En revanche, lorsque la concentration

de glucose atteint 20 mM, les potentiels d'action deviennent continus et la concentration cytosolique de calcium augmente de manière soutenue (Gilon et al., 2014).

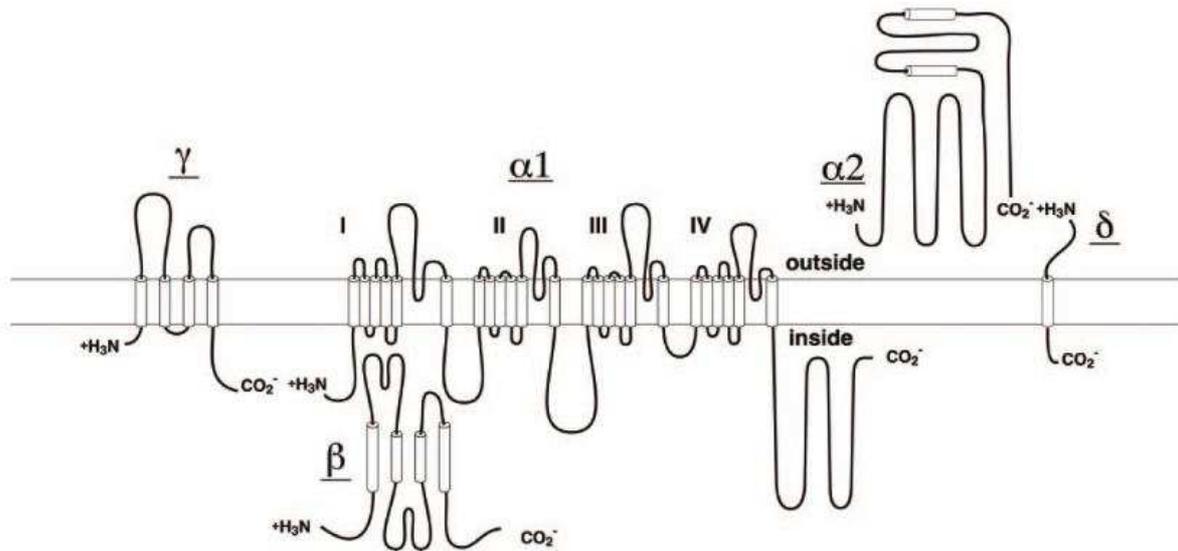
Les  $Ca_v$  sont des canaux exprimés de manière ubiquitaire dans divers types cellulaires. Lors d'une dépolarisation de la membrane plasmique, les  $Ca_v$  subissent un changement rapide de conformation passant d'un état imperméable à un état perméable aux  $Ca^{2+}$ . L'ouverture du canal entraîne une entrée massive de calcium à l'intérieur de la cellule, dans laquelle il exercera une action de second messenger et activera des voies de signalisation. Les  $Ca_v$  traduisent donc le signal électrique en événements intracellulaires médiés par le calcium (Catterall, 2000).

Les  $Ca_v$  peuvent, entre autre, être classés selon leur seuil d'activation (Velasco et al., 2016). Dans ce cas, deux classes de canaux se distinguent :

- les canaux activés par un *haut voltage* représentés par :
  - les canaux de type L ( $Ca_v$  1.1-1.4)
  - les canaux de type P/Q ( $Ca_v$  2.1)
  - les canaux de type N ( $Ca_v$  2.2)
  - les canaux de type R ( $Ca_v$  2.3)
- les canaux activés par un *faible voltage* (autour de  $-55\text{mV}$ ) représentés par les canaux de type T ( $Ca_v$  3).

Les  $Ca_v$  sont constitués d'une sous-unité  $\alpha_1$  de 190 à 250 kDa formant le pore et qui est la principale sous-unité responsable de la conduction de l'ion, de la détection du voltage et constitue le site de liaison du canal.

Les  $Ca_v$  sont composés également de sous-unités auxiliaires :  $\alpha_2/\delta$  (extracellulaire),  $\beta$  (intracellulaire) et  $\gamma$  (transmembranaire) (**figure 13**). Elles modulent les cinétiques d'activation et d'inactivation ainsi que les propriétés de déclenchement des  $Ca_v$  (Buraei and Yang, 2013; Davies et al., 2007; Kang and Campbell, 2003). A titre d'exemple, des auteurs montrent qu'une délétion génétique de la sous-unité  $\alpha_2\delta-1$  (sous-unité  $\alpha_2/\delta$  dominante dans la cellule  $\beta$ ) chez des souris, altère la cinétique et l'amplitude de la réponse calcique et diminue la libération d'insuline, suite à une stimulation au glucose dans les îlots pancréatiques (Mastrolia et al., 2017).



**Figure 13 : Structure d'un Cav1 (Catterall, 2005).**

Chez l'Homme, les canaux de type L, P/Q et T jouent un rôle dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Cependant, ils n'interviennent pas au niveau des mêmes étapes de la sécrétion (Braun et al., 2008). Bien que présents chez l'Homme, les canaux de type N ( $Ca_v 2.2$ ) ne sont pas exprimés dans la cellule  $\beta$  (Taylor, 2005).

○ *Ca<sub>v</sub> de type L (Ca<sub>v</sub> 1) :*

Il semblerait que dans toutes les espèces étudiées, le  $Ca_v$  de type L ( $Ca_v 1$ ) soit le principal  $Ca_v$  présent dans la cellule  $\beta$  (Yang and Berggren, 2006). Le sous-type majoritaire n'est cependant pas le même en fonction des espèces. Chez le rat, la souris et dans la lignée cellulaire INS-1, les canaux  $Ca_v 1.2$  (sous-unité  $\alpha_{1C}$ ) sont majoritaires, alors que chez l'Homme il s'agit plutôt des  $Ca_v 1.3$  (sous-unité  $\alpha_{1D}$ ) (Nitert et al., 2008; Reinbothe et al., 2013).

En présence de glucose, les  $Ca_v$  de type L jouent un rôle essentiel dans la genèse du courant électrique. Ils sont activés lorsque le potentiel de membrane atteint -50 mV, avec une activité maximale observée dès -20 mV.

L'utilisation d'un antagoniste tel que la nifédipine, inhibe très fortement l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule  $\beta$  et abolit la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

Il existe une interaction entre les  $Ca_v$  de type L et des protéines de l'exocytose telles que la syntaxine 1A (Yang et al., 1999), SNAP-25 et la synaptotagmine (Rorsman and Renström, 2003). Cette interaction favorise l'exocytose.

L'inhibition de ces canaux par un antagoniste sélectif tel que l'isradipine, est liée à une inhibition complète de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. L'importance des  $Ca_v$  de type L dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose, résulte majoritairement de leur rôle essentiel dans la genèse de l'activité électrique. Leur rôle dans l'exocytose proprement dite de l'insuline serait modeste (30%).

○ *Les  $Ca_v$  de type P/Q :*

Ils sont plus étroitement couplés au phénomène d'exocytose que les  $Ca_v$  de type L puisque l'utilisation d'un inhibiteur des  $Ca_v$  de type P/Q supprime à plus de 80 % l'exocytose (Braun et al., 2008).

○ *Les  $Ca_v$  de type R :*

Bien qu'ils ne semblent pas être impliqués dans la sécrétion d'insuline chez l'Homme (Braun et al., 2008), ils joueraient un rôle fondamental dans les îlots de souris au niveau de la deuxième phase de sécrétion d'insuline (Jing et al., 2005).

○ *Les  $Ca_v$  de type T :*

Sur le modèle des cellules INS-1, ces canaux calciques facilitent la sécrétion d'insuline induite par le glucose en améliorant l'excitabilité générale de la cellule  $\beta$  (Bhattacharjee et al., 1997).

A la concentration de 20 mmol/L de glucose, les  $Ca_v$  de type L sont responsables de la quasi-totalité du courant calcique (Braun et al., 2008), alors qu'en présence d'une faible concentration (6 mmol/L), les  $Ca_v$  de type T et de type P/Q sont majoritairement impliqués dans l'activité électrique induite par les ions calcium (Braun et al., 2008).

L'activité des  $Ca_v$  peut également être modulée par des voies indépendantes du voltage. Le courant des  $Ca_v$  dans les îlots de Langerhans de rat est réduit suite à l'activation des récepteurs muscarinique de type 1. C'est la déplétion en  $PIP_2$  provoquée par l'activation du récepteur muscarinique qui serait responsable de la baisse de l'activité des  $Ca_v$  (de la Cruz et al., 2016). De plus, des kinases semblent également participer à la modulation de l'activité des  $Ca_v$ . La PKA et la CaMK II (protéine kinase II dépendante du calcium et de la calmoduline) sont capables d'augmenter l'activité des  $Ca_v$  de type L et la PKC jouerait un rôle dans le maintien fonctionnel du canal. Le rôle des protéines kinases semble toutefois mineur dans le

mécanisme d'exocytoses des granules d'insuline (Rorsman et al., 2012; Yang and Berggren, 2006).

***b) Les canaux TRP (transient receptor potential channel)***

Les canaux TRP, présents à la membrane plasmique, régulent également la concentration de calcium dans la cellule  $\beta$ . Leur activation est indépendante du voltage. Ils peuvent contribuer à l'entrée de calcium à l'intérieur de la cellule soit directement en étant perméables à cet ion, soit indirectement en permettant le passage d'autres ions à l'origine d'une dépolarisation de la membrane plasmique et de l'activation des  $Ca_v$ .

Les canaux TRP sont des canaux cationiques non spécifiques, divisés en six sous-familles et exprimés dans de nombreuses cellules (Pedersen et al., 2005) :

- TRP canonical (TRPC ; TRPC1-7)
- TRP melastatin (TRPM ; TRPM1-8)
- TRP vanilloïde (TRPV ; TRPV1-6)
- TRP polycystin (TRPP ; TRPP2, TRPP3, TRPP5)
- TRP mucolipin (TRPML ; TRPML1-3)
- TRP ankyrin (TRPA ; TRPA1)

Plusieurs TRP appartenant à ces différentes sous-familles ont été identifiés dans les cellules  $\beta$ , cependant l'expression de ces canaux varie en fonction du modèle cellulaire étudié.

Dans les lignées cellulaires INS-1 et MIN-6, divers TRP ont été décrits tels que TRPV3, TRPV4, TRPC1, TRPC4, TRPC6, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5 (Colsoul et al., 2011).

De nombreux TRP ont également été décrits dans les îlots de souris (TRPV3, TRPV4, TRPC1, TRPC3, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5). De plus TRPML1 et TRPP2 semblent être fortement exprimés (Yamada et al., 2016; Colsoul et al., 2011).

Dans les îlots de rat, seuls les canaux TRPV5, TRPM2, TRPC1, TRPC3 et TRPC4 ont été décrits (Colsoul et al., 2011; Yamada et al., 2016).

L'expression des TRP dans les îlots humains n'a été décrite que récemment (Marabita and Islam, 2017). Les TRP identifiés appartiennent à 4 sous-familles : TRPC (TRPC1), TRPM (TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM7), TRPML (TRPML1, TRPML2, TRPML3) et TRPP (TRPP2). La présence de TRPM5 dans les îlots de Langerhans humains semble d'avantage controversée (Marabita and Islam, 2017; Prawitt et al., 2003).

Les TRP décrits ci-dessous sont les TRP jouant un rôle dans la sécrétion d'insuline.

○ *Les TRPC :*

TRPC1 est capable de s'associer à STIM1 (stromal interacting molecule 1) et Orai1 (calcium release-activated calcium channel protein 1) pour former un canal SOCE (Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry channel). STIM1 qui est situé à la membrane du réticulum endoplasmique, joue un rôle de senseur calcique. Orai1 qui est présent à la membrane plasmique, forme un canal ionique perméable au calcium. En cas de déplétion en calcium au niveau du réticulum endoplasmique, le complexe SOCE favorise l'entrée de calcium à l'intérieur de la cellule  $\beta$  afin de renouveler les stocks calciques du réticulum endoplasmique (Liao et al., 2009).

L'inhibition de TRPC1 ou de Orai1 dans le modèle des îlots de rat, réduit l'amplitude des oscillations de la concentration intracellulaire de calcium (Sabourin and Allagnat, 2016; Sabourin et al., 2015).

TRPC3 qui est décrit dans les îlots de rat mais qui semble être absent dans les îlots humains, ne semble pas impliqué dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Sabourin et al., 2015). En revanche, il pourrait être impliqué dans l'influx de calcium médié par le GLP-1 (Yamada et al., 2016).

○ *Les TRPM :*

Plusieurs TRPM seraient impliqués dans la sécrétion d'insuline au niveau de la cellule  $\beta$  (**figure 14**).

L'implication de TRPM2 dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose est illustrée par la survenue d'une intolérance au glucose et d'une altération de la sécrétion d'insuline chez des souris *trpm2* *-/-*. TRPM2 semble également impliqué dans l'action de certains sécrétagogues puisque chez ces mêmes souris, l'effet du GLP-1 sur la sécrétion d'insuline est altéré (Uchida et al., 2011).

Les TRPM2 sont activés par des facteurs très variés tels que l'ADP, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'acide arachidonique et la PKA (MacDonald, 2011).

Les TRPM3, seraient activés au niveau de la cellule  $\beta$  par des stéroïdes et notamment par la pregnénolone sulfate, un neuro-stéroïde. Cette activation serait à l'origine d'un influx rapide de calcium à travers le canal TRPM3 et d'une élévation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans le modèle des cellules INS-1 et des îlots de Langerhans de souris (Thiel et al., 2013; Wagner et al., 2008).

TRPM4 et TRPM5 sont les deux canaux TRP imperméables au calcium. Ils sont activés par le calcium intracellulaire et permettent l'entrée de sodium dans la cellule, générant une dépolarisation favorable à l'ouverture de  $Ca_v$  et à une entrée de calcium dans la cellule. L'implication de TRPM5 dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose est illustrée par la survenue d'une intolérance au glucose chez des souris *trmp5*<sup>-/-</sup> (Brixel et al., 2010).

L'inhibition de TRPM4 dans les lignées cellulaires  $\beta$  de rat (INS-1, RINm5F) et de souris (MIN-6,  $\beta$ -TC3) diminue de façon significative la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Cette diminution serait due à une baisse de la concentration intracellulaire de calcium. Ceci suggère que les courants dépolarisants générés par TRPM4 sont une composante clé dans le contrôle des signaux calciques nécessaires à la sécrétion d'insuline (Cheng et al., 2007; Marigo et al., 2009).

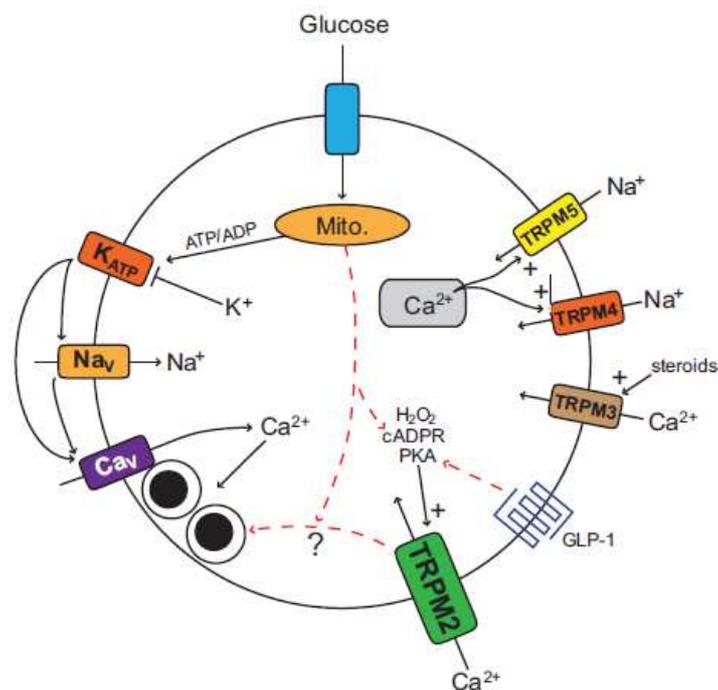


Figure 14 : Implication des TRPM dans la sécrétion d'insuline (MacDonald, 2011).

○ Les TRPV :

Le TRPV4 est absent dans les îlots humains mais il est décrit dans les îlots de souris et dans certaines lignées cellulaires  $\beta$ . Il augmente la sécrétion d'insuline induite par le glucose selon un mécanisme calcium dépendant (Skrzypski et al., 2013).

### 1.3.6.2. Le calcium d'origine intracellulaire

#### 1) *Le calcium du réticulum endoplasmique :*

Le calcium cytosolique peut être capté au niveau du réticulum endoplasmique grâce à des pompes calcium-ATPases nommées SERCAs (*sarco-endoplasmic reticulum ATPase*) situées à la membrane de cet organite (**figure 12**). Trois gènes ont été identifiés chez l'Homme (ATP2A1-3) codant pour onze pompes différentes. Les cellules  $\beta$  n'expriment que deux isoformes de SERCA : SERCA2b qui est exprimée de manière ubiquitaire dans les cellules et SERCA3, exprimée seulement dans les cellules  $\beta$  (VáRadi et al., 1996).

Les SERCAs sont des co-transporteurs  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ . Ils captent à la fois deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  et deux à trois ions  $\text{H}^{+}$  en hydrolysant une molécule d'ATP.

La captation rapide du calcium intracellulaire par les SERCAs permet de limiter l'augmentation de la concentration cytosolique de calcium déclenchée par la dépolarisation et ainsi de contrôler la quantité d'insuline sécrétée (Hughes et al., 2006). Leur inhibition provoque une élévation de la concentration intracellulaire de calcium à l'état basal.

Deux types de récepteurs peuvent déclencher la libération de calcium du réticulum endoplasmique vers le cytosol :

- le récepteur de l' $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) qui est composé de trois isoformes :  $\text{IP}_3\text{R1}$ ,  $\text{IP}_3\text{R2}$ ,  $\text{IP}_3\text{R3}$ . Les  $\text{IP}_3\text{R}$  sont activés par l' $\text{IP}_3$  et par le calcium lui-même, participant ainsi au phénomène d'amplification de libération du calcium par le calcium ou CICR ( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release) (Foskett et al., 2007).
- le récepteur de la ryanodine (RyR) qui est composé de trois isoformes : RyR1, RyR2 et RyR3. Des études suggèrent que RyR2 est l'isoforme prédominante voire la seule exprimée dans la cellule  $\beta$ . L'évaluation de l'implication des RyR dans la libération de calcium est délicate du fait du manque de spécificité des agents pharmacologiques utilisés.

#### 2) *Le calcium d'origine mitochondrial :*

La mitochondrie est aussi un organite connu comme étant capable de stocker et de libérer du calcium dans le cytosol (Chinopoulos and Adam-Vizi, 2010).

La captation du calcium par la mitochondrie stimule le métabolisme oxydatif et par conséquent la synthèse d'ATP.

### **1.3.6.3. Activation de voies de signalisation impliquées dans la sécrétion d'insuline**

L'entrée de calcium induite par le glucose active différentes kinases dans la cellule  $\beta$  telles que la protéine kinase A (PKA) grâce à la production d'AMPc dépendante du calcium (Briaud et al., 2003), la protéine kinase II dépendante du calcium et de la calmoduline (CaMKII), la protéine kinase C (PKC) et la kinase ERK 1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*).

La kinase ERK 1/2 appartient à la famille des MAPK (*mitogen activated protein kinase*). Elle joue un rôle dans plusieurs événements cellulaires tels que la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. Son implication dans la sécrétion d'insuline a également été décrite dans une lignée cellulaire  $\beta$  et dans des îlots isolés de rat (Longuet et al., 2005).

La CaMKII est une sérine thréonine kinase également activée de manière calcium dépendante. L'utilisation d'un inhibiteur de la CaMKII diminuerait la sécrétion d'insuline induite par le glucose suggérant ainsi son implication (Dadi et al., 2014). Cette kinase est impliquée dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose notamment en jouant un rôle dans la synthèse des granules d'insuline (Santos et al., 2014).

La PKA, la PKC et la CaMKII seraient directement impliquées dans la phosphorylation de protéines du complexe SNARE jouant un rôle dans l'exocytose des granules d'insuline.

De plus, la PKA et la PKC pourraient favoriser la sécrétion d'insuline en augmentant le nombre de granule hautement sensible au calcium (granules du pool HCSP) (Wan et al., 2004).

## Chapitre 2 : Le diabète de type 2

---

### 2.1. Définitions – épidémiologie

Le diabète, qui résulte d'une anomalie du métabolisme glucidique, est défini par une élévation chronique du taux de glucose dans le sang ou hyperglycémie. Plusieurs critères peuvent définir l'état diabétique :

- Une glycémie à jeun supérieure à  $1,26 \text{ g.L}^{-1}$  (vérifiée à 2 reprises),
- Une glycémie post-prandiale (après le repas) supérieure à  $2 \text{ g.L}^{-1}$ ,
- Une glycémie supérieure ou égale à  $2 \text{ g.L}^{-1}$ , 2h après l'ingestion de 75g de glucose (test d'hyperglycémie provoquée orale),
- Un taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) supérieur ou égal à 6,5 %. La valeur de l'HbA1c reflète l'équilibre glycémique lors des trois derniers mois précédant le dosage.

Différentes formes de diabète existent :

- Le diabète de type 1, qui survient de manière brutale, en général avant 20 ans, et qui résulte d'une destruction auto-immune des cellules  $\beta$ -pancréatiques sécrétrices d'insuline.
- Le diabète de type 2, qui survient en général après 40 ans, qui résulte d'un défaut de sécrétion d'insuline associé à une résistance à l'insuline au niveau de ses tissus cibles. L'étiologie de la maladie est multiple et dans bien des cas elle résulte de la combinaison de plusieurs facteurs, génétiques ou environnementaux.
- Le diabète gestationnel, qui se déclare pendant la grossesse et qui disparaît après l'accouchement, concerne 6 % des grossesses. Une femme ayant développé un diabète gestationnel est exposée à un risque accru de développer ultérieurement un diabète de type de 2.
- Le diabète néonatal qui est d'origine génétique et qui apparaît durant les premières semaines de la vie.

Le diabète de type 1 et de type 2 sont les formes majeures de diabète. Environ 90 % des diabétiques sont des diabétiques de type 2.

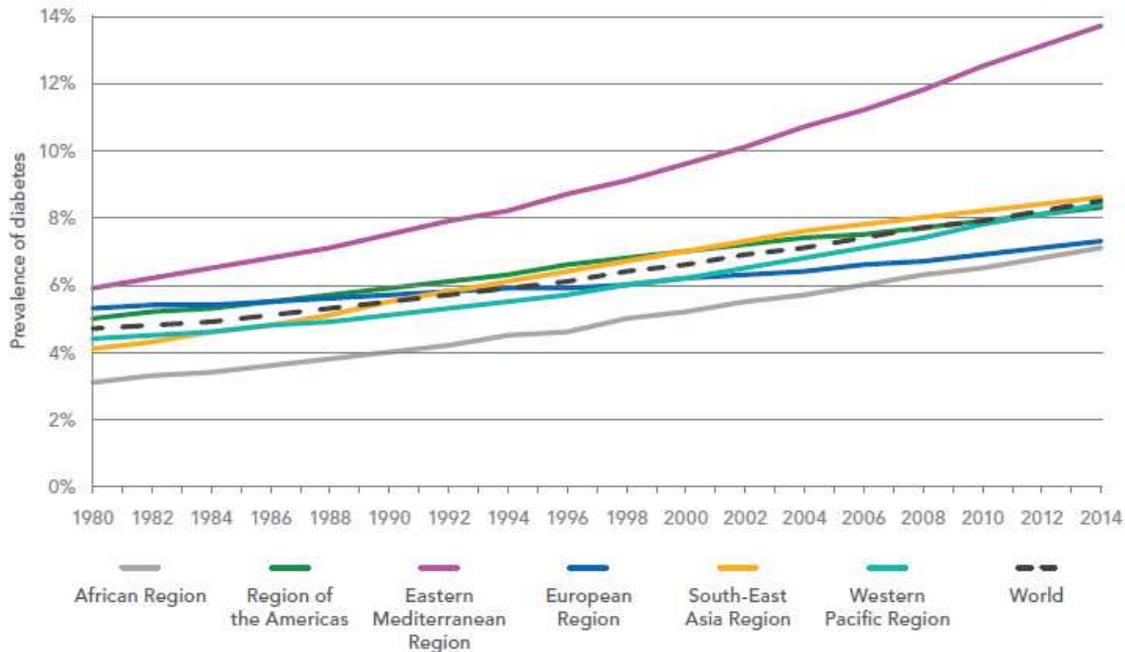
Le diabète est une maladie chronique grave qui constitue un véritable problème de santé publique. En 30 ans, le nombre de diabétiques (toutes les formes de diabète confondues) a été

multiplié par quatre au niveau mondial. En effet, en 2014, on estimait à 420 millions le nombre de personnes adultes diabétiques (dont 380 millions pour le type 2) contre 108 millions en 1980 (**figure 15**). Le diabète, et en particulier le diabète de type 2, prend des allures d'épidémie mondiale avec une prévalence qui ne cesse d'augmenter, favorisée par le développement de l'obésité du fait notamment d'un mode de vie plus sédentaire associé à une alimentation hypercalorique.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2016 le diabète touchait notamment 9,1% de la population aux Etats-Unis, 8% de la population en France et 12% de la population en Chine. La prévalence du diabète explose dans les pays producteurs de pétrole du Golfe persique en atteignant 13 à 19 % de la population. Sur les dix pays où la prévalence est la plus élevée, six se trouvent dans la région orientale méditerranéenne (Arabie saoudite, Bahreïn, Émirats arabes unis, Koweït, Liban et Oman).

Cependant, ces chiffres sont sous-estimés car ils ne tiennent pas compte des patients non traités ou non encore diagnostiqués. Le diabète est une maladie silencieuse dans laquelle l'hyperglycémie est longtemps asymptomatique. Plusieurs années peuvent ainsi s'écouler avant qu'il ne soit diagnostiqué, période pendant laquelle des complications se développent. Une étude récente a montré que le retard au diagnostic pouvait s'élever à dix ans (Porta et al., 2014). Le diabète est souvent diagnostiqué de manière fortuite à la suite d'un bilan sanguin de routine ou en cas de complications.

L'OMS prévoit qu'en 2030, le diabète sera la septième cause de mortalité dans le monde. Selon la Fédération Internationale du Diabète, la population du globe comptera 592 millions de diabétiques à l'horizon 2035. Sept millions de personnes supplémentaires chaque année développent un diabète. A ce jour, les complications liées à cette maladie sont à l'origine de 2% des causes de décès en France (tous les âges confondus).



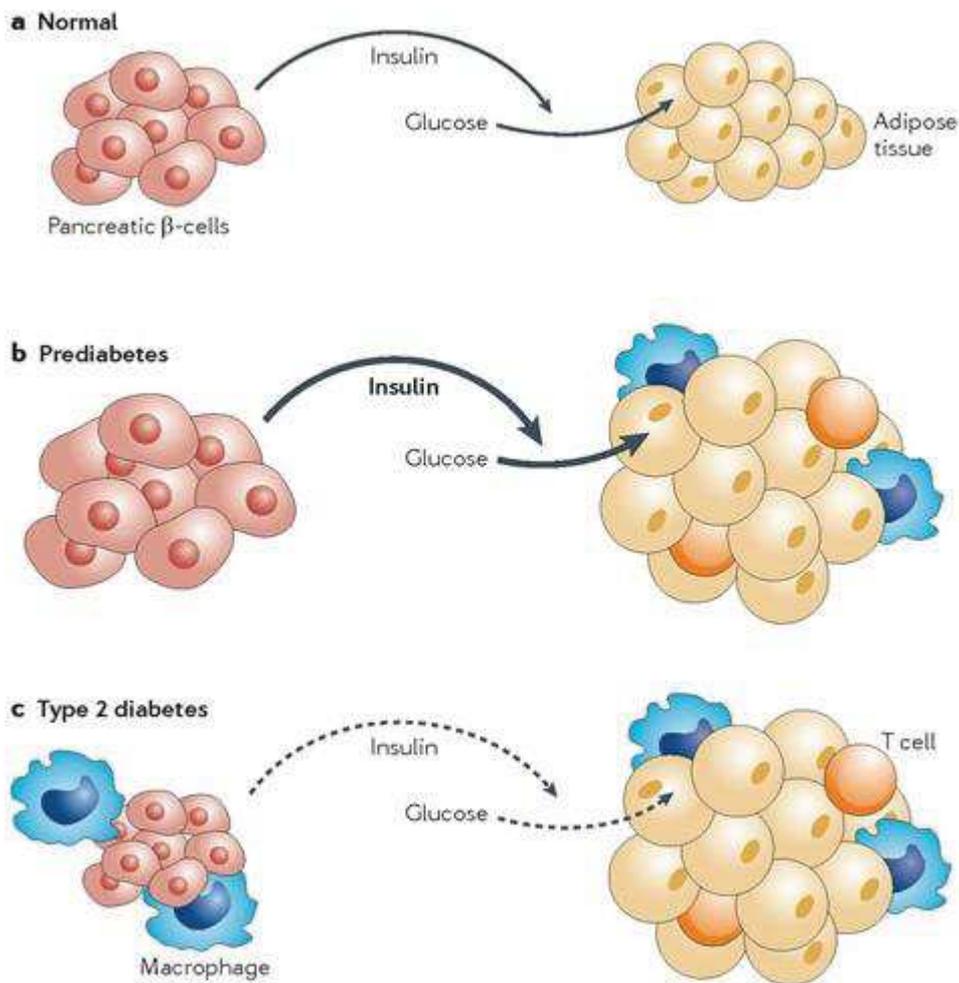
**Figure 15 : Evolution de la prévalence du diabète dans différentes régions du monde entre 1980 et 2014** (World Health Organization, 2016)

## 2.2. Physiopathologie du diabète de type 2

Chez les individus sains, l'insuline sécrétée par les cellules  $\beta$  pancréatiques, permet aux tissus cibles (muscle, foie, tissu adipeux) d'utiliser ou produire correctement le glucose et de réguler la glycémie. Des prédispositions génétiques, mais aussi environnementales comme le surpoids et l'obésité peuvent réduire l'efficacité de l'insuline sur ces tissus, (phénomène d'insulino-résistance). Au stade de pré-diabète, la résistance à l'insuline est associée à une élévation de la masse cellulaire  $\beta$  et à une augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline prévenant l'apparition de l'hyperglycémie chronique. L'état pré-diabétique est souvent associé au syndrome métabolique. Celui-ci est défini par l'association d'au moins trois des anomalies métaboliques suivantes : obésité abdominale, hypertriglycéridémie, taux de cholestérol HDL bas, hypertension artérielle et glycémie à jeun supérieure ou égale à  $1,1 \text{ g.L}^{-1}$ .

Le phénomène compensatoire observé lors du pré-diabète peut se maintenir à vie, mais chez 5 à 10 % des patients (voire 50 à 75% des patients ayant une glycémie modérément élevée), une décompensation de la cellule  $\beta$  survient. Elle est caractérisée par un défaut de sécrétion d'insuline provoquant l'apparition d'une hyperglycémie chronique (Tabák et al., 2012). La progression du pré-diabète vers le diabète de type 2 est induite par la détérioration de la capacité insulino-sécrétoire des cellules  $\beta$ , sur fond d'insulino-résistance (**figure 16**).

Le diabète de type 2 est donc caractérisé par 2 phénomènes qui s'auto-entretiennent et s'aggravent : la résistance à l'insuline au niveau de ses tissus cibles et l'altération de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques.



**Figure 16 : Physiopathologie du diabète de type 2 (Donath, 2014).**

### 2.2.1. La résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline est un des facteurs clés responsables de l'hyperglycémie chez les personnes diabétiques de type 2. Elle peut être favorisée par des facteurs génétiques et métaboliques. Le surpoids et l'obésité sont fortement liés au risque de développer une résistance à l'insuline et un diabète de type 2. De multiples mécanismes sont impliqués et interconnectés.

### 2.2.1.1. Rôle des cytokines pro-inflammatoires

De nombreuses études ont montré le lien entre l'inflammation et la résistance à l'insuline à travers la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires produites par des macrophages du tissu adipeux, du foie et des muscles squelettiques. Le dépôt ectopique des graisses favorise l'infiltration des macrophages dans les tissus (tissu adipeux viscéral, foie et muscles squelettiques).

Le tissu adipeux est un important initiateur de l'inflammation. Chez l'Homme obèse, ce tissu est infiltré à plus de 40 % par des macrophages, alors que chez l'Homme sain ce chiffre n'excède pas 10 % (Weisberg et al., 2003). Les macrophages du tissu adipeux sont responsables de la production et de la libération de cytokines pro-inflammatoires qui peuvent agir de manière paracrine ou endocrine et favoriser la résistance à l'insuline.

Des événements similaires interviennent au niveau du foie. En effet, en présence d'obésité le nombre de macrophages augmente. Il existe au niveau du foie des macrophages résidents nommés cellules de Kupffer et des macrophages recrutés ou RHM (*Recruited Hepatic Macrophages*) qui migrent dans le foie en condition d'obésité (Gregor and Hotamisligil, 2011; Johnson and Olefsky, 2013).

Alors que le phénomène d'inflammation dans le tissu adipeux et le foie est largement décrit, il n'existe pas un consensus clair au sujet d'une inflammation de bas grade dans le tissu musculaire.

Chez des individus obèses et diabétiques de type 2, l'accumulation de macrophages dans le tissu musculaire semble faible (Tam et al., 2012). Des études histologiques chez des souris obèses démontrent que les macrophages présents dans les muscles, proviendraient des dépôts adipeux ectopiques infiltrés entre les fibres musculaires (Patsouris et al., 2008). De plus, le recrutement des macrophages serait médié par la chemokine MCP1 (Patsouris et al., 2014). D'autres auteurs évoquent que ce serait plutôt les médiateurs inflammatoires provenant du foie et du tissu adipeux qui favoriseraient la résistance à l'insuline au niveau musculaire (Gregor and Hotamisligil, 2011).

Ce sont les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les macrophages telles que le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), l'IL-1 $\beta$  (interleukine-1 $\beta$ ) et l'IL-6 (interleukine-6) qui sont responsables de l'insulino-résistance médiée par l'inflammation.

Elles activent, en effet, des protéines kinases inflammatoires intracellulaires telles que c-Jun N-terminal kinase (JNK) et I $\kappa$ B kinase qui altèrent la signalisation insulinique en aval du récepteur de l'insuline par une phosphorylation de la sérine de l'IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*) (Fève and Bastard, 2009; Kwon and Pessin, 2013).

Le TNF- $\alpha$  est également responsable d'une baisse de l'expression du transporteur au glucose GLUT4 et de l'augmentation de la lipolyse (Souza et al., 1998).

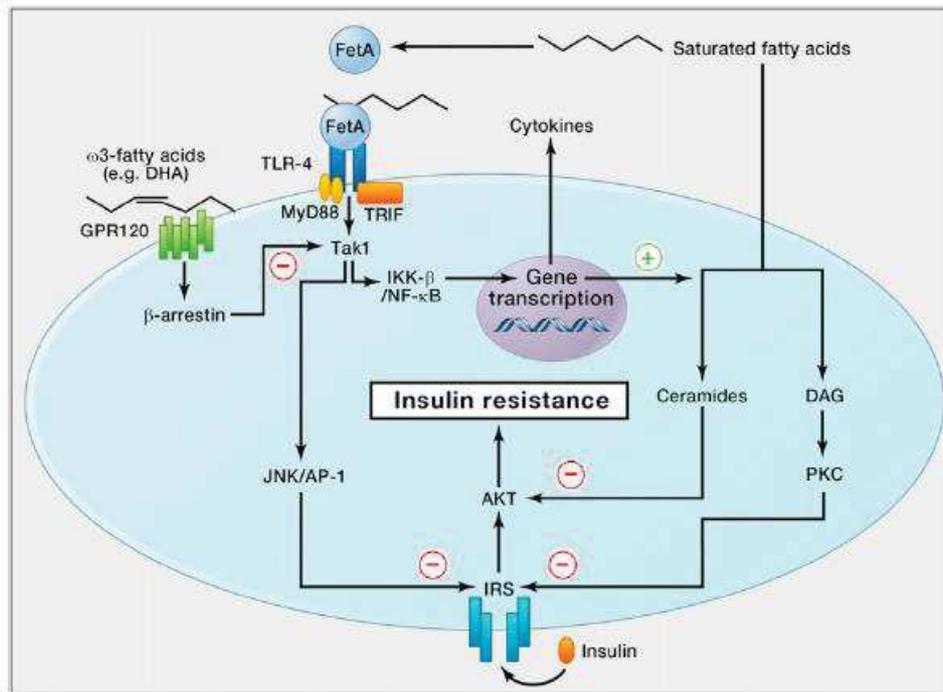
### 2.2.1.2. Rôle des acides gras libres et des dérivés lipidiques

La résistance à l'insuline favorise la libération plasmatique d'acides gras par le tissu adipeux car l'insuline ne peut plus exercer correctement son activité anti-lipolytique.

Les acide gras libres favorisent à leur tour le développement de la résistance à l'insuline. En effet, ils jouent un rôle dans le recrutement des macrophages favorisant la réponse inflammatoire.

D'autres mécanismes moléculaires impliquent les acides gras libres, et en particulier les acides gras saturés (AGS) dans le phénomène de résistance à l'insuline :

- Tout d'abord, l'excès d'AGS active des voies de signalisation qui affectent la signalisation et l'action de l'insuline. Par le biais de leur liaison à un ligand endogène (fétuin-A), les acides gras saturés activent la signalisation intracellulaire du récepteur TLR-4 (Toll-Like receptor 4). Les récepteurs TLR dont TLR-4, sont hautement exprimés dans les cellules et jouent un rôle direct dans la réponse immunitaire innée notamment au niveau des macrophages. Ils sont également exprimés au niveau des adipocytes, des hépatocytes et des cellules musculaires squelettiques. L'activation de TLR-4 dans ces cellules par les AGS active des voies de signalisation (JNK/IKK $\beta$  et NF $\kappa$ B) qui inhibent la signalisation en aval du récepteur de l'insuline (Glass and Olefsky, 2012; Pal et al., 2012) (**figure 17**).
- Par ailleurs, l'accumulation intracellulaire de métabolites lipidiques conduit à la formation de dérivés lipidiques comme le diacylglycérol (DAG) et les céramides. Le DAG stimule l'activité de la protéine kinase C (PKC) conduisant à la phosphorylation de la sérine de l'IRS-1 (Jornayvaz and Shulman, 2012) et les céramides inhibent la voie de signalisation AKT (Johnson and Olefsky, 2013) (**figure 17**).



**Figure 17 : Voies impliquées dans la résistance à l'insuline médiée par les lipides au niveau des tissus cibles (Johnson and Olefsky, 2013).**

### 2.2.1.3. Influence du microbiote intestinal

Le microbiote représente l'ensemble des bactéries contenues dans l'intestin (environ  $10^{18}$  bactéries). Elles colonisent le tractus intestinal dès la période prénatale par une transmission de la mère à l'enfant durant la vie fœtale. La colonisation se poursuit après la naissance. Elle est modulée durant les trois premières années de vie par des facteurs environnementaux dont l'alimentation. Le microbiote atteint les caractéristiques du microbiote adulte entre l'âge de 2 et 5 ans puis reste relativement stable tout au long de la vie (Rodríguez et al., 2015).

Des études ont montré l'existence d'un lien entre le microbiote, l'obésité et la résistance à l'insuline. En effet, le microbiote est modifié chez les personnes pré-diabétiques ou atteintes de syndrome métabolique et chez les patients diabétiques de type 2 (Karlsson et al., 2013; Le Chatelier et al., 2013; Qin et al., 2012).

Les bactéries présentes dans le système digestif peuvent produire des molécules actives qui interagissent avec le métabolisme de l'hôte, comme par exemple :

**a) Les endotoxines**

Ce sont les bactéries gram négatives qui produisent à la surface de leur membrane les lipopolysaccharides (LPS), endotoxines capables de passer la barrière intestinale soit par diffusion soit par l'intermédiaire de lipoprotéines, les chylomicrons, responsables du transport des lipides. Les LPS peuvent être retrouvés dans la circulation sanguine et s'infiltrer dans certains tissus comme le foie et le tissu adipeux. De nombreuses études établissent un lien entre un taux plasmatique élevé d'endotoxines (ou endotoxémie) et l'inflammation de bas grade reconnue comme étant un élément majeur dans le développement et l'aggravation de la résistance à l'insuline. Les taux de LPS sont augmentés chez les sujets obèses non diabétiques ainsi que chez les sujets diabétiques de type 2 (Harte et al., 2012; Liang et al., 2013). Une alimentation riche en graisse favorise leur absorption par l'intermédiaire des chylomicrons.

L'influence des endotoxines a été mise en évidence dans différents modèles expérimentaux :

- Tout d'abord, des souris nourries avec un régime riche en graisses et des souris ob/ob génétiquement obèses présentent un microbiote modifié avec un ratio bactéries gram négatif / bactéries gram positif augmenté. L'endotoxémie qui en découle peut être modulée par un traitement antibiotique qui normalise ce ratio. Cet effet a été corrélé à une amélioration de la tolérance au glucose chez ces animaux, à une baisse de l'inflammation et une atténuation de la prise de poids (Cani et al., 2008).
- Par ailleurs, il a aussi été montré que l'administration des LPS en sous-cutané chez des souris normales C57bl6/J durant 4 semaines provoque une endotoxémie conduisant à des désordres métaboliques similaires à ceux observés avec un régime riche en graisses : augmentation de la glycémie et de l'insulinémie à jeun, élévation de la prise de poids et des marqueurs de l'inflammation.
- Les effets des LPS démontrés *in vivo* ont été confirmés sur des myotubes humains, dont l'exposition entraîne une résistance à l'insuline et une réponse inflammatoire (Liang et al., 2013).

Le mécanisme implique la liaison des LPS à la protéine LPB (LPS-binding protein) et à la protéine CD14 (Cani et al., 2007a), le complexe généré (LPS-LPB-CD14) étant reconnu par les TLR4 (Toll-like receptor 4) qui jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire innée en activant la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et en induisant l'expression de gènes pro-inflammatoires (Boulangé et al., 2016). Les TLR4 sont exprimés au niveau des cellules

présentatrices de l'antigène, mais aussi au niveau des cellules musculaires, des adipocytes et des cellules  $\beta$  pancréatiques.

En résumé, une alimentation riche en graisses peut modifier le microbiote et augmenter la production et l'absorption des LPS. L'élévation de l'endotoxémie conduit à une inflammation de bas grade impliquée dans l'apparition de désordres métaboliques incluant la résistance à l'insuline et le diabète de type 2.

#### ***b) Les acides gras à chaîne courte :***

Les acides gras à chaîne courte (AGCC) sont également des produits du microbiote pouvant interagir avec le métabolisme de l'hôte. Les bactéries de la flore intestinale produisent des AGCC à partir de la fermentation des fibres alimentaires et de certaines protéines. Les AGCC sont des molécules particulièrement bien absorbées par l'organisme (seulement 5 % d'élimination dans les fèces) (Topping and Clifton, 2001). Le propionate, le butyrate et l'acétate sont les AGCC les plus abondants. Ce sont des ligands du GPR41 et du GPR43, deux récepteurs couplés aux protéines G exprimés au niveau des cellules entéro-endocrines mais aussi au niveau des cellules musculaires, des hépatocytes et des adipocytes (Canfora et al., 2015).

Les AGCC auraient divers effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline et la dépense énergétique :

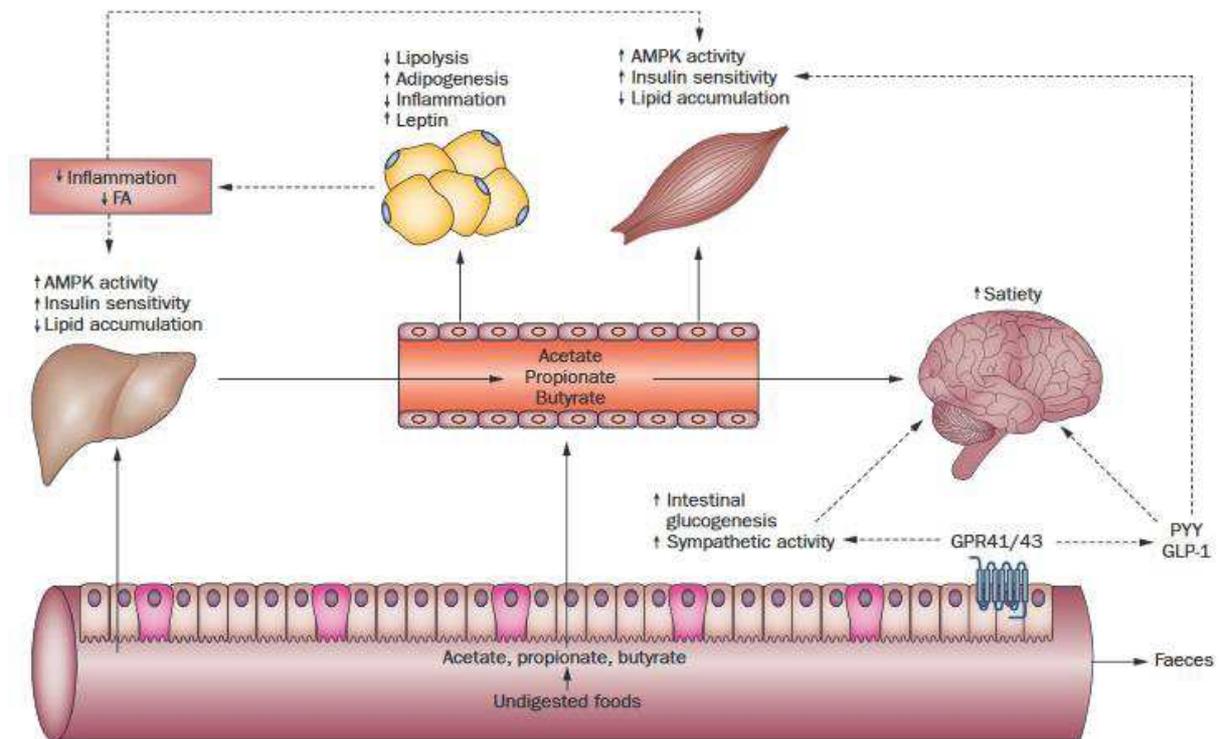
- Au niveau du tissu adipeux, les AGCC semblent augmenter l'adipogenèse et diminuer la lipolyse. Par conséquent, les AGCC permettraient de diminuer le taux d'acides gras libres plasmatiques, d'atténuer l'inflammation et de limiter le stockage ectopique des acides gras au niveau des muscle et du foie (Canfora et al., 2015). Des études d'intervention chez l'Homme montrent que l'administration par infusion rectale d'acétate diminue le taux d'acides gras libres plasmatiques (Wolever et al., 1989, 1991). L'activité des AGCC a également été étudiée *in vitro*, montrant que le traitement d'adipocytes différenciés de souris (adipocytes 3T3-L1) avec l'acétate et le propionate réduirait l'activité lipolytique de 50% *via* l'activation du récepteur GPR43. Ces résultats ont également été confirmés *in vivo* chez un modèle de souris (Ge et al., 2008). De plus, il a été montré que la supplémentation en butyrate permet de protéger des souris de l'obésité et de la résistance à l'insuline induites par un régime riche en graisses (Gao et al., 2009). Au niveau mécanistique, l'acétate, le butyrate et le

propionate augmentent le métabolisme oxydatif dans le tissu adipeux en diminuant l'activité et l'expression de PPAR $\gamma$  et en augmentant celle de l'AMPK (den Besten et al., 2015). Le butyrate pourrait diminuer l'inflammation de bas grade en activant les cellules anti-inflammatoires T<sub>REG</sub> et en inhibant des voies de signalisation impliquées dans la production de cytokines et de chemokines pro-inflammatoires (Canfora et al., 2015).

- Au niveau musculaire, l'acétate et le butyrate semblent également améliorer l'oxydation des lipides de manière AMPK-dépendante (Canfora et al., 2015). L'injection d'acétate chez des rats obèses pendant 6 mois augmente également l'activité de l'AMPK dans le muscle (Yamashita et al., 2009). Par ailleurs, les AGCC favorisent de façon indirecte, la sensibilité à l'insuline et l'utilisation du glucose par les muscles, en stimulant la sécrétion de GLP-1 et du peptide YY par les cellules entéro-endocrines de type L (Psichas et al., 2015; Tolhurst et al., 2012).
- Au niveau hépatique, et comme dans le tissu adipeux, les AGCC peuvent réguler le métabolisme oxydatif en diminuant l'activité et l'expression de PPAR $\gamma$  et en augmentant celle de l'AMPK (den Besten et al., 2015).
- Au niveau des muscles et du foie, l'augmentation de l'adipogenèse et la diminution de la lipolyse réduiraient le stockage ectopique des acides gras (phénomène impliqué dans la résistance à l'insuline de ces tissus) (Canfora et al., 2015).

En résumé, les AGCC semblent jouer un rôle positif dans la sensibilité à l'insuline ainsi que dans l'homéostasie énergétique et glucidique (**figure 18**). Ces données confirment le bénéfice potentiel d'une alimentation riche en fibres. L'augmentation de la prévalence du diabète de type 2 est à mettre en parallèle avec un changement des habitudes alimentaires devenues hypercaloriques, hyperlipidiques (notamment en acide gras saturés) et pauvres en fibres.

Toutefois, la plupart des études s'intéressant aux effets biologiques des AGCC a été effectuée sur des modèles expérimentaux *in vivo* ou *in vitro* et un manque évident d'études cliniques ne permet pas de corroborer ces données expérimentales avec des résultats cliniques.



**Figure 18 : Effets bénéfiques des acides gras à chaîne courte sur la sensibilité à l'insuline** (Canfora et al., 2015).

Le microbiote intestinal serait donc capable de participer au développement de l'insulino-résistance par la production de lipopolysaccharides, mais pourrait à l'inverse améliorer la sensibilité à l'insuline par la production d'AGCC.

## 2.2.2. Le Défaut de sécrétion d'insuline

### 2.2.2.1. Les différentes anomalies de sécrétion d'insuline

Le diabète de type 2 est associé à des anomalies quantitatives et qualitatives de sécrétion d'insuline au niveau de la cellule  $\beta$  :

#### - *Anomalie de pulsatilité* :

Le caractère pulsatile de la sécrétion basale d'insuline permet d'augmenter l'efficacité de cette hormone. Cependant, il est décrit que les sujets diabétiques de type 2 présentent des anomalies oscillatoires dès le stade précoce de la maladie (O'meara et al., 1993; O'Rahilly et al., 1988). De plus, cette perte de sécrétion pulsatile serait délétère pour les îlots de

Langerhans car elle serait liée à un excès de calcium intracytosolique favorisant l'apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques (Bergsten, 2000).

- Perte du pic précoce :

La perte de la première phase de la sécrétion d'insuline (ou pic précoce) a été observée chez le patient diabétique de type 2 (Cerasi et Luft, 1967 ; Metz et al., 1979). Dans le stade d'intolérance au glucose, ce pic est diminué (Ratzmann et al., 1981). Pourtant, il joue un rôle important dans le contrôle de la glycémie.

- Anomalie quantitative de l'insulino-sécrétion :

Au cours du diabète de type 2, les sécrétions d'insuline basale et stimulée par le glucose sont diminuées (Deng et al., 2004; Guillausseau et al., 2008) .

- Sécrétion excessive de pro-hormones :

Au-delà des altérations quantitatives, il existe également des altérations qualitatives de la sécrétion d'insuline. Les diabétiques de type 2 présentent un excès de pro-peptides d'insuline circulants (la pro-insuline clivée en 32-33 et la pro-insuline clivée en 64-65). En effet, leurs taux plasmatiques ont été détectés à plus de 40 % de l'insuline totale alors qu'ils n'excèdent pas 5 % chez les sujets sains (Temple et al., 1990).

- Diminution de la masse cellulaire  $\beta$  :

La masse cellulaire  $\beta$  reflète l'équilibre entre la prolifération (néogenèse) et l'apoptose des cellules. L'autopsie de pancréas de patients décédés atteints de diabète de type 2 a révélé une réduction importante de la masse ainsi qu'une élévation de l'apoptose des cellules  $\beta$  (Butler et al., 2003).

### 2.2.2.2. Les mécanismes de la dysfonction cellulaire $\beta$

#### a) *La glucotoxicité* :

L'hyperglycémie chronique exerce ses effets délétères au niveau de la cellule  $\beta$  selon plusieurs mécanismes :

L'hyperglycémie est à l'origine de la **production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)**. Les ROS sont des radicaux dérivés de l'oxygène tels que l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical oxyde nitrique ( $NO^{\cdot}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), ainsi que des espèces non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'acide hypochloreux

(HOCl) et le peroxyde nitrite (ONOO<sup>-</sup>). En condition physiologique, il s'agit de co-produits du métabolisme énergétique impliqués dans la régulation de certaines voies de signalisation. Les sources majeures de ROS proviennent de la mitochondrie au niveau de la chaîne de transports d'électrons où des fuites d'électrons génèrent des radicaux libres tels que O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La NADPH oxydase (qui génère O<sub>2</sub><sup>-</sup>), la NO synthase (qui génère NO<sup>•</sup>), la lipooxygénase, la cyclooxygénase et la monooxygénase microsomale sont également des sources intracellulaires de ROS.

Toutefois, l'accumulation excessive de ROS dans la cellule peut devenir néfaste et générer un stress oxydant. C'est particulièrement le cas pour la cellule β. En effet, la cellule β exprime peu d'enzymes de détoxification telles que la CuZn superoxyde dismutase (CuZn-SOD), la Mn-SOD, la catalase et la glutathione peroxydase (GPx) (Grankvist et al., 1981). L'hyperglycémie chronique, caractéristique du diabète, est à l'origine d'une glucotoxicité liée au stress oxydant et responsable (au moins en partie) de la dysfonction de la cellule β.

En effet, lorsque le glucose est en excès dans la cellule, sa prise en charge est déviée vers des voies alternatives (telles que, par exemple, la phosphorylation oxydative, le métabolisme du sorbitol et des hexosamines, l'activation de la PKC par le DAG) qui vont conduire à la production de métabolites qui formeront des ROS à l'origine d'un stress oxydant (Poitout and Robertson, 2008).

L'hyperglycémie est responsable de la **dérégulation de l'expression du gène de l'insuline**.

En effet, l'exposition de cellules INS-1 (lignée cellulaire β sécrétrice d'insuline) à des concentrations élevées de glucose diminue rapidement et de manière réversible le taux d'ARNm de l'insuline (Poitout and Robertson, 2008). Des concentrations élevées de glucose diminuent également l'activité de liaison des facteurs de transcription impliqués dans l'expression du gène de l'insuline, PDX-1 et MafA (Harmon et al., 2005; Poitout et al., 2006).

Au-delà de cet effet sur l'expression du gène de l'insuline, l'hyperglycémie chronique serait responsable d'une altération de la sécrétion d'insuline par une baisse de l'expression des protéines de l'exocytose à l'origine d'une **altération de la capacité d'exocytose** des cellules β (Dubois et al., 2007).

Au plan pharmacologique, l'utilisation de molécules antioxydantes a permis de démontrer l'implication du stress oxydant dans le mécanisme biochimique de la glucotoxicité. En effet, la diminution de la transcription du gène de l'insuline est prévenue par des antioxydants tels que la N-acétyl-cystéine (NAC) ou l'aminoguanidine sur la lignée cellulaire sécrétrice d'insuline HIT-T15. De plus, sur un modèle de rat diabétique de type 2, le rat ZDF, le traitement par la NAC (200 mg/kg/ jour en *i.p.* ou 1 g/L dans l'eau de boisson) ou l'aminoguanidine (400 mg/kg/ jour en *i.p.*), pendant 6 semaines, normalise la glycémie, restaure la sécrétion d'insuline, le contenu en insuline et les taux d'ARNm d'insuline au niveau de la cellule  $\beta$  (Tanaka et al., 1999).

### ***b) La glucolipotoxicité***

Des concentrations plasmatiques élevées en AGL (et notamment en AGS tels que l'oléate et le palmitate) augmentent le risque de développer un diabète de type 2. En effet, les AGL jouent un rôle dans la dysfonction de la cellule  $\beta$  (lipotoxicité) indépendamment de leur effet sur la résistance à l'insuline (Paolisso et al., 1995).

Lors d'un état diabétique la lipotoxicité se manifeste de façon concomitante avec la glucotoxicité. On parle alors de glucolipotoxicité.

La glucolipotoxicité participe à la dysfonction de la cellule  $\beta$  de la façon suivante :

- Elle favorise l'**accumulation de dérivés lipidiques** dans la cellule à l'origine de sa dysfonction. Lorsque les concentrations plasmatiques de glucose et d'AGL sont élevées, le métabolisme du glucose au sein de la cellule  $\beta$  conduit à la formation cytosolique de citrate et de malonyl-CoA. Le malonyl-CoA inhibe la carnitine-palmitoyl transférase-1 (CPT-1) qui joue un rôle dans le transport des acides gras du cytoplasme vers la mitochondrie. Cette inhibition bloque l'oxydation des AGL conduisant à la production et à l'accumulation cytoplasmique de dérivés lipidiques tels que les céramides, les diglycérides, l'acide phosphatidique, les phospholipides et les triglycérides (Poitout et al., 2010). Ces dérivés favorisent la formation de ROS et le processus apoptotique (Wali et al., 2013). Ils altèrent également la sécrétion d'insuline en intervenant au niveau de l'expression du gène de l'insuline. Des études ont montré que des concentrations élevées de palmitate (qui est utilisé comme substrat pour la synthèse des dérivés lipidiques tels que les céramides) **diminuaient l'activité de liaison des facteurs de transcription PDX-1 et MafA** au niveau du promoteur du gène de l'insuline (Poitout et al., 2006). Il a également été montré une diminution de **l'expression de PASK** qui est une serine-threonine kinase régulée par le glucose et qui est

impliquée dans l'expression de PDX-1. Autrement dit, *via* une diminution de l'expression de PASK, le palmitate diminue l'expression de PDX-1.

- La glucolipotoxicité altère particulièrement les **cellules  $\beta$  Hubs** dont le rôle est de synchroniser l'ensemble des cellules  $\beta$  lors de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Johnston et al., 2016).

- La glucolipotoxicité altère la sécrétion d'insuline par une diminution des niveaux d'ATP induite par **l'augmentation du taux de protéines UCP-2** (*Uncoupling Protein 2*) qui constitue un système de défense pour la cellule  $\beta$  pancréatique (Chan et al., 2004).

- La sécrétion d'insuline est également altérée par **l'activation de la PKC $\epsilon$**  (Poitout et al., 2010).

- La glucolipotoxicité affecterait également la sécrétion d'insuline induite par le glucose au cours des différents étapes de **l'exocytose** (Olofsson et al., 2007).

### ***c) Le stress du réticulum endoplasmique***

Le réticulum endoplasmique est un organite essentiel pour préserver la fonction et la viabilité cellulaire. Il est impliqué dans la biosynthèse, l'assemblage, la maturation et le transport des protéines. Des protéines chaperones assurent le repliement des protéines synthétisées afin de les rendre fonctionnelles. En cas de stress du réticulum endoplasmique, l'activité des protéines chaperones est altérée et provoque l'accumulation de protéines mal repliées. Ceci déclenche une réponse adaptative appelée *Unfolded Protein Response* (UPR) (Back and Kaufman, 2012) pour maintenir l'homéostasie de cet organite. Le réseau de signalisation des UPR est complexe et implique trois protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique : IRE 1 $\alpha$  (*inositol requiring enzyme 1 $\alpha$* ), PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) et ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*).

L'**excès de ROS** produits par la glucotoxicité et la glucolipotoxicité altère ces protéines chaperones et provoque un stress du réticulum endoplasmique (Zeeshan et al., 2016). Il a récemment été décrit que le stress oxydant induit par le palmitate était à l'origine d'une déplétion du stock de calcium du réticulum endoplasmique due à une libération aberrante du calcium depuis cet organite, conduisant au stress du réticulum endoplasmique (Ly et al., 2017).

L'induction du stress du réticulum endoplasmique favorise l'apoptose des cellules  $\beta$  (Bachar et al., 2009; Karaskov et al., 2006; Wang, 2005).

L'inflammation, le stress oxydant et le stress du réticulum endoplasmique consécutifs au phénomène de glucolipotoxicité, peuvent apparaître dès le stade d'intolérance au glucose et favoriser le passage du pré-diabète au diabète. L'hyperglycémie qui s'aggrave au cours du diabète de type 2 accélère ensuite la dysfonction et la mort de la cellule  $\beta$  pancréatique.

## **2.3. Les complications liées au diabète de type 2**

### **2.3.1. Les macroangiopathies**

Le diabète de type 2 est associé à différentes complications macroangopathiques telles que l'athérosclérose, l'arrêt cardiaque, l'accident vasculaire cérébral (AVC), l'angine de poitrine et l'infarctus du myocarde (Shah et al., 2015). Il multiplie par 2 à 3 le risque de maladie cardiovasculaire. Selon la fédération internationale du diabète, les complications cardiovasculaires sont la principale cause de mortalité.

### **2.3.2. Les microangiopathies**

Les microangiopathies qui sont des atteintes des petits vaisseaux au niveau nerveux, oculaire et rénal, sont favorisées par l'hyperglycémie chronique. Le traitement médicamenteux du diabète est alors important pour diminuer le risque de morbi-mortalité associé à ces complications.

#### **2.3.2.1. La neuropathie diabétique**

Elle existe sous deux formes :

- La neuropathie autonome (atteinte des nerfs du système nerveux autonome) qui se traduit par des symptômes variés tels que par exemples l'hypotension orthostatique ou des troubles digestifs.
- La neuropathie diabétique périphérique (atteinte des nerfs du système nerveux périphérique) qui se présente sous plusieurs formes :
  - La polyneuropathie diabétique ou polynévrite qui est une atteinte des nerfs des membres inférieurs et qui se manifeste par une diminution ou une perte de la sensibilité, favorisant l'apparition de plaies, notamment au niveau des pieds.
  - La mononeuropathie diabétique qui est une complication qui ne touche qu'un seul nerf périphérique. Si plusieurs zones du corps sont touchées par l'atteinte d'un

seul nerf, on parlera de mononeuropathie multiple. Elle peut se traduire par une douleur intense, une faiblesse et une difficulté à se mouvoir.

### **2.3.2.2. La rétinopathie diabétique**

Il s'agit d'une atteinte de la rétine qui peut entraîner une baisse de la vue voire une cécité totale (Zou et al., 2016).

### **2.3.2.3. La néphropathie diabétique**

Cette complication qui est une atteinte des reins, peut aboutir à une insuffisance rénale chronique. Le diabète est la première cause de dialyse en France.

## **2.4. Prise en charge du patient diabétique de type 2**

La mise en place des mesures hygiéno-diététiques efficaces est un préalable nécessaire au traitement médicamenteux du contrôle glycémique. Elles doivent être poursuivies tout au long de la prise en charge.

Il existe plusieurs classes thérapeutiques de médicaments reposant sur des mécanismes d'action différents. Ils sont administrés seuls ou associés entre eux.

### **- Les insulinosensibilisateurs**

La metformine (glucophage®), de la famille des biguanides, a une action anti-hyperglycémiant sans entraîner d'hypoglycémie. Elle diminue la glycémie en dehors et après les repas :

- en diminuant la production hépatique de glucose,
- en diminuant l'insulino-résistance des tissus périphériques,
- en retardant l'absorption intestinale du glucose.

La metformine agit en inhibant partiellement le complexe I de la chaîne d'électron dans la mitochondrie conduisant à une déplétion énergétique (augmentation du ratio AMP/ATP) et une activation de l'AMPK responsable de l'inhibition de la production hépatique de glucose et de l'augmentation de la captation du glucose par les muscles.

Les thiazolidinediones, agonistes des récepteurs PPAR $\gamma$ , ne sont plus commercialisés en France du fait d'une toxicité cardiaque. Seule la pioglitazone est encore commercialisée dans certains pays.

- **Les sulfamides hypoglycémiants et les glinides**

Les sulfamides hypoglycémiants (ex : le glibenclamide) et les glinides (ex : le répaglinide) stimulent la sécrétion d'insuline de façon non gluco-dépendante. L'hypoglycémie est le principal effet indésirable.

Les sulfamides se lient à la sous-unité SUR-1 des canaux  $K_{ATP}$  et les glinides se lient aux deux sous-unités SUR-1 et Kir6.2 des canaux  $K_{ATP}$ . Les mécanismes d'action sont identiques. Leur liaison sur les canaux  $K_{ATP}$  entraîne leur fermeture et une dépolarisation de la membrane à l'origine d'une activation des  $Ca_v$  de type L. L'entrée massive de calcium dans la cellule  $\beta$  déclenche l'exocytose des granules d'insuline.

L'efficacité de cette classe de médicaments dépend de la capacité résiduelle du pancréas à sécréter de l'insuline.

- **Les inhibiteurs des alpha-glucosidases**

Les inhibiteurs des alpha-glucosidases (ex : acarbose) inhibent l'absorption des glucides lors des repas. Ils agissent donc sur la glycémie post-prandiale. Ils n'induisent pas d'hypoglycémie. Leurs effets indésirables principaux sont des troubles digestifs liés à une fermentation colique des sucres non absorbés.

- **Les analogues GLP-1 et les inhibiteurs de la DPP4**

Le GLP-1, de la famille des incrétones, est un peptide sécrété par l'intestin au moment des repas. Il amplifie la sécrétion d'insuline induite par le glucose, et est rapidement métabolisé par la dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) au niveau plasmatique.

Des analogues du GLP-1 tels que l'exénatide et le liraglutide, peuvent être utilisés comme antidiabétiques. Ils sont administrés par voie injectable en sous-cutané.

Il existe également des inhibiteurs de la DPP4 (ex : saxagliptine) appartenant à la famille des gliptines qui renforce l'action du GLP-1 endogène en augmentant sa durée de vie.

Ces médicaments ont pour effet de :

- stimuler la sécrétion d'insuline uniquement quand la glycémie est élevée (activité gluco-dépendante), ce qui limite le risque d'hypoglycémie,
- réduire la sécrétion de glucagon, hormone qui stimule la production de glucose par le foie,
- diminuer l'appétit,
- ralentir la vidange gastrique, ce qui augmente la sensation de satiété.

Ces différentes actions vont contribuer à une perte de poids et à une régulation de la glycémie.

### - Les inhibiteurs du SGLT2

Les inhibiteurs du SGLT2 (sodium /glucose transporteur de type 2 qui permet la réabsorption du glucose au niveau rénal) augmentent l'élimination du glucose dans les urines. Ils permettent alors d'abaisser la glycémie. Ils semblent être associés à une amélioration du risque cardiovasculaire (Ampudia-Blasco et al., 2017; Imprialos et al., 2017; Vettor et al., 2017). Cependant, ces produits ne sont pas encore commercialisés en France.

### - L'insuline

C'est le traitement de référence du diabète de type 1. En cas d'insulinopénie, l'insulinothérapie devient également nécessaire pour le diabétique de type 2. L'insuline recombinante injectable se substitue à l'insuline qui devrait être sécrétée par le pancréas. Le médecin propose un schéma d'insuline adapté au profil glycémique du patient :

- une insuline lente, si la glycémie est haute le matin et baisse dans la journée ;
- une insuline rapide, si la glycémie monte après les repas ;
- une association d'insuline lente et rapide, si la glycémie est haute à plusieurs moments de la journée.

Il existe donc différentes classes de médicaments qui permettent de réguler la glycémie par des mécanismes d'action différents. Cependant, à ce jour aucun traitement médicamenteux ne permet de traiter définitivement le diabète de type 2.

L'objectif de la prise en charge est de :

- Prévenir des complications du diabète ;
- Normaliser la glycémie pour limiter l'évolution de la maladie. L'objectif thérapeutique varie selon les stades de la maladie et les patients : le but initial est d'atteindre un taux de HbA1c  $\leq 7\%$  ;
- Corriger les facteurs de risques cardiovasculaires associés (hypertension artérielle, dyslipidémie, surcharge pondérale).

Les modalités d'utilisation des médicaments antidiabétiques sont définies par la Haute Autorité de Santé (HAS) et sont reprises dans les recommandations (« Recos ») issues du dictionnaire Vidal, référence des praticiens en terme d'utilisation des médicaments.

Trois schémas de stratégie thérapeutique pour la prise en charge du diabète de type 2 sont décrits en fonction de la présence ou non d'intolérance ou de contre-indication à certains médicaments (**figure 19**). Les stratégies sont les suivantes :

- En cas d'utilisation possible de la metformine, ce médicament est choisi en première intention en monothérapie. C'est le seul sur le marché à avoir démontré une efficacité pour diminuer le risque cardio-vasculaire en monothérapie. D'autres produits viennent s'ajouter à ce premier choix lorsque l'objectif thérapeutique n'est plus atteint. D'abord en association avec un sulfamide hypoglycémiant (bithérapie), puis avec d'autres médicaments (trithérapie) avec au choix un inhibiteur de l'alpha-glucosidase, un inhibiteur de DPP4 ou un analogue du GLP-1 (voie sous-cutanée).  
Si l'objectif n'est pas atteint en terme d'HbA1c, l'insulinothérapie est envisagée.
- En cas d'intolérance à la metformine, c'est un sulfamide hypoglycémiant qui sera administrés dans un premier temps, puis successivement associé à un inhibiteur des alpha-glucosidases ou un inhibiteur de DPP4 en bithérapie, puis à l'insuline ou à un analogue GLP-1 si la prise de poids sous insuline est une situation préoccupante.
- En cas d'intolérance ou de contre-indications au sulfamide hypoglycémiant et si la monothérapie par la metformine est insuffisante, celle-ci sera associée au répaglinide (insulino-sécrétoire d'action rapide et courte utilisé au moment des repas). Si la survenue d'hypoglycémies est une situation préoccupante, la metformine sera associée à un inhibiteur des alpha-glucosidases ou à un inhibiteur de la DPP4.  
En cas d'échec, la metformine sera alors associée à l'insuline. Si la prise de poids sous insuline est une situation préoccupante, la metformine sera plutôt associée à un analogue GLP-1.

Les protocoles d'insulinothérapie sont adaptés en fonction des profils des patients.

Les sulfamides hypoglycémiants gardent une place très importante dans la stratégie thérapeutique, même s'ils sont facteurs d'épisodes hypoglycémiques.

Les médecins peuvent être amenés à réduire l'objectif thérapeutique (relèvement du taux-cible d'HbA1c) en fonction de l'espérance de vie des patients, de la survenue d'hypoglycémies trop fréquentes et de complications cardiovasculaires.

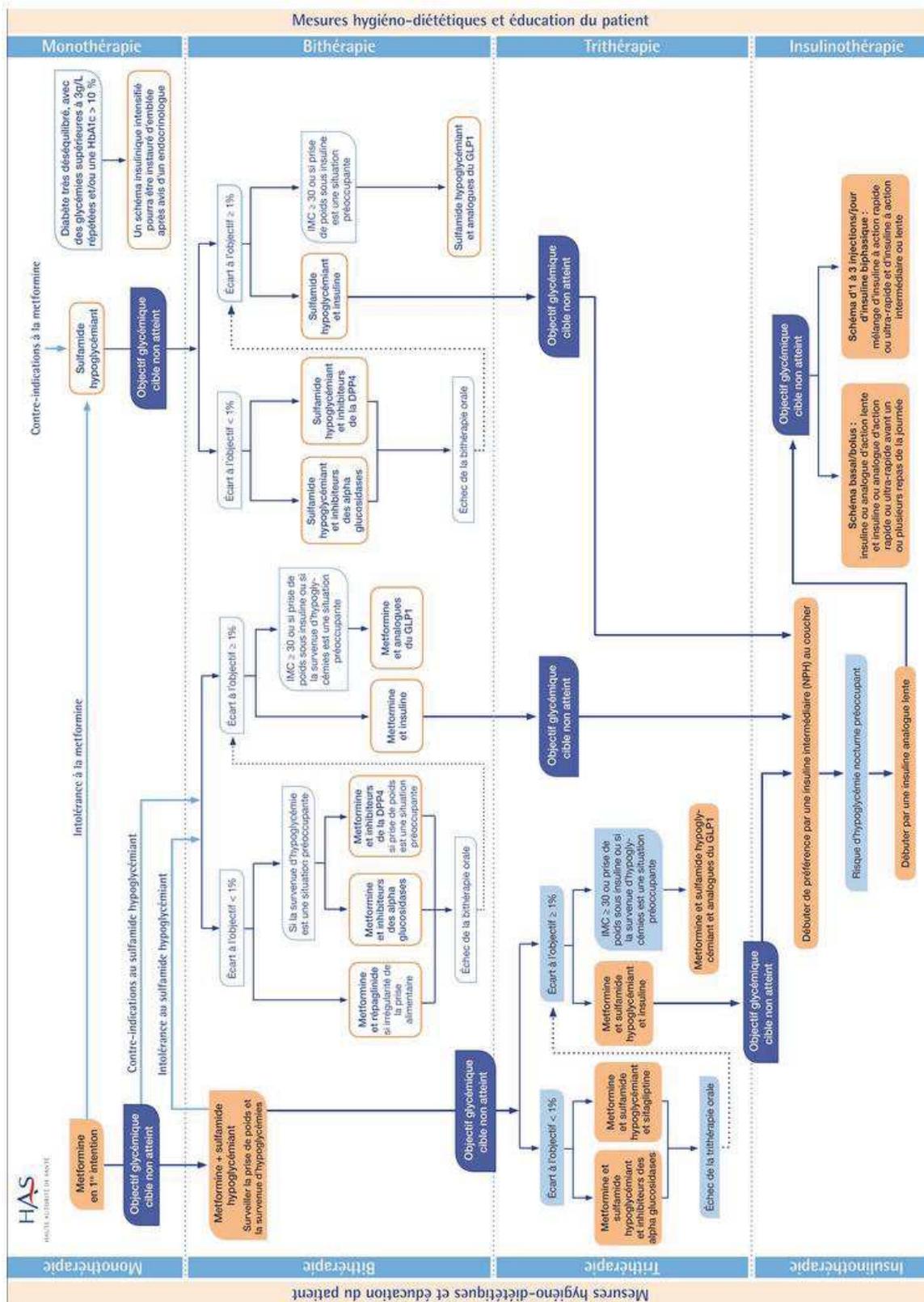


Figure 19 : Prise en charge thérapeutique du patient diabétique de type 2 (HAS, 2013).

## 2.5. Les modèles animaux de diabète de type 2

Chaque modèle animal peut aider à la compréhension d'une séquence pathogène conduisant au diabète, mais aucun modèle à lui seul ne mime de manière fidèle la physiopathologie de la maladie chez l'Homme.

Les modèles animaux de diabète de type 2 peuvent être caractérisés par un diabète spontané ou induit. Dans certains modèles, le diabète de type 2 peut être associé à une obésité.

Dans ce chapitre, seuls quelques exemples de modèles rongeurs sont évoqués. La liste n'est pas exhaustive.

### 2.5.1. Les modèles obèses monogéniques

Dans ces modèles, une seule mutation est responsable de la maladie.

- La souris Lep<sup>ob/ob</sup> est un modèle d'obésité sévère qui présente une mutation spontanée du gène codant pour la leptine (hormone anorexigène). A l'âge de 2 semaines, la consommation de nourriture et le poids des souris augmentent, alors que l'hyperinsulinémie se développe (King, 2012). Dès 4 semaines, ces souris développent une hyperglycémie avec des valeurs maximales atteintes entre 3 et 5 mois (Lindström, 2007).
- Les souris Lepr<sup>db/db</sup> présentent une mutation récessive autosomale sur le gène codant pour le récepteur à la leptine (Chen et al., 1996). Comme les souris ob/ob, elles sont hyperphagiques, hyperinsulinémiques vers la 2<sup>ème</sup> semaine de vie, obèses à l'âge de 3-4 semaines et hyperglycémiques entre la 4<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> semaine (King, 2012).
- Les rats Zucker Fatty présentent une mutation du gène codant pour la leptine et donc une hyperphagie. Ces rats deviennent obèses à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine de vie. Ils sont caractérisés par une hyperinsulinémie avec hyperplasie des îlots de Langerhans, une hyperlipidémie et sont également hypertendus. Les rats Zucker Fatty présentent une intolérance au glucose (King, 2012).
- Les rats ZDF (Zucker Diabetic Fatty) sont dérivés des rats Zucker Fatty qui présentent une mutation à l'origine du phénotype diabétogène. Bien que moins obèses que les fatty, ces animaux sont fortement insulino-résistants et incapables de compenser cette l'insulino-résistance du fait d'un taux d'apoptose des cellules  $\beta$  élevé. Les rats ZDF développent un diabète de type 2 lors d'une consommation riche en graisses. Il s'agit d'un modèle prédictif du passage du pré-diabète au diabète de type 2 car les ZDF sont

pré-diabétiques entre la 3<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> semaine de vie avec insulino-résistance et intolérance au glucose, puis deviennent diabétiques entre la 8<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> semaine (Srinivasan and Ramarao, 2007). Les rats ZDF présentent une hyperplasie des îlots de Langerhans (Tokuyama et al., 1995).

### **2.5.2. Les modèles obèses polygéniques**

- La souris KK est une souche développée au Japon par des croisements de souris consanguines modérément obèses, hyperleptinémiques et insulino-résistantes. Il existe également la souris KK-A<sup>y</sup> qui est un autre modèle dérivé de la souche KK, créée en introduisant le gène yellow obèse (Nishimura, 1969). Ce sont des souris qui développent une obésité plus sévère. Il s'agit d'un modèle adapté pour les études de la néphropathie liée au diabète de type 2 (Kitada et al., 2016).
- Le rat OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fat rat) est dérivé d'une colonie de rats Long Evans spontanément diabétiques et non consanguins. Il s'agit de rats qui présentent une obésité modérée avec une hyperglycémie retardée apparaissant après 18 semaines de vie. Les gènes diabéto-gènes sont transmis uniquement par la femelle. Les îlots pancréatiques sont soumis à des modifications histologiques selon 3 stades. Le stade précoce (avant la 9<sup>ème</sup> semaine de vie) est caractérisé par une infiltration des lymphocytes, un stade d'hyperplasie et de fibrose à l'intérieur et autour des îlots (entre la 10<sup>ème</sup> et 40<sup>ème</sup> semaine) puis un stade final montrant l'apparition d'une atrophie des îlots (Kawano et al., 1994).
- La souris New Zealand (NZO) présente une résistance à la leptine ainsi qu'une hyperleptinémie à l'origine d'une hyperphagie. Ces souris présentent une altération de la morphologie des îlots et de l'expression du transporteur GLUT-2 (Chankiewicz et al., 2006). La résistance à l'insuline au niveau hépatique s'explique en partie par une altération de la régulation de la glucose-1,6-biphosphatase (Andrikopoulos et al., 1993).
- La souris TallyHo/jng est obèse et diabétique de type 2, obtenue par des croisements sélectifs entre souris hyperglycémiques et hyperinsulinémiques d'une colonie de souris non consanguines (Kim et al., 2005). Ces souris ont une adiposité augmentée et des taux plasmatiques de triglycérides, de cholestérols et d'acides gras libres élevés (King, 2012).

- La souris NoncNZO10/LtJ développe une insulino-résistance au niveau du foie et des muscles vers 8 semaines de vie puis devient hyperglycémique à partir de 12 semaines.

### **2.5.3. Les modèles obèses induits par l'alimentation**

Des souris normales C5BL/6 peuvent développer une intolérance au glucose lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en graisses (High Fat Diet). Ce type de régime est connu pour induire des désordres métaboliques comme une obésité ou un syndrome métabolique. La prise de poids est associée à une résistance à l'insuline et à une perte de la compensation des cellules  $\beta$  à l'origine d'une intolérance au glucose.

La gerbille du désert et le rat du Nil sont des animaux sauvages qui développent une obésité et un diabète lorsqu'ils sont en captivité et nourris par une alimentation standard de laboratoire.

### **2.5.4. Les modèles non obèses**

- Le rat Goto-Kakizaki (GK) est un modèle spontané et non obèse de diabète de type 2. Cette souche a été obtenue par un groupe de japonais qui a réalisé des croisements successifs entre des rats Wistar sélectionnés pour avoir une légère altération de la tolérance au glucose (GOTO et al., 1976). Ces rats sont donc caractérisés par une intolérance au glucose. L'hyperglycémie ne semble pas être initiée par une insulino-résistance (qui n'est que secondaire à l'hyperglycémie) mais elle est plutôt provoquée par une altération du développement de la masse cellulaire  $\beta$ , une dysfonction de ces cellules et une élévation de la production hépatique de glucose (Movassat et al., 1997; Picarel-Blanchot et al., 1996 ). Dès les premiers jours de vie, les rats GK ont une masse cellulaire  $\beta$  et un contenu en insuline diminués bien que leur glycémie soit normale (Movassat et al., 1997).
- La souris hIAPP et le rat HIP sont des animaux transgéniques qui expriment la protéine IAPP humaine ou hIAPP (polypeptide amyloïde des îlots) (Janson et al., 1996). Une des caractéristiques du diabète de type 2 est la formation de dépôts amyloïdes à l'intérieur des îlots, ce qui provoque un stress du réticulum endoplasmique et induit l'apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques (Huang et al., 2007). La demande en insuline ne peut pas être compensée par une augmentation de la fonction ou de la masse cellulaire  $\beta$  (Matveyenko and Butler, 2006; Matveyenko et al., 2009).

## Chapitre 3 : Les polyphénols

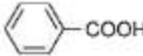
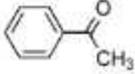
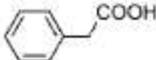
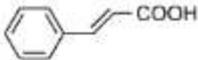
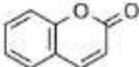
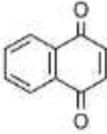
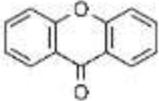
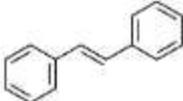
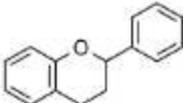
---

### 3.1. Définition et classification

Les polyphénols sont des composés largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des métabolites secondaires des plantes qui constituent un système de défense en les protégeant, notamment contre les rayons ultra-violet et les infections microbiennes (Harborne and Williams, 2000). Plus de 8 000 composés polyphénoliques ont été identifiés et retrouvés dans diverses espèces végétales.

Les polyphénols sont consommés par l'Homme et les principales sources alimentaires sont les fruits, les légumes, le thé, le café, le cacao et des boissons fermentées comme le vin, la bière et le cidre. Certains fruits contiennent 200 à 300 mg de polyphénols par 100 g de poids frais. Un verre de vin rouge ou une tasse de thé ou de café contient environ 100 mg de polyphénols (Pandey and Rizvi, 2009). La consommation journalière de polyphénols est estimée à environ 1 g par jour (Chun et al., 2007; Taguchi et al., 2015). Ces composés participent aux qualités sensorielles et nutritionnelles des végétaux consommés (astringence, amertume, couleur, odeur...).

Les composés phénoliques sont caractérisés par la présence commune d'au moins un cycle benzénique portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Ils peuvent être classés en fonction de la complexité de la structure du squelette de base (**figure 20**). D'un point de vue structurel, les acides phénoliques constituent la famille la plus simple avec un squelette de base de la forme C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>.

Skeleton	Classification	Basic structure
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Phenolic acids	
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetophenones	
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	phenylacetic acid	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Hydroxycinnamic acids	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Coumarins	
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphthoquinones	
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthones	
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbenes	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoids	

**Figure 20 : Classification des polyphénols en fonction de leur structure chimique de base (Crozier et al., 2009).**

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants dans le règne végétal (Neveu et al., 2010). Ainsi, il est courant d'utiliser une classification simplifiée qui divise les composés phénoliques en deux groupes : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (Crozier et al., 2009).

- Groupe des flavonoïdes :

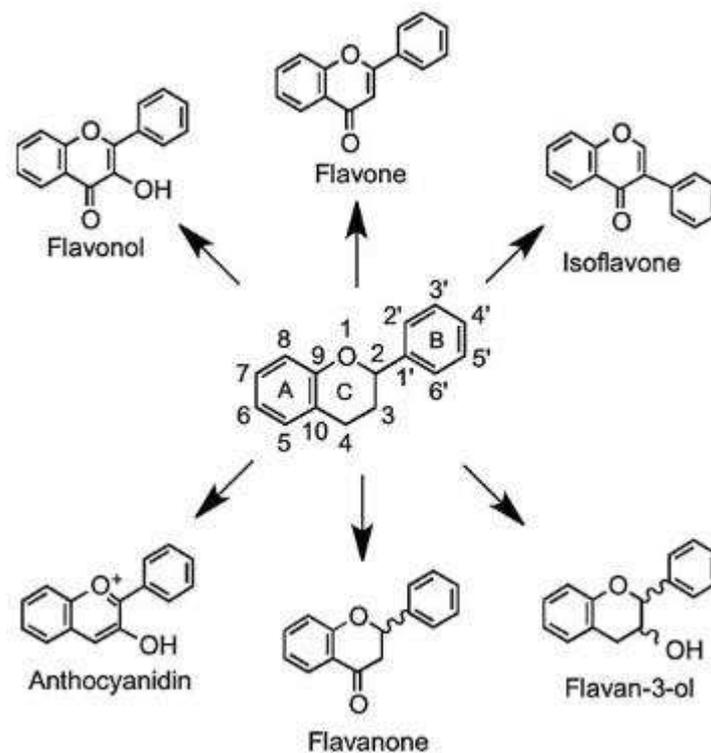
Les flavonoïdes, dont le squelette de base est C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, sont des composés polyphénoliques constitués de deux cycles aromatiques A et B reliés par un pont de 3 atomes de carbone formant un hétérocycle oxygéné. Il existe six sous-groupes de flavonoïdes plus particulièrement retrouvés dans notre alimentation (**figure 21**) :

- Les flavonols qui sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal à l'exception des algues et des champignons dans lesquels ils sont absents. La

quercétine et le kaempférol sont les plus connus. Les flavonols sont très peu retrouvés sous leur forme aglycone et sont, dans la majorité des cas, conjugués à des glycosides.

- Les flavones, telles que l'apigénine et la lutéoline, sont moins fréquentes dans notre alimentation. Elles sont notamment retrouvées dans le céleri, le persil et certaines herbes.
- Les isoflavones, telles que la génistéine et la daidzéine, sont présents presque exclusivement dans les légumineuses, et atteignent des quantités particulièrement élevées dans le soja. Elles peuvent présenter une activité estrogénique. Dans ce cas, il s'agit de phyto-estrogènes (Crozier et al., 2009).
- Les flavan-3-ols constituent un groupe complexe de flavonoïdes dont la structure peut varier d'une forme simple (ex : la catéchine) à des formes polymériques complexes (ex : les proanthocyanes). Ils sont présents dans différents types de fruits (comme les pommes, les abricots, les cerises) mais aussi dans le vin rouge et les céréales. Le thé vert et le chocolat semblent être les sources les plus riches en flavan-3-ols (Manach et al., 2004).
- Les flavanones sont généralement glycosylées, toutefois il est possible de rencontrer des aglycones telles que la naringénine dans le pamplemousse, l'hespérintine dans les oranges et l'eriodictyol dans le citron. Les flavanones sont présentes dans les tomates et la menthe ; les teneurs les plus importantes sont retrouvées dans les agrumes (Manach et al., 2004).
- Les anthocyanes sont largement présents dans le règne végétal et particulièrement dans les fruits et les fleurs colorés car ils sont responsables de leur couleur rouge, violette ou bleue (Crozier et al., 2009). Dans notre alimentation, ils sont présents dans le vin rouge, certaines variétés de céréales et certains légumes tels que l'aubergine, l'oignon et le radis (Manach et al., 2004). La cyanidine est l'anthocyane alimentaire le plus répandu.

Il existe d'autres sous-groupes de flavonoïdes considérés comme mineurs car faiblement retrouvés dans notre alimentation. Il s'agit des dihydroflavonols, des flavan-3,4-diols, des coumarines, des chalcones, des dihydrochalcones et des auronés.



**Figure 21 : Structure des principaux sous-groupes de flavonoïdes consommés par l'Homme (Del Rio et al., 2013).**

- Groupe non flavonoïdes :

Ce groupe comprend des composés phénoliques hétérogènes d'un point de vue structurel.

Parmi les non-flavonoïdes consommés par l'Homme, on peut citer :

- Les acides phénoliques (squelette de base C6-C1) qui sont les plus abondants. Ils appartiennent à deux familles : les acides hydroxybenzoïques (ex : acide gallique contenu notamment dans le thé vert, le thé noir et le vin) et les acides hydroxycinnamiques (ex : acide caféique, acide p-coumarique, acide férulique).
- Les ellagitanins qui sont des tanins dont l'hydrolyse, au niveau de l'estomac et le l'intestin grêle, aboutit à la formation d'acide ellagique. L'ellagitanin sanguin H-6 est présent dans les fraises, les framboises, les mûres et les noix et l'ellagitanin punicalagine est retrouvé dans la grenade. Après dépolymérisation de l'ellagitanin, l'acide ellagique, peu absorbé tel quel, est métabolisé par la microflore colique en molécules plus absorbables : les urolithines, objet de notre thèse.

- Les stilbènes sont des polyphénols moins répandus. Le resvératrol, présent notamment dans le vin rouge, semble posséder des propriétés biologiques multiples et a fait l'objet de nombreuses études.
- Les lignanes, qui, comme l'acide ellagique, sont métabolisés par la microflore intestinale. Ils conduisent à la formation d'enterodiol et d'entérolactone, métabolites associés à des effets « santé » potentiels. Les graines de lin en sont les principales sources alimentaires.

### **3.2. Biodisponibilité des polyphénols chez l'Homme**

#### **3.2.1. Absorption intestinale et métabolisme**

La plupart des polyphénols présents dans les végétaux sont liés à des groupements chimiques, en majorité à des groupements glycosidiques, les rendant ainsi difficilement absorbables. Ainsi, pour être absorbés, la grande majorité des polyphénols vont subir une hydrolyse (formation de l'aglycone) par les enzymes intestinales ou être métabolisés par la microflore intestinale.

C'est dans la cavité buccale que la première étape du métabolisme des polyphénols a été décrite. En effet, après ingestion, les polyphénols peuvent y être partiellement modifiés par la salive et la microflore de la cavité buccale (Walle et al., 2005). Cependant, cette étape est mineure dans le processus de métabolisation des polyphénols.

L'intestin grêle est majoritairement impliqué dans le métabolisme des polyphénols. A ce niveau, les polyphénols et en particulier les flavonoïdes encore conjugués, peuvent subir une hydrolyse par l'action de la lactase phlorizine hydrolase (LPH), une enzyme exprimée dans la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'intestin grêle (Day et al., 2000; Del Rio et al., 2013). La LPH, qui présente une large spécificité de substrat pour les flavonoïdes-O- $\beta$ -D-glucosides, permet la libération de la forme aglycone par le clivage du groupement glycosidique. Ceci induit une augmentation de sa lipophilicité et favorise ainsi son passage par diffusion dans l'entérocyte (Day et al., 2000) (**figure 22**).

Il existe également une voie alternative conduisant à l'hydrolyse des groupements glycosidiques. Celle-ci implique la  $\beta$ -glucosidase cytosolique (CBG), exprimée à l'intérieur des entérocytes. Ainsi, pour que l'hydrolyse par la CBG se produise, les polyphénols glycosylés sont transportés à l'intérieur de l'entérocyte, notamment grâce au transporteur de glucose dépendant du sodium (SGLT-1). Une fois dans la cellule, l'action de la CBG permettra de générer l'aglycone (Del Rio et al., 2013).

Il existe donc deux voies susceptibles de conduire à l'augmentation d'aglycones au sein de l'entérocyte : la voie de la LPH et la voie impliquant la SGLT-1 et la CBG (**figure 22**).

Avant d'entrer dans la circulation générale, les aglycones présents dans les entérocytes subissent un métabolisme de phase II par réaction de glucuronidation, sulfatation et méthylation. Ces réactions sont respectivement effectuées par les enzymes uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransférases (UGT), sulfotransférases (SULT) et catéchol-O-méthyltransférases (COMT).

Ce métabolisme de phase II, qui correspond à un procédé de détoxification commun aux xénobiotiques, favorise leur élimination urinaire et biliaire en augmentant leur hydrophilicité. Les métabolites ainsi formés dans les entérocytes peuvent soit retourner dans la lumière intestinale *via* les transporteurs MRP1 et MRP2 (Multidrug Resistance Protein 1 et 2), soit passer dans la circulation sanguine par la veine porte *via* les transporteurs MRP3 (Multidrug Resistance Protein 3) et GLUT-2 (Del Rio et al., 2013) (**figure 22**).

Les métabolites de polyphénols atteignent ensuite le foie où ils pourront subir à nouveau un métabolisme de phase II, avant de passer dans la circulation systémique et atteindre leurs tissus cibles. Ils peuvent également retourner dans la lumière intestinale *via* le canal cholédoque (circulation entéro-hépatique).

Seuls 5 à 10 % des polyphénols consommés sont absorbés au niveau de l'intestin grêle. Par conséquent, 90 à 95 % des polyphénols sous forme native ou conjuguée s'accumulent au niveau du côlon, à des concentrations pouvant atteindre des valeurs de l'ordre du millimolaire. Ces polyphénols peuvent alors y subir l'action de la microflore intestinale, responsable du clivage des formes conjuguées et entraînant la formation des aglycones. Ces aglycones sont ensuite catabolisés par ouverture d'un ou plusieurs hétérocycles. Des étapes ultérieures d'hydrolyse de groupements chimiques conduiront à des catabolites de faibles poids moléculaires plus facilement absorbables.

Il est intéressant de remarquer qu'il existe une interaction réciproque entre le microbiote intestinal et les polyphénols. En effet, les polyphénols eux-mêmes peuvent également moduler la population bactérienne du microbiote (Ozidal et al., 2016; Selma et al., 2009).

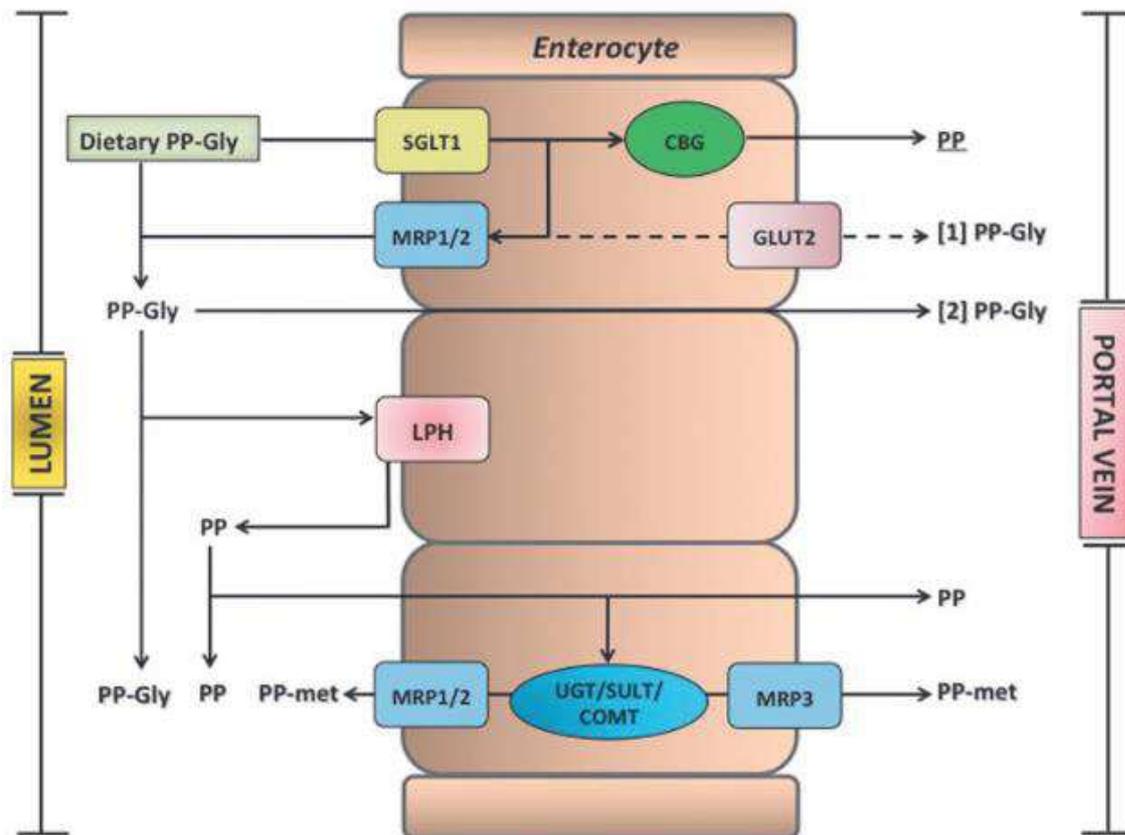


Figure 22 : Mécanisme d'absorption de composés (poly)phénoliques au niveau de l'intestin grêle (Del Rio et al., 2013).

### 3.2.2. Elimination

L'élimination des polyphénols et de leurs métabolites peut se faire par voie urinaire ou par voie biliaire. L'implication de l'une ou l'autre voie dépend de la nature des polyphénols.

Le cycle entéro-hépatique permet de prolonger la présence des polyphénols dans l'organisme.

### 3.3. Polyphénols et diabète

#### 3.3.1. Etudes épidémiologiques

Des études épidémiologiques reportent des effets favorables d'une consommation d'aliments riches en polyphénols (fruits, légumes, thé, café, etc...) pour diminuer le risque de développer un diabète de type 2. Toutefois, un lien direct de cause à effet entre une alimentation riche en polyphénols et une diminution de la prévalence du diabète de type 2 n'a pas été démontré.

Deux études (The Women's Health Study et Iowa Women's Health Study) menées sur environ 35 000 femmes n'ont pas permis d'établir un lien direct entre la consommation de flavonoïdes et la baisse du risque de développer un diabète de type 2. Cependant, la consommation d'au moins une pomme par jour d'une part (Nettleton et al., 2006), ou d'un verre de vin rouge par semaine d'autre part (Song et al., 2005), diminueraient l'incidence de la maladie.

D'autres études épidémiologiques plus récentes suggèreraient un lien entre une forte consommation de thé vert ou de café et la diminution du risque de développer un diabète de type 2 (van Dieren et al., 2009; Ding et al., 2014; Yang et al., 2014).

### **3.3.2. Etudes d'intervention**

Une étude montre que la consommation de thé vert riche en catéchine (apport de 500 mg par jour de catéchine) chez des patients diabétiques de type 2 sous traitement insulinothérapeutique permettrait d'augmenter l'insulinémie et d'améliorer la baisse du taux d'hémoglobine glyquée (Nagao et al., 2009).

Une supplémentation en resvératrol (250 mg/jour pendant 3 mois) chez des patients diabétiques de type 2 traités avec un hypoglycémiant, permettrait d'accentuer la diminution du taux d'hémoglobine glyquée, de la pression artérielle systolique et du cholestérol total par rapport à des patients diabétiques traités mais non supplémentés (Bhatt et al., 2012).

Il a également été montré qu'une supplémentation avec un extrait standardisé de baies du maqui du Chili (Delphinol<sup>®</sup>), riche en delphinidines et en anthocyanes (respectivement 35 % et 25 % poids/poids) permettrait de diminuer la glycémie post-prandiale chez des patients diabétiques en inhibant le co-transporteur sodium/glucose au niveau de l'intestin grêle (Hidalgo et al., 2014).

Une supplémentation en anthocyanes (160 mg deux fois par jour) conduirait à des effets métaboliques bénéfiques chez des patients diabétiques, en améliorant le profil lipidique, les capacités anti-oxydantes et en prévenant la résistance à l'insuline (Li et al., 2015a).

Enfin, une autre étude montre que la supplémentation d'un mélange de polyphénols (333 mg par jour pendant 6 semaines) issu de la fraise et de la canneberge contenant des anthocyanes, des proanthocyanes, des ellagitanins, des acides phénoliques et des flavonols permettrait d'améliorer la sensibilité à l'insuline chez des sujets non diabétiques obèses ou en surpoids (Paquette et al., 2017).

### 3.3.3. Activités des polyphénols sur le métabolisme glucidique : mécanismes d'action potentiels

Des résultats montrent qu'au-delà de leur propriété anti-oxydante, les composés phénoliques sont des molécules pharmacologiquement actives qui peuvent interagir avec des cibles moléculaires. Cependant, il est important de préciser que la majorité des études porte sur l'activité des formes aglycones ou des composés phénoliques retrouvés dans les plantes. Toutefois, la majorité des polyphénols susceptibles d'être détectés dans la circulation sanguine, chez l'Homme, sont des métabolites de phase II ou des catabolites générés par l'action de la microflore intestinale.

Différentes études *in vitro* et *in vivo* montrent que les polyphénols pourraient moduler le métabolisme glucidique et présenter des activités antidiabétiques en faisant intervenir différents mécanismes (Kim et al., 2016; Martel et al., 2016; Solayman et al., 2016) :

- *Inhibition de la dégradation et de l'absorption intestinale des sucres*

Parmi les mécanismes d'action potentiels, des chercheurs ont suggéré que les polyphénols pouvaient intervenir dans le métabolisme glucidique dès les étapes de digestion et d'absorption intestinale des sucres. En effet, certains polyphénols tels que les anthocyanes et les ellagitanins seraient capables d'inhiber *in vitro* l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -glucosidase et de l' $\alpha$ -amylase (deux enzymes clés de la digestion des carbohydrates) (Funke and Melzig, 2005; McDougall and Stewart, 2005; Tadera et al., 2006). De plus, il a également été décrit que la quercétine glucoside et des acides phénoliques inhiberaient la captation et le transport du glucose au niveau intestinal (Cermak et al., 2004; Johnston et al., 2005).

- *Amélioration de la captation du glucose par le foie et les muscles*

L'epigallocatechine-3-O-gallate (EGCG) permettrait de protéger les cellules musculaires de rat de la résistance à l'insuline induite par la dexaméthasone, en augmentant la translocation de GLUT-4 grâce à l'activation des voies de signalisation AMPK et PI3K/Akt (Zhang et al., 2010). Le resvératrol augmenterait l'activité de l'AMPK selon un mécanisme dépendant de SIRT-1 (Côté et al., 2015; Fullerton and Steinberg, 2010).

- *Protection de la cellule  $\beta$  pancréatique et effets insulino-sécrétoires*

Des anthocyanes tels que la cyanidine-3-glucoside et la delphidine-3-glucoside, et des anthocyanidines, ont été décrits comme étant capables de potentialiser la sécrétion d'insuline dans la lignée cellulaire  $\beta$  INS-1 (Jayaprakasam et al., 2005).

L'EGCG et la rutine pourraient atténuer la glucotoxicité dans la lignée cellulaire  $\beta$  RIN-m5R en activant la signalisation de l'IRS-2 (insulin receptor substrate 2) et de l'AMP kinase (Cai and Lin, 2009).

La quercétine, qui est un polyphénol de la famille des flavonoïdes, a fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. Dans un modèle de rat diabétique induit par la streptozotocine, l'administration de 10 à 15 mg/kg/jour de quercétine par voie intrapéritonéale (i.p.), pendant six jours, diminue la glycémie, améliore la tolérance au glucose et augmente le nombre d'îlots pancréatiques (Vessal et al., 2003). Dans ce même modèle de rat diabétique, d'autres chercheurs ont montré que l'administration de 15 mg/kg/jour de quercétine par voie i.p., diminue la glycémie et augmente l'insulinémie (Coskun et al., 2005). De plus, ce traitement est corrélé à une élévation de l'activité d'enzymes antioxydantes dans les îlots et à une baisse des marqueurs plasmatiques du stress oxydatif (malondialdéhyde et oxyde nitrique). Des effets antidiabétiques de la quercétine ont également été rapportés chez la souris *db/db*. Dans ce modèle, une supplémentation en quercétine dans la nourriture (0.08% durant sept semaines) régule la glycémie à jeun et la glycémie post-prandiale, et diminue le taux d'hémoglobine glyquée (Kim et al., 2011).

Les travaux réalisés dans notre laboratoire, montrent que, dans la lignée cellulaire  $\beta$  INS-1, ce polyphénol potentialise la sécrétion d'insuline et protège la cellule  $\beta$  contre le stress oxydant via l'activation de la voie ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) (Youl et al., 2010). De plus, l'effet insulino-sécrétoire de la quercétine est médié par une activation directe des canaux calciques  $Cav$  de type L (Bardy et al., 2013). Récemment, des auteurs ont identifié que la quercétine jouerait un rôle dans la sécrétion d'insuline en induisant également de façon transitoire la fermeture des canaux  $K_{ATP}$  à l'origine d'une dépolarisation de la membrane (Kittl et al., 2016).

Des propriétés antidiabétiques ont également été attribuées au resvératrol lors d'études *in vivo* et *in vitro*. L'administration orale de resvératrol (5 mg/kg/jour pendant 30 jours) permettrait de normaliser l'hyperglycémie chez des rats diabétiques traités à la streptozotocine (Palsamy and Subramanian, 2008). Le resvératrol (20 mg/kg/jour pendant 12 semaines) permettrait

également d'améliorer la tolérance au glucose chez des souris *db/db* (Lee et al., 2012). Cet effet serait corrélé à une augmentation de la masse cellulaire  $\beta$  associée à une diminution des marqueurs de stress oxydant au sein des îlots de Langerhans.

Une étude a montré que le resvératrol potentialisait la sécrétion d'insuline induite par le glucose sur la lignée cellulaire MIN-6 en inhibant l'activité de la phosphodiesterase (enzyme qui dégrade l'AMPc) (Rouse et al., 2014). La pré-incubation de cellules INS-1 en présence de resvératrol pendant 24h permettrait une amélioration de la sécrétion d'insuline selon un mécanisme dépendant de SIRT-1 (Vetterli et al., 2011). En effet, SIRT-1 paraît réguler positivement la sécrétion d'insuline en réprimant l'expression du gène de la protéine UCP-2 (Bordone et al., 2005). En effet, la surexpression de UCP-2 diminue les niveaux d'ATP et la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Chan et al., 2001).

Des flavonoïdes tels que l'apigénine, la lutéoline et la quercétine protègeraient *in vitro* la cellule  $\beta$  des cytokines pro-inflammatoires en diminuant l'activation de NF- $\kappa$ B (Kim et al., 2007).

D'autres polyphénols appartenant aux groupes des flavonoïdes et des non-flavonoïdes ont été décrits *in vitro* et *in vivo* comme étant capables de protéger la fonctionnalité de la cellule  $\beta$  pancréatique. Ces études sont détaillées dans la revue bibliographique « Protection of pancreatic  $\beta$ -cell function by dietary polyphenols » intégrée dans cette thèse (voir page 91)

- *Modulation de la composition du microbiote intestinal*

La majorité des polyphénols ingérés atteint le côlon du fait d'un faible taux d'absorption au niveau de l'intestin grêle (5 à 10 %). Plusieurs études ont montré que les polyphénols pouvaient jouer un rôle de prébiotique en favorisant la croissance de certaines espèces bactériennes.

En effet, des essais cliniques ont montré par exemple que la consommation de thé vert, d'extraits de grenade riches en ellagitanins ou d'extraits de myrtille riche polyphénols (anthocyanes, acide chlorogénique) pouvait augmenter le taux de *Bifidobacteria* (Jin et al., 2012; Li et al., 2015b; Vendrame et al., 2011), population bactérienne associée à une amélioration de la tolérance au glucose et à une baisse des marqueurs de l'inflammation tels que IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$  et MCP1 (monocyte chemottractant protein 1) (Anhê et al., 2013; Cani et al., 2007b, 2008).

Enfin, l'administration d'extraits de canneberges riches en polyphénols chez des souris soumises à un régime riche en graisses favoriserait la présence de *Akkermansia* dans le

microbiote de ces animaux et serait associé à une atténuation du développement de l'obésité induite par ce régime (Anhê et al., 2016; Roopchand et al., 2015).

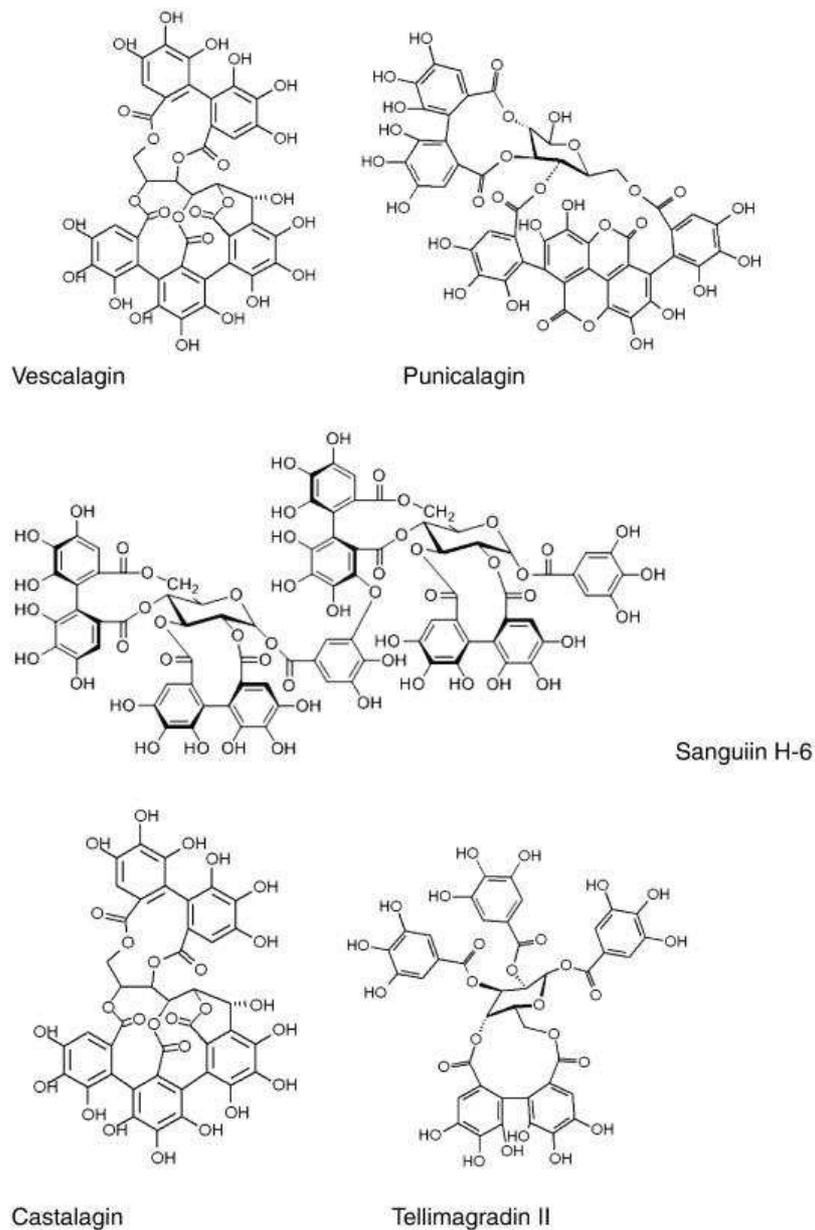
### **3.4. Les urolithines :**

#### **3.4.1. Structure chimique et rôle du microbiote intestinal**

Les urolithines sont des dérivés dibenzopyrane-6-one produites par le microbiote intestinal et dérivés du métabolisme des ellagitanins et de l'acide ellagique.

Les ellagitanins et l'acide ellagique sont des tanins hydrolysables consommés par l'Homme (**figure 23**). Ces composés sont présents dans les fruits, les graines et les aliments ou boissons à base de fruits ou de confiture. A titre d'exemples, la grenade est riche en ellagitanins punicalagines, les framboises et les fraises sont riches en ellagitanins sanguin H-6. La consommation journalière d'ellagitanins ne dépasse pas une dizaine de mg (12 mg/jour en Finlande, 5 mg/jour en Allemagne) (Landete, 2011).

Les ellagitanins ne sont pas absorbés tels quels par l'organisme. Une fois consommés, ils sont métabolisés en acide ellagique au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle. L'acide ellagique, également très peu absorbable, est à son tour métabolisé par le microbiote intestinal pour conduire à la production de différentes urolithines (Espín et al., 2013; García-Villalba et al., 2013; Gonzalez-Barrio et al., 2011).



**Figure 23 : Exemples d'ellagitanins consommés par l'Homme (Landete, 2011).**

Les urolithines constituent une famille de catabolites produits par l'activité enzymatique de certaines bactéries du microbiote colique. L'ouverture et la décarboxylation de l'un des deux groupements lactone de l'acide ellagique ainsi que la perte séquentielle de groupements hydroxyles (-OH), sont à l'origine de la formation des différentes urolithines (Espín et al., 2013) (**figure 24**) :

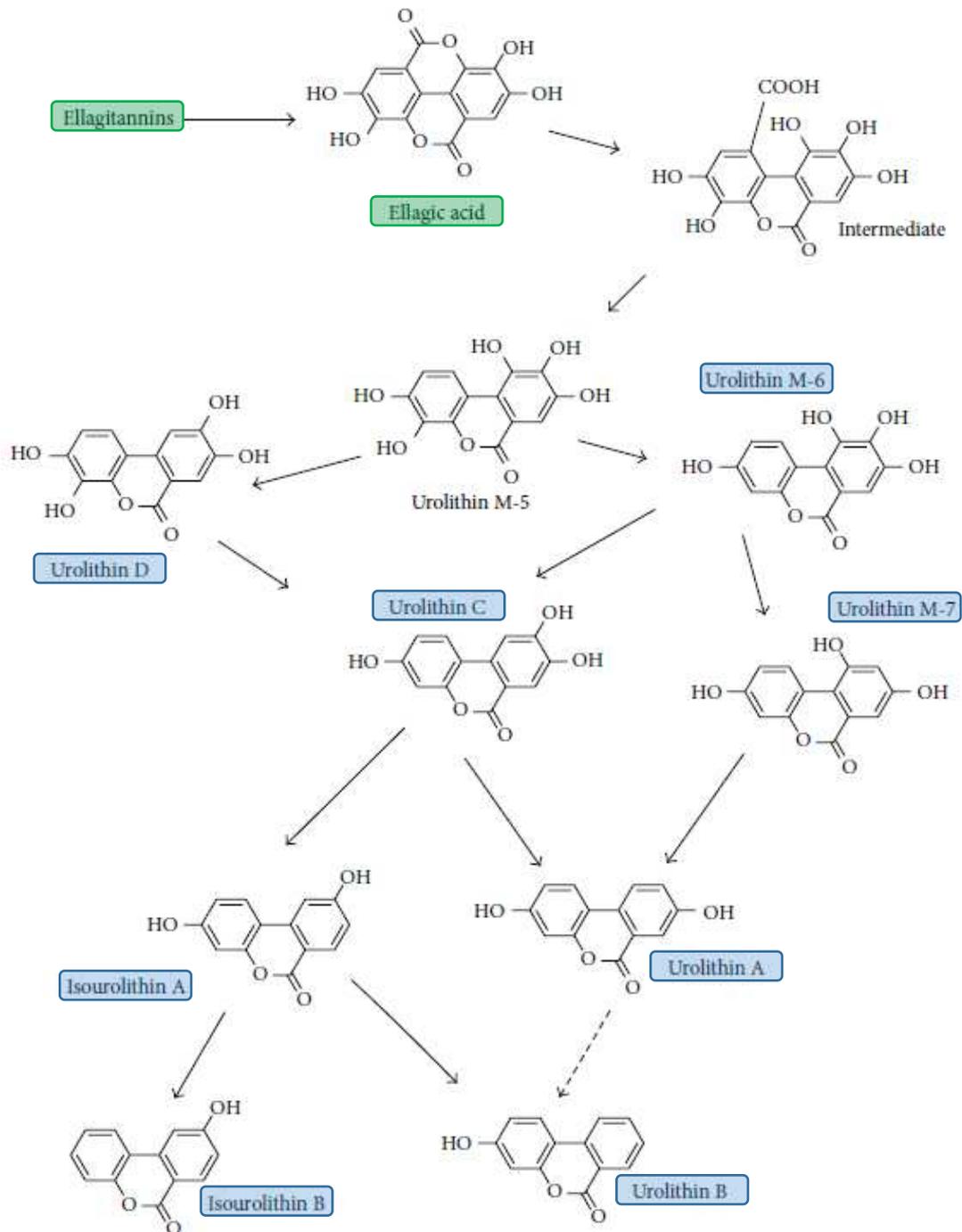
- L'urolithine D et l'urolithine M-6 comportent quatre -OH (tétrahydroxy-urolithine),
- L'urolithine C et l'urolithine M-7 comportent trois -OH (trihydroxy-urolithine),
- L'urolithine A et l'isourolithine A comportent deux -OH (dihydroxy-urolithine),

- L'urolihine B comporte un -OH (monohydroxy-urolihine).

Les urolithines A, B, C et D, considérés comme des produits de fin de réaction lors du métabolisme intestinal des ellagitanins et de l'acide ellagique, sont les principaux métabolites détectés chez l'Homme (Gonzalez-Barrio et al., 2011; Kang et al., 2016a).

La première étude testant *in vivo* la biodisponibilité des ellagitanins a été réalisée chez le rat (Cerdá et al., 2003). Dans cette étude, les principaux métabolites urinaires identifiés après l'ingestion d'extraits de grenade riches en ellagitanins étaient l'urolihine A, l'urolihine B et l'urolihine C. D'autres auteurs ont également confirmé la production des urolithines par le microbiote, *in vivo* sur le modèle du porc ibérique (Espín et al., 2007).

La capacité du microbiote humain à produire des urolithines a été démontrée par des études de fermentation *in vitro* de l'acide ellagique, de punicalagin et d'extraits de noix riches en ellagitanins (Cerdá et al., 2005a). Ce rôle du microbiote humain a également été décrit chez des volontaires sains après consommation de jus de grenade riches en ellagitanins (Cerdá et al., 2004; Seeram et al., 2006).



**Figure 24 : Représentation schématique du métabolisme des ellagitanins et de l'acide ellagique par le microbiote intestinal chez l'Homme (Espín et al., 2013).**

Toutefois, la production de ces métabolites est sujette à une grande variabilité interindividuelle (Cerdá et al., 2005b; Selma et al., 2009). Cette observation suggère que les différences de composition du microbiote peuvent influencer la formation des urolithines.

Des essais cliniques concernant le métabolisme des ellagitanins et de l'acide ellagique chez des volontaires sains, illustrent cette variabilité interindividuelle en distinguant de façon consistante trois profils métaboliques (phénotypes A, B et 0) en fonction de la production et de l'excrétion urinaire des urolithines. Le phénotype A ne produit que de l'urolithine A, le phénotype B produit de l'urolithine A, de l'isourolithine A et de l'urolithine B, le phénotype 0 ne produit pas d'urolithine. Chez les volontaires sains, il semblerait que le phénotype A soit le plus répandu (70 %), suivi du phénotype B (20 %) puis du phénotype 0 (10 %). Cette proportion ne semble pas être variable en fonction du genre, de l'âge et de la situation géographique des individus (Tomás-Barberán et al., 2014).

Peu de données identifient clairement les souches bactériennes responsables de la production des urolithines. Récemment, il a été montré qu'une production plus spécifique des urolithines M-5, M-6 et C à partir de l'acide ellagique (**figure 24**) était réalisée par deux espèces bactériennes issues du microbiote humain : *Gordonibacter urolithinifaciens* et *Gordonibacter pamelaee* (Selma et al., 2014a, 2014b) qui ne possèdent pas les capacités d'effectuer les déshydroxylations conduisant aux urolithines A et B et à l'isourolithine A.

Aucune autre étude n'a identifié précisément des souches bactériennes impliquées spécifiquement dans la formation des autres urolithines. Cependant, des études basées sur des expériences de fermentation *in vitro* établissent des corrélations entre la présence de certaines bactéries dans le microbiote humain et la détection de différentes urolithines dans les urines et le plasma. Par exemple, la présence des bactéries *Gordonibacter* et *Akkermansia* dans le microbiote humain serait positivement corrélée à la production d'urolithine A (Henning et al., 2015; Romo-Vaquero et al., 2015; Selma et al., 2016). *Gordonibacter* serait également inversement corrélée à la production d'isourolithine A et/ou d'urolithine B (Romo-Vaquero et al., 2015). Le groupe bactérien *Clostridium coccoides* serait également impliqué dans le catabolisme de l'acide ellagique (García-Villalba et al., 2013).

### **3.4.2. Absorption et distribution**

Des études menées chez l'Homme ont montré que les urolithines sont susceptibles d'être absorbées au niveau du côlon puisqu'elles peuvent être détectées dans le plasma et les urines suite à la consommation d'extraits de noix ou de grenades riches en ellagitanins. Certaines études précisent que les urolithines A et B, majoritairement conjuguées à des groupements glucuronides, sont détectées dans le plasma 6 heures après l'ingestion de jus de grenade et jusqu'à 48 heures dans les urines (Seeram et al., 2006). Les concentrations plasmatiques

peuvent atteindre des valeurs de l'ordre du micromolaire chez des individus sains consommant 1 L de jus de grenade par jour pendant 5 jours (Cerdá et al., 2004). De plus, d'importantes concentrations d'urolithines ont été détectées dans la vésicule biliaire lors d'une étude *in vivo*, suggérant que ces métabolites sont soumis à une recirculation entéro-hépatique (Espín et al., 2007).

En ce qui concerne la distribution tissulaire, une étude de pharmacocinétique réalisée chez la souris montre que la prostate est la principale cible de stockage tissulaire de l'urolithine A après son administration par voie intra-péritonéale (Seeram et al., 2007). Chez l'Homme, la prostate et le côlon sont les seuls tissus dans lesquels la présence d'urolithines (en particulier l'urolithine A) a été rapportée (Freedland et al., 2013; González-Sarrías et al., 2010a; Nuñez-Sánchez et al., 2014).

### **3.4.3. Activités biologiques**

Depuis une dizaine d'années, il existe un intérêt grandissant concernant les effets biologiques des urolithines.

La consommation de produits alimentaires ou d'extraits riches en ellagitanins tels que le jus de grenades aurait des effets bénéfiques sur la santé (Ghavipour et al., 2017; Sahebkar et al., 2017).

Cependant, étant donné la faible biodisponibilité des ellagitanins et de l'acide ellagique, les effets biologiques observés pourraient être attribués à leurs métabolites : les urolithines.

#### **3.4.3.1. Activités *in vitro***

Les effets « santé » des urolithines basés sur des études *in vitro* sont nombreux. Ces activités concernent majoritairement l'urolithine A qui est l'urolithine la plus étudiée.

##### **- Activité antioxydante :**

Une étude basée sur l'inhibition de la génération de ROS au niveau intracellulaire, montre que l'urolithine C et l'urolithine D seraient les plus actives, alors que l'urolithine B et les métabolites méthylés ne présenteraient pas de potentiel antioxydant (Bialonska et al., 2009). Le pouvoir antioxydant serait favorisé à la fois par le nombre de groupements hydroxyles et par la capacité de la molécule à entrer dans la cellule (à relier à son hydrophobicité).

- Activité anti-inflammatoire :

L'activité anti-inflammatoire des urolithines a été suggérée en utilisant plusieurs modèles cellulaires. Des études réalisées sur des fibroblastes de côlon humain incubés en présence de cytokines pro-inflammatoires, montrent que les urolithines A et B (10  $\mu$ M) présentent une activité anti-inflammatoire en diminuant la production de prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (González-Sarrías et al., 2010b). Le mécanisme d'action de l'urolithine A impliquerait une inhibition de l'expression de COX-2 (cyclo-oxygénase 2) et de mPGES-1 (microsomal prostaglandin E synthase-1), deux enzymes responsables de la synthèse de prostaglandines en condition inflammatoire. De plus, cet effet anti-inflammatoire des urolithines serait médié par l'inhibition de l'activation de la p38 MAPK, de JNK et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. L'urolithine B, moins active, diminuerait la production de PGE<sub>2</sub>, en inhibant uniquement l'activation de la p38 MAPK et de NF- $\kappa$ B (González-Sarrías et al., 2010b).

Une deuxième étude effectuée sur le même modèle expérimental, suggère qu'un mélange d'urolithine A, d'urolithine B et d'acide ellagique (contenant des concentrations susceptibles d'être atteintes au niveau côlon : respectivement 40, 5 et 1  $\mu$ M pour l'urolithine A, B et l'acide ellagique), inhibe deux processus impliqués dans la réponse inflammatoire : la migration des fibroblastes et l'adhésion de monocytes au niveau des fibroblastes du côlon (Giménez-Bastida et al., 2012a). Ces effets seraient associés à une diminution des taux de PGE<sub>2</sub>, de PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) et d'IL-8 (interleukine-8) qui sont des régulateurs clés de la migration et de l'adhésion cellulaire.

Des résultats similaires ont été décrits sur des cellules endothéliales aortiques humaines. L'urolithine A glucuronide (principal métabolite détecté au niveau plasmatique) inhiberait en partie l'adhésion des monocytes au niveau de ces cellules endothéliales (Giménez-Bastida et al., 2012b).

Plus récemment, un autre groupe de chercheurs suggère que les urolithines A, B et C (40  $\mu$ M) pourraient inhiber l'inflammation induite par les lipopolysaccharides au niveau de macrophages de souris par une diminution de la production de NO (oxyde nitrique) et une inhibition de l'expression de la iNOS (NO synthase inductible). De plus, une diminution des marqueurs de l'inflammation tels que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 a été reportée (Piwowarski et al., 2015). Les urolithines présenteraient également une activité anti-inflammatoire en inhibant la production et la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires au niveau de neutrophiles humains, premiers leucocytes à s'infiltrer dans le tissu et contribuant au processus inflammatoire (Piwowarski et al., 2014).

- Activité anti-cancéreuse

L'activité anti-cancéreuse des urolithines a majoritairement été décrite sur des cellules cancéreuses humaines de la prostate et du côlon.

Les urolithines A, B, C et D sont décrites pour inhiber l'activité de l'enzyme CYP1B1 (enzyme du cytochrome P450) qui est une cible de chimioprévention dans le cancer de la prostate (Kasimsetty et al., 2009). L'urolithine A semble inhiber la prolifération de cellules cancéreuses de la prostate en augmentant l'expression de la protéine p21 au rôle antiprolifératif (Sánchez-González et al., 2016). L'activité anti-cancéreuse de l'urolithine D a été décrite dans des cellules cancéreuses humaines de la prostate. Son mécanisme d'action impliquerait l'inhibition sélective de la phosphorylation de EphA2 (Giorgio et al., 2015).

L'effet antiprolifératif des urolithines, et en particulier des urolithines A et B, a également été décrit sur des cellules humaines cancéreuses de côlon : les cellules Caco-2 (González-Sarrías et al., 2009). Cet effet antiprolifératif serait médié par l'arrêt du cycle cellulaire associé à une modulation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et dans le développement de cancer tels que des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs et des récepteurs de facteurs de croissance. D'autres études suggèrent que les urolithines A, B, C et D (testées séparément ou en association ; à des concentrations susceptibles d'être rencontrées atteintes dans le côlon après consommation d'aliments riches en ellagitanins) exercent des effets anti-cancéreux en inhibant la prolifération et en favorisant l'arrêt du cycle cellulaire dans trois lignées cellulaires humaines de cancer du côlon (cellules Caco-2, SW480 ou HT-29) (González-Sarrías et al., 2014, 2016a; Kasimsetty et al., 2010). Les cellules Caco-2 semblent être les plus sensibles aux traitements des urolithines. Parmi les quatre urolithines, l'urolithine A serait la plus active. De plus, l'urolithine A glucuronide et urolithine B glucuronide, métabolites produits suite au métabolisme de phase II, semblent conserver un effet antiprolifératif, cependant plus faible que celui des aglycones (González-Sarrías et al., 2014).

L'urolithine A potentialiserait les effets anti-cancers du 5-fluorouracile (utilisé en chimiothérapie), suggérant qu'elle pourrait être utilisée comme adjuvant en chimiothérapie (González-Sarrías et al., 2015).

Enfin, une étude suggère que l'urolithine A seraient capable d'inhiber la voie Wnt qui intervient dans le contrôle de la prolifération cellulaire et qui est dérégulée en cas de cancer (Sharma et al., 2010).

- Modulation estrogénique

Des études de relations structure-activité révèlent que les urolithines A et B présentent des caractéristiques moléculaires leur permettant de se lier potentiellement aux récepteurs estrogéniques  $\beta$  et  $\alpha$  et à moduler leur activité (Dellafiora et al., 2013; Larrosa et al., 2006).

- Autres activités

D'autres propriétés biologiques des urolithines ont été décrites *in vitro* mais restent à l'heure actuelle moins documentées. Entre autre, les urolithines exerceraient une activité neuroprotectrice (Yuan et al., 2016), inhiberaient la glycation de protéines (Verzelloni et al., 2011) et présenteraient des effets cardiovasculaires bénéfiques (Han et al., 2016; Mele et al., 2016; Spigoni et al., 2016). Il a également été rapporté que les urolithines A, C et D atténueraient l'accumulation de triglycérides dans des cultures de cellules humaines d'hépatocytes et d'adipocytes (Kang et al., 2016b).

### 3.4.3.2. Activités *in vivo* :

Bien qu'il existe de nombreuses études *in vitro* décrivant diverses activités biologiques des urolithines, peu de données ont été validées *in vivo*. Seule leur activité anti-inflammatoire semble être mise en évidence *in vivo*.

A titre d'exemple, Larrosa et ses collaborateurs ont démontré une activité anti-inflammatoire de l'urolithine A chez le rat Fisher, dont l'inflammation au niveau du côlon est induite par une administration de DSS 5% (dextran sodium sulfate) dans l'eau de boisson pendant 5 jours (Larrosa et al., 2010). En effet, après consommation d'urolithine A (15 mg/kg/jour pendant 25 jours), des facteurs de l'inflammation tels que la iNOS, la COX-2 et la prostaglandine E synthase (PTGES) étaient diminués au niveau de la muqueuse du côlon. Dans cette même étude, un effet prébiotique de cette molécule a été reporté chez des rats normaux. L'urolithine A serait en effet capable de moduler de façon favorable le microbiote intestinal en augmentant *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*.

Des auteurs ont également décrit une activité anti-inflammatoire de l'urolithine A (300 mg/kg ; administration en aigu par voie orale) dans un modèle d'inflammation classiquement utilisé pour démontrer l'activité anti-inflammatoire de médicaments : celui de la souris présentant un œdème de la patte induit par une injection en sous-cutané de carraghénine (Ishimoto et al., 2011). Dans cette étude, seule la diminution du volume de l'œdème (et non

des marqueurs de l'inflammation) a été prise en considération pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'urolithine A.

Plus récemment, il a été décrit que l'urolithine A (50  $\mu$ M) allongeait la durée de vie du nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) et que cet effet serait dépendant de l'expression de gènes de l'autophagie et de la mitophagie (Ryu et al., 2016). Ces mêmes travaux, ont confirmé une élévation des marqueurs de l'autophagie et de la mitophagie sur des cellules musculaires (myoblastes C2C12) et intestinales (cellules Mode-K) lors d'un traitement avec l'urolithine A (50  $\mu$ M). Ces effets sur *C. elegans* sont à relier à ceux observés *in vivo*. L'administration d'urolithine A (50 mg/kg/jour pendant 34 semaines) prévient la dysfonction musculaire associée au vieillissement chez le modèle de souris C57BL/6J nourries avec un régime riche en graisses. L'administration d'urolithine A (50 mg/kg/jour pendant 6 semaines) améliore cette dysfonction musculaire liée au vieillissement chez le modèle de souris C57BL/6J âgées de 22 mois.

#### **3.4.4. Liens entre l'état de santé des individus et la capacité de production des urolithines par le microbiote intestinal**

Le ratio phénotype A / phénotype B pourrait être modifié en faveur du phénotype B en cas de maladies chroniques associées à une dysbiose telles que le syndrome métabolique, le surpoids, l'obésité ou le cancer colorectal (Selma et al., 2016; Tomás-Barberán et al., 2014). En effet, il a été observé que le pourcentage de phénotype B était plus élevé chez les individus en surpoids ou obèses. Ce pourcentage était encore plus élevé en cas de syndrome métabolique. Au vue de ces données, la corrélation entre un phénotype et la présence de biomarqueurs de risque cardiométabolique (profil lipidique, glycémie) a récemment été explorée (Selma et al., 2017). Cette étude suggère que le phénotype B chez des individus en surpoids ou obèse pourrait être relié à un risque cardiométabolique augmenté. De façon inverse, le phénotype A protégerait de ces facteurs de risque. De plus, il a récemment été démontré que des patients de phénotype A atteints de syndrome métabolique et traités par des statines présenteraient un profil lipidique comparable à des sujets normaux, alors que les patients de phénotype B atteints de syndrome métabolique et traités pour leur dyslipidémie seraient moins sensibles au traitement (Selma et al., 2017).

L'existence des différents phénotypes chez l'Homme pourrait expliquer la variabilité de réponse dans l'amélioration des marqueurs du risque métabolique chez des personnes en surpoids ou obèses consommant des ellagitannins (González-Sarrías et al., 2016b).

En résumé, bien que différentes activités ont été décrites *in vitro* sur des modèles cellulaires, peu ont été confortées *in vivo* chez l'animal. A ce jour, aucune donnée ne décrit les potentialités antidiabétiques des urolithines B, C et D. En 2012, un brevet évoquait le potentiel anti-diabétique de l'urolithine A sur la base d'une modification d'une hyperglycémie provoquée chez la souris obèse « high fat » (Andreux et al., 2012).

Certaines activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoire et anti-oxydante des urolithines citées précédemment pourraient également présenter un intérêt potentiel dans une application antidiabétique puisque que la physiopathologie du diabète de type 2 est caractérisée entre autre par la présence d'une inflammation de bas grade et d'un stress oxydant accru.

De plus, l'urolithine A allongerait la durée de vie de *C. elegans* en partie via une activation de l'AMPK (Ryu et al., 2016). L'activation de l'AMPK étant le mécanisme d'action principal d'un médicament antidiabétique de référence : la metformine, ceci suggère un intérêt antidiabétique potentiel supplémentaire des urolithines.

## **Chapitre 4 : Revue “Protection of pancreatic $\beta$ -cell function by dietary polyphenols”**

---

Dall’Asta, M., Bayle, M., Neasta, J., Scazzina, F., Bruni, R., Cros, G., Del Rio, D., and Oiry, C. (2015).  
Phytochem. Rev. 14, 933–959.

L’article qui suit correspond à une revue bibliographique examinant les études qui suggèrent l’effet potentiel des polyphénols à moduler l’activité de différentes cibles moléculaires connues pour contrôler la fonction cellulaire  $\beta$  et impliquées dans le développement et la progression du diabète de type 2. Les études *in vitro* et *in vivo* sélectionnées dans cette revue reportent l’activité de composés flavonoïdes et non-flavonoïdes.



## Protection of pancreatic $\beta$ -cell function by dietary polyphenols

Margherita Dall'Asta · Morgane Bayle · Jérémie Neasta ·  
Francesca Scazzina · Renato Bruni · Gérard Cros ·  
Daniele Del Rio  · Catherine Oiry



Received: 25 June 2015 / Accepted: 21 July 2015  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

**Abstract** Diabetes mellitus is a complex metabolic disorder and is considered a fast-growing global health problem. Type 2 diabetes (T2D) represents the majority of total diabetes prevalence and  $\beta$ -cell dysfunction has been described as a crucial point for this disease development and progression. To date, all of the common anti-hyperglycaemic drugs used for diabetes management cause undesirable side effects or problems with long-term efficacy or safety and the development of alternative approaches for the prevention as well as for the treatment of T2D might be a valuable solution to meet this rising demand. In this

regards, numerous epidemiological studies indicate that exposure to certain polyphenol compounds is associated with the prevention of chronic diseases, including diabetes. Here, we review growing evidence suggesting that polyphenols can modulate the activity of various molecular targets, which are known to control  $\beta$ -cell function, involved in the development and the progression of this diabetes. The protective effects of polyphenols on  $\beta$ -cell function is reported with a particular focus on the mechanism of action behind polyphenol putative bioactivity. *Animal* and *in vitro* studies selected in this review, reporting about both flavonoid and non-flavonoid compounds, highlight the direct action of polyphenols on pancreatic  $\beta$ -cells, stimulating insulin secretion through the activation of specific cellular targets and protecting these cells from damages mediated by oxidative stress and inflammation, both typically elevated in diabetes. Some of the reviewed studies describe polyphenol effects comparable to those exerted by many drugs commonly used in diabetes treatment, and, in some occasions, synergistic polyphenol-drug interactions. Finally, future studies need to be addressed to the effects of specific polyphenol human and microbial metabolites, which are still poorly studied, in order to better define the preventive and therapeutic approach to contrast  $\beta$ -cell failure and diabetes progression.

M. Dall'Asta · R. Bruni · D. Del Rio (✉)  
LS9 Interlab Group, The Laboratory of Phytochemicals in Physiology, Human Nutrition Unit, Department of Food Science, University of Parma, Medical School, Building C, Via Volturno 39, 43125 Parma, Italy  
e-mail: daniele.delrio@unipr.it

M. Bayle · J. Neasta · G. Cros · C. Oiry  
Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247 CNRS-Université de Montpellier-ENSCM, Bâtiment D, Faculté de Pharmacie 15, Avenue Charles Flahault, BP14491, 34093 Montpellier Cedex 5, France

F. Scazzina  
Department of Food Science, University of Parma, Medical School, Building C, Via Volturno 39, 43125 Parma, Italy

D. Del Rio  
The Need for Nutrition Education/Innovation Programme (NNEdPro), University of Cambridge, Cambridge, UK

**Keywords**  $\beta$ -cell protection · Diabetes · Flavonoids · Insulin secretion

## Introduction

### Central role of pancreatic $\beta$ -cells on type 2 diabetes pathophysiology

Diabetes mellitus is a complex metabolic disorder characterised by a high level of blood glucose. This disease is considered a major health problem owing to its high frequency and its associated complications leading to blindness, kidney failure, heart disease, stroke and amputations (Chaturvedi 2007). There are currently 366 million people worldwide with diabetes and the incidence of the disease is projected to more than double by 2030 (Whiting et al. 2011). Type 1 diabetes (also known as insulin-dependent) is due to the complete or near-total insulin deficiency resulting from autoimmune-mediated destruction of pancreatic  $\beta$ -cells. Type 2 diabetes (T2D) (also known as non-insulin-dependent) represents the majority (>85 %) of total diabetes prevalence (Forouhi and Wareham 2010), and has been estimated to be one of the most common chronic diseases in Western societies (Shaw et al. 2010). This pandemic nature of T2D is a fast-growing global problem, not only from a clinical and health perspective, but also from social and economic points of view (Scully 2012). T2D results from a combination of genetic (e.g., monogenic and polygenic mutations) and environmental factors (e.g., overweight, obesity, and inactivity) that impair  $\beta$ -cell functionality and tissue insulin sensitivity, associated with sub-clinical inflammation and increased oxidative stress. There is growing evidence that  $\beta$ -cell dysfunction is crucial for the development and progression of the disease (Marchetti et al. 2008; Dalle et al. 2013). Indeed, failure of  $\beta$ -cell sensitivity to glucose, loss of the first-phase and decrease of the second-phase of insulin secretion are early defects observed in T2D and even before the diagnosis of the disease (Brunzell et al. 1976; Del Prato and Tiengo 2001; Ashcroft and Rorsman 2004). The loss of first-phase insulin secretion is crucial since it is thought to have major impacts on post-prandial glucose excursions and on insulin action on the target tissues (Brunzell et al. 1976; Del Prato and Tiengo 2001). Moreover, a progressive decrease in  $\beta$ -cell mass has been observed in T2D patients (Rahier et al. 2008). The inability of  $\beta$ -cells to secrete adequate amounts of insulin results in chronic hyperglycaemia and excessive oxidative stress which has been largely implicated

in the pathogenesis of pancreatic  $\beta$ -cell failure (Bensellam et al. 2012). This scenario leads to a vicious circle that contributes to the decline of the functional  $\beta$ -cell mass and the consequent progression of T2D (Poitout and Robertson 2008).

First-line therapy for the management of T2D generally involves lifestyle modifications, including diet and exercise, along with metformin (a biguanide). In various countries, other oral medications for the treatment of T2D traditionally include sulfonylureas, meglitinides, thiazolidinediones (TZDs), dipeptidyl-peptidase-4 inhibitors,  $\alpha$ -glucosidase inhibitors (acarbose), bromocriptine, and colesevelam. Injectable agents such as various forms of insulin, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists, and amylin analogues are also used for the treatment of T2D. Despite the availability of a wide variety of medications, almost half of patients with diabetes fail to achieve acceptable glycaemic control. In addition, these medications provide symptomatic rather than curative therapies and usually require medical attention as they can cause unwanted side effects. Thus, the search for more effective and safer medications to treat diabetes needs to continue (Whalen et al. 2015). Therefore, persistent efforts have been made to identify potential compounds targeting the aetiology of diabetes, for example by stimulating  $\beta$ -cell regeneration and preventing apoptosis, in order to rescue the endogenous control of glucose homeostasis. Naturally occurring plant compounds are attractive candidates because they are abundant in nature, inexpensive to produce and may have fewer side effects than currently used pharmaceutical compounds (Hanhineva et al. 2010). Consequently, the search for novel and curative natural agents that can enhance and/or preserve islet  $\beta$ -cell mass and function, in order to prevent and/or treat diabetes, is extremely important to decrease the burden of morbidity from diabetes and the related complications.

### Mechanism underlying glucose-mediated insulin secretion

Insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells is primarily induced in response to elevated circulating concentrations of glucose. Specifically, glucose enters  $\beta$ -cells through glucose transporter 2 (GLUT2) transporters and is rapidly phosphorylated to glucose-6 phosphate by glucokinase and then oxidised into mitochondria.

This process leads to an increase in the cellular ATP/ADP ratio and closure of the ATP-dependent potassium channel ( $K_{ATP}$  channel) which in turn promotes  $\beta$ -cell membrane depolarisation and a subsequent calcium ( $Ca^{2+}$ ) entry through activation of the L-type voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels (L-type VDCC,  $Ca_v1.x$ ) (Wollheim and Sharp 1981), triggering the exocytosis of insulin-containing granules (Mears 2004). Glucose-induced calcium entry into  $\beta$ -cells activates various signalling pathways and kinases, including protein kinase A (PKA) via calcium-dependent cAMP (cyclic adenosine monophosphate) production (Briaud et al. 2003),  $Ca^{2+}$  and calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) (Wenham et al. 1994), protein kinase C (PKC) (Knutson and Hoenig 1994) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 (Frodin et al. 1995; Briaud et al. 2003). In addition, these kinases have been also shown to participate in glucose-mediated PKA phosphorylation and thus activation of the cAMP-responsive element-binding protein (CREB), which is required for  $\beta$ -cell survival (Costes et al. 2006). Importantly, ERK1/2 kinase also regulates many  $\beta$ -cell processes including proliferation, differentiation, and survival, together with glucose-induced insulin secretion (Longuet et al. 2005; Youl et al. 2010; Bardy et al. 2013). Besides, glucose-mediated insulin secretion is also modulated by non-nutrient secretagogues such as growth factors, hormones and neurotransmitters, the majority of which act by activating or inhibiting intracellular protein kinases.

#### Polyphenols: an overview

In the last two decades, the positive effects on health attributed to polyphenolic compounds have been increasing, and have been strongly supported by a large number of *in vivo* and *in vitro* studies resulting from the exposure of humans and cells to this large family of phytochemicals (Del Rio et al. 2013; Rodriguez-Mateos et al. 2014; Zanotti et al. 2015). To date, several epidemiological studies have linked polyphenolic exposure to the prevention of several NCDs (non-communicable diseases) such as cardiovascular disease (CVD), cancer, neurodegenerative diseases, and diabetes, even though the evidence has not always been consistent (Scalbert et al. 2005; Crozier et al. 2009; Del Rio et al. 2013). Undoubtedly, the consumption of plant foods has been associated

with a lower risk of developing major chronic diseases (Hartley et al. 2013; Wang et al. 2014) and polyphenols seem to play a key role in this. In fact, a large range of *in vitro* and *in vivo* studies have shown that polyphenols possess several biological activities (Del Rio et al. 2013; Rodriguez-Mateos et al. 2014) which probably underlie the health-protective properties of plant foods. However, many studies raised concerns as they used questionable approaches to address the health significance of polyphenols. In particular, the biological activities of polyphenol-rich food or food extracts are mainly investigated on *in vitro* cell-based models and therefore do not take into account that these compounds are first digested and then metabolised before reaching the circulatory system (Del Rio et al. 2010). Moreover, the range of concentrations applied in the different *in vitro* studies largely vary and, in most cases, exceed the physiological conditions (Del Rio et al. 2010). Therefore, the large variety of results described, which are in some case not homogeneous, should be critically review and contextualised depending on the model and conditions applied.

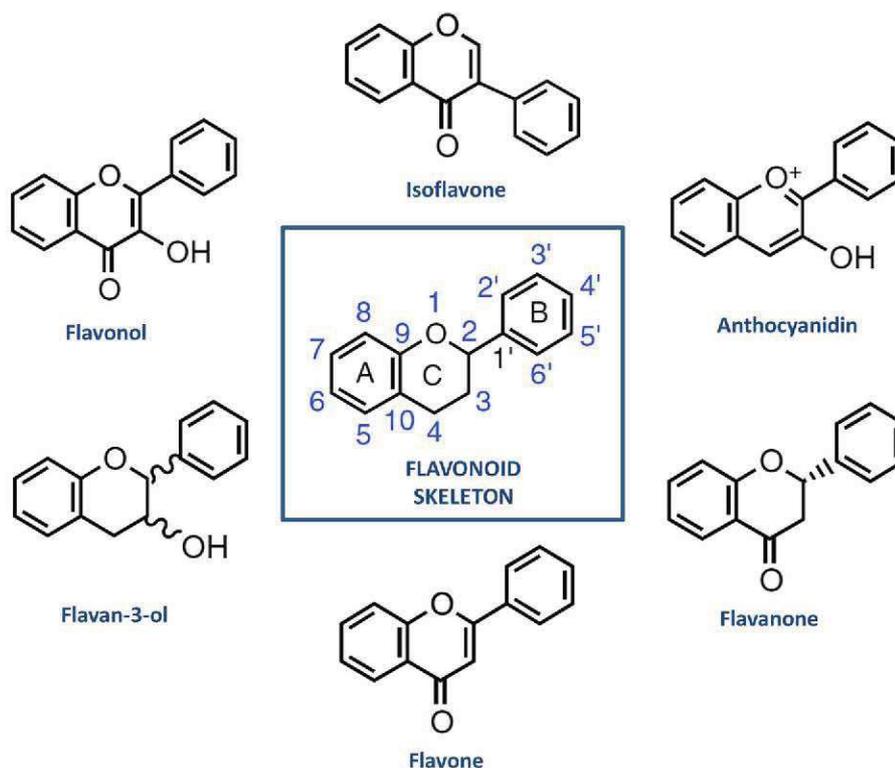
Nowadays, several thousands of chemical structures have been identified, even though many of them have only been found to date in a limited number of species. As they occur widely and abundantly in plant-derived foods and beverages, polyphenolic compounds are largely consumed on a daily basis; thus, it has been estimated that the average intake is approximately 1 g/day (Oeck et al. 2007). Despite their numerous and heterogeneous structures, polyphenols are chemically grouped into a single family of molecules due to their common phenolic ring structure. Structurally, they range from simple one-phenol hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids to large polymeric macromolecules such as proanthocyanidins and ellagitannins (Crozier et al. 2009; Del Rio et al. 2013). In plants, polyphenols mainly occur as oligomers and polymers or can be esterified to other chemical compounds such as sugar moieties or organic acids, but they are rarely found in the aglycone free form (Crozier et al. 2009). Polyphenolic compounds can be classified into flavonoid and non-flavonoid according to their carbon skeleton structure. Flavonoids ( $C_6-C_3-C_6$ ) are the largest and most relevant class of phenolic compounds, including several sub-classes, 6 of which can be highlighted according to their nutritional relevance: flavonols,

isoflavones, anthocyanidins, flavan-3-ols, flavones, and flavanones (Fig. 1).

Flavonols are the most widespread flavonoid class in the plant kingdom and in food items, with the exception of algae and fungi. Among fruits and vegetables, they are particularly abundant in curly kale, onion, broccoli, tomato, and berries. Quercetin is certainly the main representative dietary flavonol, and is found in onions, apples, tea, broccoli, and red wine, together with kaempferol, isorhamnetin, and myricetin. In *planta*, quercetin commonly occurs conjugated with a sugar moiety at the 5, 7, 3', 4', or 5' positions which is frequently a rutinoside conjugate (rutin) (Manach et al. 2005). Isoflavones are the characteristic polyphenolic class of the leguminous plants, with significant amounts of daidzein and genistein occurring in soybean, principally as 7-*O*-(6''-*O*-malonyl) glucosides, with lower amounts of the corresponding 7-*O*-(6''-*O*-acetyl) glucosides, 7-*O*-glucosides, and aglycones (Del Rio et al. 2013). Fermented soy products, which are important dietary sources of isoflavones, mainly contain aglycones as a result of hydrolysis of the polyphenolic glycosides. In contrast, other heated and treated soy-derived products, such as

soy milk and tofu, contain reduced quantities of isoflavones, mainly in the form of the daidzein and genistein glucosides (Coward et al. 1998). Over the years, isoflavones have been classified as phytoestrogens, due to their capacity to interact and modulate oestrogen receptor activity (Del Rio et al. 2013). Anthocyanidins are typically responsible for the wide range of red-blue pigments observed in coloured fruits and flowers. Cyanidin, pelargonidin, peonidin, delphinidin, petunidin, and malvidin are the major anthocyanidins found in nature (Clifford 2000). The main dietary sources of anthocyanidins are berries, red grapes and red wine, whilst pomegranates, red cabbages, purple carrots, purple potatoes, and purple corn, although rich sources of phenolic compounds, contribute lower amounts to the anthocyanidins dietary intake (Wu et al. 2006; Mena et al. 2011). In *planta*, anthocyanidins are commonly found bound to sugars such as glucose, galactose, rhamnose, and arabinose, although some aliphatic or aromatic acids can also bind to the sugar residues. In contrast with other flavonoids, flavan-3-ols are not present in *planta* as glycosides. They form a large and complex subgroup ranging from simple monomers to oligomeric

**Fig. 1** Generic molecular structure of the flavonoid skeleton and of main flavonoid classes



and polymeric proanthocyanidins. Monomers include (+)-catechin (C), (–)-epicatechin (EC), gallic catechin (GC), epigallocatechin (EGC), their galloyl-substituted derivatives [epicatechin-gallate (EG) and epigallocatechin-gallate (EGCG)], as well as (+)-afzelechin and (–)-epiafzelechin (Aron and Kennedy 2008; Crozier et al. 2009). Proanthocyanidins, also known as condensed tannins, are the polymerised form of flavan-3-ols. Flavan-3-ols are of high dietary relevance as they are largely present in fruits and vegetables that are commonly consumed in Western diets (mainly tea, cocoa and dark chocolate, apples, pears, grapes, berries, plums, nuts, and red wine) (Gu et al. 2004). In contrast, flavones have not been reported to be largely distributed in foods, but were rather specifically identified in significant levels in parsley and celery, as well as some herbs. Apigenin and luteolin are the main flavones occurring *in planta* predominantly as glucosides (Crozier et al. 2009). Naringenin and hesperidin are the characteristic compounds of the flavanone sub-group. They typify the citrus fruits and especially occur in the albedo. The most common flavanone is hesperetin-7-*O*-rutinoside (hesperidin). Hesperetin and its derivatives are found in sweet orange, tangelo, lemon and lime, while naringenin and its derivatives are present in grapefruit and sour orange (Crozier et al. 2009).

In contrast to flavonoids, non-flavonoids are less significant from a nutritional point of view because they are found in few plant species. Among them, phenolic acids ( $C_6-C_1$ ) are compounds with higher dietary significance and can be divided into two groups: hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids. Gallic acid is the most representative hydroxybenzoic acid, and is mainly found as sugar esters in gallotannins, such as 2-*O*-digalloyl-tetra-*O*-galloyl-glucose, which is a minor dietary component. Ellagic acid is the component of the derived ellagitannins such as sanguin H-6 and punicalagin, whilst the distribution in nature is rather limited and restricted to raspberries, strawberries, blackberries, blueberries, nuts and pomegranate (Landete 2011). Among the hydroxycinnamic acid sub-group, the most representative compounds are caffeic, ferulic and *p*-coumaric acids, which occur in foods and beverages mainly as chlorogenic acids. While coffee is the main dietary source of chlorogenic acids, they also occur in apples, tea, berries, plums, grapes, wine and many green vegetables (Crozier et al. 2009). Dietary intake of ferulic acid is guaranteed by

whole cereal grain consumption. Stilbenes ( $C_6-C_2-C_6$  structure) are phytoalexins, mainly represented by resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene). Although a large number of studies have uncovered many bioactivities for resveratrol, this polyphenol is a minor dietary compound, and as such occurs in low quantities, mainly as a trans-isomer in red wine, grapes, peanuts, pistachios, and berries (Zamora-Ros et al. 2008).

The complete update of polyphenol structures, dietary occurrence, and bioavailability has recently been reviewed (Neveu et al. 2010; Del Rio et al. 2013; Rodriguez-Mateos et al. 2014).

#### Polyphenol metabolism in humans

Today, it is well known that polyphenols are digested in humans through the same metabolic pathways as drugs and xenobiotics. Over the years, several studies have focused on the bioavailability and bioaccumulation of polyphenols in tissues and organs in order to draw a clear picture of the fate of polyphenolic molecules after human consumption. However, information regarding the tissue and cellular targets of polyphenols as well as the metabolic modifications occurring on polyphenolic structures is still lacking. Understanding and identifying the whole set of metabolites present in systemic circulation after polyphenol ingestion and how they are able to interfere and act at the cellular level is a current and imperative need, which will help to precisely outline the real role of polyphenolics in the preventive or therapeutic treatment of NCDs. After ingestion, polyphenols can be partially and barely modified by the oral tract and the stomach (Hirota et al. 2001; Lee et al. 2004; Walle et al. 2005). Actually, the small intestine is the first organ of the digestive tract in which polyphenols are substantially modified and absorbed. At this level, conjugated polyphenols can be hydrolysed by two different routes through the action of endogenous  $\beta$ -glucosidases, allowing the generation of more lipophilic and thus more absorbable aglycones. Specifically, the lactase phloridzin hydrolase (LPH) and the cytosolic  $\beta$ -glucosidase (CBG) are the two main intestinal  $\beta$ -glucosidases catalysing the deglycosylation of polyphenols. LPH is expressed in the brush-border of the small intestine epithelial cells and exhibits a broad selectivity towards glucoside flavonoids (Day et al. 2000). Besides, CBG is a

cytosolic  $\beta$ -glucosidase and thus operates on conjugated polyphenols that have been previously transported within enterocytes, possibly through the active sodium-dependent glucose transporter, SGLT-1 (Gee et al. 2000).

It is noteworthy that before reaching the portal bloodstream, polyphenols can undergo phase II metabolism consisting of the addition of glucuronic acid, sulphate and methyl groups, by the action of UDP-glucuronosyltransferases, sulphotransferases, and catechol-*O*-methyltransferase, respectively (Del Rio et al. 2013). These detoxification steps also substantially occur in the liver, where the metabolites are further modified by phase II metabolism enzymes before being subjected to enterohepatic recirculation, reaching organs and tissues through the systemic circulation, and being excreted (Donovan et al. 2006).

The majority of polyphenolic compounds overstep the small intestine to accumulate in the colon. Bioavailability studies on polyphenols determined the central role of this complex system of symbiotic microorganisms in the modification of ingested polyphenols and the production of new forms of compounds (metabolites) which are ideally the major compounds reaching the tissues and organs. The gut microbiota mediate the enzymatic breakdown of high molecular weight (MW) structures to low MW compounds via the esterase, glucosidase, demethylation, dehydroxylation and decarboxylation activities of bacteria (Selma et al. 2009), leading to the absorption and subsequent phase II enzymes modifications before entering the systemic circulation (Crozier et al. 2010). Nowadays, there is still insufficient information on the possible polyphenol-tissue-cells interactions and, in particular, the molecular mechanism behind the bioactivity induced by phenolic compounds. Moreover, it is still not well established how the different type of cells are able to interact with microbial and phase II metabolites as well as which chemical modifications induced by receptor or enzymes could contribute to enhance or inhibit the bioactivity of polyphenol metabolites. Some authors have suggested that conjugated metabolites formed in human organism after digestion are susceptible to deconjugation and modification at the tissue and cellular levels, leading either to the production of the active aglycone (Kawai et al. 2008; Ishisaka et al. 2013) or other modified molecules (Sala et al. 2015), although further studies are needed in order to

completely understand the polyphenol-enzyme interactions in different in vitro and in vivo models.

#### Potential use of polyphenols for the prevention and the treatment of diabetes

T2D is a chronic disease that requires continuing medical support together with active and continuing patient self-management education for the prevention of acute and long-term complications. To date, there is no drug to cure diabetes, and all of the current anti-hyperglycaemic drugs used for diabetes management, which act through different mechanisms, cause undesirable side effects or problems with long-term efficacy. Therefore, the development of alternative approaches for the treatment as well as prevention of T2D is the best way to meet this rising demand. Diabetes medication is associated with lifestyle modifications such as increased physical activities and weight control by reduced caloric intake and dietary recommendations, including the consumption of plant food products, such as whole grains, berries, fruits and vegetables, all of which are known to be excellent sources of dietary fibre, but also good sources of various polyphenolic compounds (Tuomilehto et al. 2001; Lindstrom et al. 2006). These lifestyle changes are even beneficial in the treatment of metabolic syndrome, which is often considered a pre-diabetic state. To date, accumulating evidence suggests that polyphenols can trigger various pharmacological targets that are able to modulate circulating glucose concentration; for example, modulation of glucose metabolism by various mechanisms, modulation of glucose release from the liver, activation of insulin receptors and glucose uptake in insulin-sensitive tissues, and modulation of hepatic glucose output (Hanhineva et al. 2010; Williamson 2013). Moreover, recent studies have explored the insulinotropic effects of natural compounds contained in foods such as polyphenols (Pinent et al. 2008; Babu et al. 2013; Bahadoran et al. 2013), suggesting their potential use for the preventive and curative treatment of diabetes mellitus through enhanced insulin release from pancreatic  $\beta$ -cells.

Oxidative stress, caused by an increase in intracellular reactive oxygen species (ROS), plays a central role in insulin resistance and in pancreatic  $\beta$ -cell death during the progressive deterioration of glucose tolerance and the development of type 2 diabetes (Poitout

and Robertson 2008; Drews et al. 2010). Because of their low antioxidant capacity,  $\beta$ -cells are extremely sensitive towards oxidative stress (Poitout and Robertson 2008; Drews et al. 2010). Thus, the protection of pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative stress is essential in order to change the natural history of diabetes after the onset of disease, but may also be crucial in preventing or delaying the onset of disease in at-risk subjects. Several trials showed that various drugs such as sulphonylureas, acarbose, metformin and TZDs are able to reduce the incidence of type 2 diabetes (Sartor et al. 1980; Chiasson et al. 2002; Knowler et al. 2002, 2005). One of the mechanisms that is potentially involved in the prevention of diabetes in these trials could be the protection of  $\beta$ -cells functionality from injuries induced by inflammation and oxidative stress (Bonora 2008). In this scenario, polyphenols could represent novel natural compounds for  $\beta$ -cell protection against oxidative stress damage.

In this review, the antidiabetic potential of natural polyphenols is discussed with particular insight into the potential mechanisms underlying their direct effects on the central key regulators of insulin secretion and glucose homeostasis:  $\beta$ -cells.

### **Effect of polyphenols on insulin secretion and $\beta$ -cell functionality: animal and in vitro studies**

#### Flavonoids

##### *Flavonols*

*Animal studies* Several studies have addressed the potential antidiabetic action of quercetin using various animal models of diabetes. Vessal et al. (2003) analysed the effects of quercetin (10 or 15 mg/kg, intraperitoneal administration (i.p.), once daily for 10 days) in control and streptozotocin-induced (STZ) diabetic rats (40 mg/kg, single dose, i.p.). Although quercetin failed to modulate the plasma glucose level of control animals, it significantly and dose-dependently decreased the plasma glucose level of STZ-induced diabetic rats. Quercetin had no effect on the glucose tolerance curve of the normoglycaemic animals but normalised the glucose tolerance curves of the STZ diabetic rats at both of the quercetin doses tested. Moreover, the number of pancreatic islets significantly increased in both treated control and diabetic groups (Vessal et al. 2003). Coskun

et al. (2005) evaluated the possible protective effects of quercetin against  $\beta$ -cell damage in STZ-induced diabetes in rats (50 mg/kg, single dose, i.p.). Animals were administered with quercetin (15 mg/kg per day, i.p.) for 3 days prior to STZ injection; then, quercetin administrations were continued until the end of the study (4 weeks). Pancreatic tissue malondialdehyde (MDA) level and serum nitric oxide (NO) concentration were significantly increased in diabetic animals and a reduction in the antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx) and catalase (CAT) was observed in pancreatic homogenates. Islet cell degeneration and weak insulin immunohistochemical staining were also observed in diabetic rats. Interestingly, quercetin treatment decreased the elevated MDA and NO levels and also increased the activities of antioxidant enzymes. Quercetin treatment also increased staining of insulin and the preservation of islet cells (Coskun et al. 2005). Similar results describing the protective effects induced by quercetin on the morphology of pancreatic  $\beta$ -cells against diabetes mellitus and oxidative stress were reported by Adewole et al. (2006) (Adewole et al. 2006). Kobori et al. (2009) stated that feeding STZ-induced diabetic mice (185 mg/kg, single dose, i.p.) for 2 weeks with diets containing 0.1 or 0.5 % of quercetin improved blood glucose and insulin levels and reduced the generation of the oxidative stress marker TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) within the pancreas. Quercetin also suppressed STZ-induced expression of pancreatic Cdkn1a, a cyclin-dependent kinase inhibitor p21, which regulates cell division by arresting the cell cycle at the G1 and S phases. This suppression of Cdkn1a induced by quercetin should mediate elevation of the plasma insulin level through an increased pancreatic cell proliferation (Kobori et al. 2009). Kim et al. (2011) investigated the hypoglycaemic effects of quercetin in two animal models of diabetes. Firstly, they found that a starch solution (1 g/kg) containing 100 mg/kg quercetin orally administered to STZ-induced diabetic rats (65 mg/kg, single dose, i.p.) after an overnight fast significantly reduced the AUC of the glucose response curve compare to the control group. Secondly, quercetin (0.08 % of diet) chronically administered to db/db mice for 7 weeks significantly reduced both plasma glucose and blood glycated haemoglobin (HbA1c) compared to controls, without any significant effect on plasma insulin. Thus, quercetin

could be effective in controlling postprandial and fasting blood glucose levels in two animal models of diabetes (Kim et al. 2011). Jeong et al. (2012) described similar results on blood glucose control after 6 weeks of db/db mice feeding with 0.04 % or 0.08 % quercetin (Jeong et al. 2012). More recently, Li et al. (2013) used a fructose-fed rat model (10 % fructose in water during 4 weeks) in which fructose-induced hyperinsulinaemia is associated with insulin compensative secretion and predicts the onset of type 2 diabetes. They demonstrated that quercetin (100 mg/kg, oral administration, once daily for additional 4 weeks) reduced serum insulin and leptin, prevented compensatory  $\beta$ -cell hyperplasia and preserved  $\beta$ -cell mass and function by decreasing pancreatic Protein kinase B (AKT)/forkhead box protein O1 (FOXO1) activation in fructose-treated rats (Li et al. 2013).

A recent study showed the protective effect of kaempferol (100 mg/kg, oral administration, once daily for 45 days) against oxidative stress in plasma and various tissues in STZ-induced diabetic rats (40 mg/kg, single dose, i.p.) (Al-Numair et al. 2014). The administration of kaempferol to diabetic rats normalised plasma glucose (increased in diabetic rats) and insulin (decreased in diabetic rats).

It has also been reported that fisetin (10 mg/kg, oral administration, once daily for 30 days) in STZ-induced diabetic rats (50 mg/kg, single dose, i.p.) induced a significant decrease in the levels of blood glucose and HbA1c, pancreas nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 subunit expression, plasma interleukin 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), serum NO and an increase in plasma insulin (Prasath et al. 2013). Fisetin also improved the antioxidant status in the pancreas as well as in the plasma of diabetic rats. Moreover, histological studies of the pancreas evidenced the tissue protective nature of fisetin (Prasath et al. 2013).

*In vitro studies on insulin secreting and pancreatic  $\beta$ -cells* The consequences of quercetin exposure on  $\beta$ -cell function and its mechanism of action has been actively investigated. Treatment of the INS-1  $\beta$ -cell line with 20  $\mu$ M of quercetin, but not with two other antioxidants resveratrol (20  $\mu$ M) or N-acetyl cysteine (NAC) (200  $\mu$ M), potentiated 8.3 mM glucose- or 0.01  $\mu$ M glibenclamide-induced insulin secretion. The potentiating effect of quercetin on glucose-induced insulin secretion was further confirmed in rat isolated islets of Langerhans (Youl et al. 2010). The

improvement of insulin release induced by quercetin after glucose exposure was recently confirmed by Bhattacharya et al. (2014). Moreover, quercetin was able to protect  $\beta$ -cell function and viability against oxidative damage induced by 50  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Interestingly, the potentiating and protecting effects of quercetin were correlated with a major increase in ERK1/2 phosphorylation, suggesting that ERK1/2 activation was involved in the actions of this polyphenol (Youl et al. 2010). In a subsequent study, the effects of quercetin on insulin secretion in relation to [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> modulation in pancreatic  $\beta$ -cells in the absence of any co-stimulating factor, and identification of its molecular targets were studied (Bardy et al. 2013). In the INS-1 cells, quercetin induced an increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and insulin secretion that were inhibited by nifedipine (an L-type Ca<sup>2+</sup> channel antagonist) but unchanged by thapsigargin (a SERCA inhibitor), suggesting that the L-type Ca<sub>v</sub> activation underlies quercetin action, at least in part. Quercetin was able to induce similar effects on rat pancreatic islets already at 2  $\mu$ M concentration. Patch-clamp experiments showed that quercetin directly activated high-voltage-activated (HVA) Ca<sup>2+</sup> channels in INS-1 cells by interacting with a binding site different from that of the Ca<sup>2+</sup> channel agonist Bay K 8644. More recently, as quercetin may interfere with other stress-activated protein kinases, such as c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 MAPK, we further explored MAPK cross-talk and their relationships with the mechanism of the protective effect of quercetin against oxidative stress (Youl et al. 2014). In INS-1 cells, using pharmacological inhibitors of MAPK pathways, we found that under oxidative stress (50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and glucose-stimulating insulin secretion conditions, the preservation of  $\beta$ -cell function against oxidative stress appears to be dependent on the balance between ERK1/2 and JNK activation. The protecting effect of quercetin on  $\beta$ -cell function is likely due to ERK1/2 hyperactivation (Youl et al. 2014). In addition to the previously described *in vivo* data, Li et al. (2013) showed that 10 or 20  $\mu$ M quercetin prevented 1 mM fructose-induced INS-1  $\beta$ -cell proliferation and insulin hypersecretion. Moreover, the various deleterious effects induced by fructose treatment of INS-1 cells (the increase in FOXO1 expression, AKT and FOXO1 phosphorylation, in pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX-1) and insulin gene expression and the decrease in janus kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3

(Jak2/Stat3)) were reversed by quercetin exposure at 10 and 20  $\mu\text{M}$ . The authors concluded that quercetin protected  $\beta$ -cell mass and function under high-fructose induction by improving leptin signalling and preserving pancreatic AKT/FOXO1 activation (Li et al. 2013). Because cytokines released by inflammatory cells surrounding pancreatic islets are implicated in the pathogenesis of diabetes, the role of quercetin in cytokine mix-induced  $\beta$ -cell injuries in RINm5F rat insulinoma cells has also been studied (tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (10 ng/ml) + interleukin 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (5 ng/ml) + interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (1,000 U/ml)) (Dai et al. 2013). Dai et al. showed that 20  $\mu\text{M}$  quercetin protected  $\beta$ -cell against cytokine-induced cell death, improved 16.7 mM glucose-induced insulin secretion and reduced NO accumulation. Moreover, quercetin reduced expression of the inducible nitric oxide synthases (iNOS) and inhibited ROS production, already at 5  $\mu\text{M}$ . Inhibition of the translocation of NF- $\kappa\text{B}$  and the suppression of cytochrome c release from mitochondria by 20  $\mu\text{M}$  quercetin were also described. It was concluded that quercetin prevented  $\beta$ -cell death by inhibiting the mitochondrial pathway and NF- $\kappa\text{B}$  signalling. Likewise, Cho et al. (2012) showed that 10  $\mu\text{M}$  quercetin significantly reduced IL-1 $\beta$ -induced nitrite production, iNOS mRNA and protein levels and inhibited IL-1 $\beta$ -induced I $\kappa\text{B}\alpha$  phosphorylation, NF- $\kappa\text{B}$  activation and iNOS promoter activity in RINm5F  $\beta$ -cells. Moreover, quercetin significantly restored the 100  $\mu\text{M}$  ATP-induced insulin secretion suppressed by IL-1 $\beta$  treatment. On the other hand, quercetin phase II metabolites (quercetin 3'-sulphate, quercetin 3-glucuronide and isorhamnetin 3-glucuronide) at 10  $\mu\text{M}$  failed to hamper IL-1 $\beta$ -induced injuries and insulin secretion (Cho et al. 2012), suggesting the inefficacy of the selected human metabolites in this model.

Besides quercetin, several works have highlighted the beneficial action of other flavonols on  $\beta$ -cell function. Lee et al. (2009a) found that kaempferol protects HIT-T15  $\beta$ -cells from oxidative damages induced by dRib (2-deoxy-D-ribose, a reducing sugar producing reactive oxygen species) by interfering with ROS metabolism. Specifically, kaempferol (10  $\mu\text{M}$ ) partially reversed 20 mM dRib-mediated decrease in HIT-T15 cell viability and suppressed 20 mM dRib-induced intracellular ROS, apoptosis, and lipid peroxidation (Lee et al. 2009a). In the same way,

kaempferol was shown to protect pancreatic  $\beta$ -cells from hyperglycaemia-induced apoptosis and dysfunction (Zhang and Liu 2011). Kaempferol treatment sustained viability, inhibited cellular apoptosis, and reduced caspase-3 activity in INS-1E  $\beta$ -cells and human islets exposed to chronic high glucose (20 mM, 4 days) in a dose-dependent manner, with 10  $\mu\text{M}$  kaempferol eliciting the maximum effect. Kaempferol treatment increased the expression of the anti-apoptotic proteins AKT and Bcl-2 (B cell lymphoma 2), which were significantly reduced in  $\beta$ -cells and human islets chronically following exposure to high levels of glucose. Furthermore, exposure of  $\beta$ -cells and human islets to kaempferol restored high glucose-induced intracellular decrease in cAMP and ATP production. The cytoprotective effects of kaempferol were associated with improved insulin secretory function and synthesis in  $\beta$ -cells and human islets. Inhibition of PKA or AKT ablated the anti-apoptotic effect of kaempferol, indicating that its action relies on these kinases. Similar cytoprotective effects of kaempferol were observed after long-term exposure of INS-1E cells and human islets to lipotoxicity (0.5 mM palmitate for 4 days) (Zhang et al. 2013). Moreover,  $\beta$ -cell treatment with kaempferol rescued chronic hyperlipidaemia-mediated decreases of PDX-1 protein expression, PKA activation and CREB transcriptional activity at 1 and 10  $\mu\text{M}$ , but not at the lower concentration of 0.1  $\mu\text{M}$ . Down-regulation of CREB suppressed kaempferol protection of  $\beta$ -cell from apoptosis and dysfunction caused by palmitate exposure. Incubation of INS-1E cells with kaempferol for 48 h induced cAMP production already at 1  $\mu\text{M}$  concentration; although it induced PDX-1 expression in INS-1E cells and human islets in the same conditions. PDX-1 gene knockdown reduced kaempferol-stimulated cAMP generation and CREB activation in INS-1E cells. The authors concluded that kaempferol is a novel survival factor for pancreatic  $\beta$ -cells via the up-regulation of the PDX-1/cAMP/PKA/CREB signalling cascade.

*Isoflavones* Soybean-rich food has attracted attention because of the tight correlation found between soybean consumption and the occurrence of metabolic disorders, particularly in Japanese people in which the plasma concentration of soy isoflavones can reach 2.4  $\mu\text{M}$ . It is noteworthy that the effects of soybean consumption on glucose metabolism have

been shown to be predominantly due to the high bioavailability of isoflavones (Behloul and Wu 2013). The antidiabetic effects of the most extensively studied soy-isoflavones, genistein and daidzein, are discussed below.

*Animal studies* Lee et al. reported a significant decrease in the levels of blood glucose and HbA1c and an increase in the plasma insulin level in STZ-induced diabetic rats (50 mg/kg, single dose, i.p.) that were fed with a genistein diet (600 mg/kg in diet for 3 weeks). These data indicated that supplementation with genistein may have a beneficial effect on hyperglycaemia (Lee 2006). In addition, genistein-rich diet decreased TBARS concentration to control levels in STZ-induced diabetic rats, revealing the antioxidant activity of genistein. Importantly, the potential antidiabetic effect of genistein was also highlighted in another animal model of diabetes obtained by administering rats with alloxan, which selectively promotes pancreatic  $\beta$ -cell destruction. Specifically, alloxan-induced diabetic rats (220 mg/kg, single dose, i.p.) were force-fed daily for 4 weeks with 3 different doses of genistein (8, 18 or 30 mg/kg). The higher dose of genistein (30 mg/kg per day), but not 8 mg/kg per day, significantly inhibited weight loss, hyperglycaemia, and islet cell loss in alloxan-induced diabetic rats, while increasing blood insulin levels and glucose tolerance. In a complementary study, to test whether genistein could prevent diabetes onset, mice were fed with a genistein-supplemented diet (250 mg/kg) for 2 weeks prior to the induction of diabetes (40 mg/kg STZ injection daily for 5 consecutive days, i.p.), after which mice were continually treated with the genistein diet until the end of the experiment (28 days) (Fu et al. 2010). Data showed that genistein significantly ameliorated STZ-induced hyperglycaemia in diabetic mice. Mice fed with genistein showed higher blood insulin levels and improved glucose tolerance, whereas insulin tolerance was not altered, suggesting that genistein has no effect on insulin sensitivity. The antidiabetic effect of genistein was not due to a modulation of plasma lipid profiles or to ROS scavenging, but was rather associated with an improvement in pancreatic  $\beta$ -cell proliferation, survival, and mass. In Elmarakby's work, mice were injected with STZ (45 mg/kg, daily for 5 days, i.p.) and thereafter administered with genistein (10 mg/kg, i.p. three times a week) for

10 weeks. Diabetic mice displayed a significant elevation in blood glucose level and a decrease in plasma insulin level, whereas treatment with genistein partially reduced blood glucose level but failed to restore plasma insulin level (Elmarakby et al. 2011). Beneficial effects of genistein and daidzein have been evaluated in non-obese diabetic (NOD) mice, an animal model of type 1 diabetes (Choi et al. 2008). Mice fed with a genistein- or daidzein-supplemented diet (200 mg/kg) for 9 weeks displayed a reduction in blood glucose levels, an increase in insulin/glucagon ratio and C-peptide level together with a preservation of insulin staining in pancreatic  $\beta$ -cells. Ae Park et al. (2006) reported that obese diabetic mice (db/db, a genetic model of T2D) fed with genistein or daidzein (200 mg/kg in diet for 6 weeks) displayed lower blood glucose, HbA1c and glucagon levels. Genistein and daidzein supplements increased the plasma insulin/glucagon ratio, while only genistein improved glucose tolerance (Ae Park et al. 2006). More recently, Fu et al. (2012) found that genistein was able to decrease hyperglycaemia in a mouse model of non-genetic type 2 diabetes. Indeed, mice fed with a high-fat diet (60 % of calories from lard) supplemented with 250 mg/kg genistein for 4 weeks prior to induction of diabetes (90 mg/kg STZ, single dose, i.p.) displayed, a week following STZ injection, a 30 % lower fasting blood glucose concentration with respect to high-fat diet-fed mice that had no access to genistein. Finally, STZ-treated mice who were fed a diet supplemented with genistein showed a two-fold increase in  $\beta$ -cell mass, suggesting that this polyphenol prevents STZ-induced  $\beta$ -cell destruction (Fu et al. 2012).

*In vitro studies on insulin secreting and pancreatic  $\beta$ -cells* Genistein exhibits a wide range of biological activities, including a weak oestrogenic effect by binding to oestrogen receptors and an inhibiting effect on protein tyrosine kinases (PTKs) (Liu et al. 2006). Various studies have reported that genistein stimulates insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cell lines and cultured islets, whereas other studies have revealed an inhibitory effect of this polyphenol on insulin secretion. These discrepancies could be due to variations in the experimental conditions and the cellular models that have been used (Liu et al. 2006). Nevertheless, most studies have indicated that genistein potentiates glucose-induced insulin secretion (GIIS), from concentrations as low as

0.01–100  $\mu\text{M}$  (Gilbert and Liu 2013). Regarding the mechanism of action, the potentiating effect of 100  $\mu\text{M}$  genistein on GIIIS in islets of Langerhans appears to rely on its capacity to inhibit PTK (Sorenson et al. 1994). However in a different study, exposure of INS-1 cells to 2.5  $\mu\text{M}$  genistein was shown to potentiate GIIIS independently of its activity towards oestrogen receptor and PTK (Liu et al. 2006). Instead, this insulinotropic effect of genistein was shown to primarily rely on an increase in intracellular cAMP and thus an activation of PKA suggesting that this isoflavone directly targets pancreatic  $\beta$ -cells (Liu et al. 2006). Daidzein (2.5  $\mu\text{M}$ ), an analogue of genistein that does not inhibit PTK, also significantly increased GIIIS and PKA activity, albeit not as potently as genistein (Liu et al. 2006). A few years later, Lee et al. (2009b) reported that genistein potentiated insulin secretion following the stimulation of INS-1 cells with various energy-generating nutrients such as leucine/glutamine (Leu/Gln). Fifty  $\mu\text{M}$  of genistein elicited a maximum potentiating effect on Leu/Gln-stimulated insulin secretion, but this concentration was not sufficient to inhibit PTK activity. Several lines of evidence have established that this potentiating effect was unlikely to have relied on genistein-mediated PKA activation. On the other hand, blocking the activity of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase II (CaMK II) with various inhibitors significantly diminished genistein-induced potentiation of insulin secretion. Accordingly, genistein was shown to increase  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  level as well as phosphorylation and thus activation of CaMK II. The authors concluded that the activation of CaMK II played a role in genistein-induced potentiation of Leu/Gln-stimulated insulin secretion (Lee et al. 2009b). Altogether, this series of works puts forward the possibility that genistein potentiates insulin secretion through distinct molecular mechanisms depending on the triggering stimulus.

Fu et al. (2010) investigated the effect of genistein on  $\beta$ -cell proliferation and cellular signalling related to this effect. They reported that treatment of INS-1 cells with as little as 0.1  $\mu\text{M}$  genistein is sufficient to enhance cell division and to increase cyclin D1 protein expression, a major cell cycle activator of  $\beta$ -cell proliferation, with maximal effects being observed at 5  $\mu\text{M}$ . The effect of genistein on  $\beta$ -cell proliferation was neither dependent on oestrogen receptors nor shared by 17  $\beta$ -oestradiol or a host of structurally

related flavonoid compounds. Pharmacological or molecular inhibition of PKA or ERK1/2 completely abolished genistein-stimulated  $\beta$ -cell proliferation, suggesting that genistein action relies on both kinases. Consistent with its effect on cell proliferation, genistein induced cAMP/PKA signalling and subsequent phosphorylation of ERK1/2 in both INS1 cells and human islets (Fu et al. 2010).

The protective effects of genistein on cytokine-induced pancreatic  $\beta$ -cell damage were evaluated by Kim et al. (2007b). Treatment of RINm5F (RIN) rat insulinoma  $\beta$ -cells with IL1- $\beta$  + IFN- $\gamma$  induced cell damage, which was correlated with NO production. Five  $\mu\text{M}$  of genistein promoted cell protection, with maximal effects observed at 20  $\mu\text{M}$ . Cytokine-mediated cytotoxicity and NO production was prevented by genistein, probably through the inhibition of NF- $\kappa\text{B}$  and thus a reduced expression level of the iNOS mRNA and protein. The cytoprotective effects of genistein are also mediated through the suppression of ERK-1/2 and Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways. The same protective effects were also observed in isolated rat islets, suggesting that genistein might be a valuable molecule with which to preserve functional  $\beta$ -cell mass (Kim et al. 2007b).

#### *Anthocyanidins*

*Animal studies* Although various studies have focused on the anti-diabetic actions of anthocyanidin glycosides (anthocyanins) or extracts (Babu et al. 2013), there are only few studies that have specifically addressed the effects of pure anthocyanidins. Roy et al. (2008) studied the actions of pelargonidin on hyperglycaemia and oxidative damage in STZ diabetic rats. Diabetes was induced by a single i.p injection of STZ (60 mg/kg). Two weeks after STZ injection, diabetic rats were treated with pelargonidin (3 mg/kg, i.p., single dose). Two weeks after this treatment, pelargonidin normalised elevated blood glucose levels and improved serum insulin levels in diabetic rats. Moreover, glucose tolerance test appeared to be normal. Decreased serum levels of SOD and catalase, as well as increased levels of malondialdehyde and fructosamine in diabetic rats were returned to their respective normal values 2 weeks after the administration of pelargonidin (Roy et al. 2008). Pelargonidin also counteracts

haemoglobin glycation, iron release from haem protein and iron-mediated oxidative damages. This study reported that a single low dose of pelargonidin completely reversed STZ-induced diabetes within two weeks and several beneficial effects of this polyphenol were observed up to 5 weeks. Gharib et al. (2013) studied the effects of delphinidin and cyanidin chlorides in the free and liposomal forms on STZ-induced diabetic mice (50 mg/kg, i.v., single dose). Three days after STZ injection, diabetic mice were treated intravenously with delphinidin or cyanidin (100 mg/kg/24 h) for 8 weeks. The data showed significantly lower levels of serum glycated albumin, HbA1c and glucose in mice receiving delphinidin or cyanidin (particularly in their liposomal forms) with respect to the diabetic control groups. The authors concluded that delphinidin and cyanidin may be useful to decrease diabetic complications considering the role of the glycation of proteins in diabetic complications (Gharib et al. 2013).

*In vitro studies on insulin secreting and pancreatic  $\beta$ -cells* Jayaprakasam et al. 2005 have determined the ability of 50  $\mu$ M of different anthocyanins and anthocyanidins (cyanidin, delphinidin, pelargonidin, malvidin, and petunidin) to modulate *in vitro* insulin secretion in the INS-1 832/13 pancreatic  $\beta$ -cell line which was exposed to 4 and 10 mM of glucose. While several anthocyanins were able to increase glucose-induced insulin secretion, anthocyanidins failed to significantly modulate this cell process (Jayaprakasam et al. 2005).

#### *Flavan-3-ols*

To date, numerous *in vivo* and *in vitro* studies have been carried out reporting the anti-diabetic effects of flavan-3-ols (Babu et al. 2013; Habtemariam and Varghese 2014). In particular, EGCG have mostly been investigated for its possible role in the modulation of  $\beta$ -cell function and protection.

*Animal studies* Song et al. (2003) have studied the preventive effect of EGCG on experimental autoimmune diabetes induced by a multiple low doses of streptozotocin (MLD-STZ), a treatment described to induce type I autoimmune diabetes. EGCG administration (dose of 100 mg/kg per day for 10 days) during the MLD-STZ-induced diabetes

reduced the increase in blood glucose levels. Moreover, *ex vivo* analysis of islets showed that EGCG down-regulates the MLD-STZ-induced expression of iNOS via the inhibition of NF- $\kappa$ B activation and ameliorated the decrease of islet mass (Song et al. 2003). EGCG was also described to delay the onset of T1D in non-obese diabetic (NOD) mice (Fu et al. 2011). Mice fed with EGCG (0.05 % in drinking-water) for 32 weeks presented significantly higher plasma insulin levels and survival rate, and lower HbA1c concentrations compared with the control animals. While EGCG did not modulate insulinitis, an increased level in circulating anti-inflammatory cytokine IL-10 was found in NOD mice (Fu et al. 2011). In a different study, Cao et al. (2014) described that EGCG prevents inflammation in the pancreas of rats on a high-fat diet (HFD). The results showed that EGCG significantly decreased fasting insulin levels as well as the homeostasis model assessment-insulin resistance index. Moreover, a pathologic analysis of pancreatic tissue revealed an increase in inflammatory TNF- $\alpha$  and infiltrating CD68 + macrophages in the islets of the HFD rats, but it was rarely observed in the HFD + EGCG rats. Overall, these data suggest that EGCG suppresses inflammation, partially reverses metabolic abnormalities, and ultimately increases insulin sensitivity in the pancreas of HFD rats (Cao et al. 2014). EGCG has also been described for negative effects on diabetes. Yun et al. (2006) studied the effects of EGCG on pancreatic  $\beta$ -cell damage in STZ-induced diabetic rats. To this aim, STZ-induced diabetic rats (60 mg/kg, single dose, i.p.) were treated with EGCG (5, 10, 50, or 100 mg/kg, i.p., once daily for 4 days, serial injections began 1 day before the streptozotocin injection). The dose of 5 mg/kg is equivalent to a dose of exposure leading to a nanomolar concentration in the plasma. The results showed a severe hyperglycaemia starting on the first day after STZ injection. Three days after STZ injection, the fed blood glucose levels were significantly higher in the groups treated with EGCG (5, 10 or 50 mg/kg) when compared to the diabetic control. An intraperitoneal glucose tolerance test (1.5 g/kg, i.p.) was performed on the 4th day after injection with STZ and 5th day after injection with EGCG. Compared to diabetic rats, even for the lower dose, EGCG-treated rats presented a higher level of blood glucose and a lower level of insulin. Moreover, EGCG exacerbated the loss of islet cell mass and insulin-immunoreactivity

in  $\beta$ -cells. The authors suggested that, even at nanomolar plasma concentrations, EGCG acts as a pro-oxidant rather than an antioxidant, at least in  $\beta$ -cells in vivo (Yun et al. 2006).

Recently, epicatechin (EC) was tested in NOD mice. Four week old mice were randomly divided into two groups and given either 0 % or 0.5 % EC in drinking water. At 32 weeks of age, 66.7 % of control mice had overt diabetes, whereas only 16.6 % of EC-treated mice became diabetic. EC mice had significantly higher plasma insulin levels and lower HbA1c concentrations compared to control mice. EC elevates circulating anti-inflammatory cytokine IL-10 levels, ameliorates pancreatic insulinitis, and improves pancreatic islet mass (Fu et al. 2013).

*In vitro studies on insulin secreting and pancreatic  $\beta$ -cells* EGCG has been described able to enhance insulin secretion in  $\beta$ -cell lines. After a 48 h maintained glucose (11 mM) pre-incubation of RIN-m5F rat insulinoma pancreatic  $\beta$  cells, the insulin secretion induced by 33 mM glucose was increased by EGCG (0.1 and 10  $\mu$ M) associated with an increase in intracellular ATP content (Cai and Lin 2009). Very recently, in order to evaluate the effects of green tea catechins on glucose-induced insulin secretion (GIIS), epigallocatechingallate (EGCG), gallicocatechingallate (GCG), epigallocatechin (EGC), epicatechingallate (ECG), gallicocatechin (GC), catechingallate (CG), epicatechin (EC), and catechin (CA) have been tested in the INS-1D  $\beta$ -cell line at concentrations of 10, 30, and 100  $\mu$ M. Results showed that (–)-GCG, (–)-EGC, (–)-GC, (–)-ECG and (–)-EGCG inhibit GIIS. In contrast, (–)-EC, (–)-CG or (–)-CA had no effect on GIIS. The inhibitory effects seemed to be mediated by inhibition of the voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -channel caused, at least in part, by membrane hyperpolarisation resulting from the activation of  $\text{K}^{+}$ - channels. The potency on the GIIS inhibition was described depending on the chemical structure, and the order of potency was EGCG > GCG > EGC > GC  $\approx$  ECG (Kaneko et al. 2015).

Cai and Lin (2009) investigated the ability of EGCG to attenuate injuries induced by glucotoxicity (pre-incubation in 33 mM glucose during 48 h) in rat insulinoma (RIN)-m5F  $\beta$ -cells. Insulin secretion was dramatically suppressed by high glucose incubation; this suppression has been rescued by EGCG (0.1 and 10  $\mu$ M) treatment. The authors suggested that EGCG

might be an agent for the enhancement of pancreatic  $\beta$ -cell secretory function when facing dysregulation by hyperglycaemia. Moreover, it has been shown that 10  $\mu$ M of EGCG, but not 0.1  $\mu$ M, elevated the ATP content. The protective effect of EGCG was mediated by an increased expression of insulin receptor (IR) substrate-2 (IRS2), AKT, FOXO1 and pancreatic duodenal homeobox1 (PDX-1). Moreover, EGCG improved mitochondrial function by enhancing the mass and functional integrity of mitochondria in high glucose exposed pancreatic  $\beta$ -cells (Cai and Lin 2009). EGCG has been also described to protect the INS-1 pancreatic  $\beta$ -cell line against damages induced by oxidative stress ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 80  $\mu$ M, 5 h) (Kim et al. 2010). EGCG protected cell viability at 10  $\mu$ M only; the protective effect of EGCG was more pronounced after a pre-treatment of cells (24 h) before oxidative stress. In the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , EGCG increased the expression and activity of antioxidant enzymes. Pre-treatment of cells for 24 h with 10  $\mu$ M EGCG significantly increased PI3 K (Phosphatidylinositol 3-kinase) and AKT phosphorylation, and caspase 3. The authors concluded that EGCG has protective effect on INS-1 cells against oxidative stress through both antioxidant effect and the activation of anti-apoptosis signalling (Kim et al. 2010). Han (2003) used a cytokine-induced  $\beta$ -cell damage system to examine the functional role of EGCG in the prevention of the  $\beta$ -cell injuries. When the RINm5F cells were treated with IL-1 $\beta$  in the presence of IFN- $\gamma$ , almost half of the cells became apoptotic. Pre-treatment of the cells with EGCG protected  $\beta$ -cells in a concentration-dependent manner. At a concentration of 200  $\mu$ g/ml EGCG, the cytokine-induced RINm5F cell death was almost completely blocked. Cytokine mix induced an increase in NO levels and iNOS protein level. These increases were completely abrogated by the pre-treatment of cells with EGCG (200  $\mu$ g/ml). Pre-treatment with EGCG inhibited IL-1 $\beta$ /IFN- $\gamma$ -induced NF- $\kappa$ B activation in a concentration-dependent manner. At a concentration of 200  $\mu$ g/ml EGCG, the cytokine mix-induced NF- $\kappa$ B activation was decreased to a level of the control. The author concluded that the protective effects of EGCG could be mediated through and inhibition of NF- $\kappa$ B activation (Han 2003). Similarly, the protective effects of EGCG were tested of RINm5F cells exposed to a cytokine mix (IL-1 $\beta$  + TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$ ) for 24 h with or without EGCG (10, 20 and 40  $\mu$ M) pre-

treatment for 1 h (Zhang et al. 2011). From 20  $\mu\text{M}$ , EGCG treatment protected against cytokines-induced cell death. Here, 40  $\mu\text{M}$  EGCG partially restored glucose-induced (2.8 or 16.7 mM) insulin secretion, partially reduced the cytokine-induced generation of ROS, the loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi\text{m}$ ), the release of cytochrome c from the mitochondria, and the translocation of Bax protein from the cytosol to the mitochondria. Moreover, EGCG pre-treatment prevented cytokine-induced iNOS overexpression and NO generation. The authors concluded that the pro-inflammatory cytokine-induced injuries can be prevented by EGCG pre-treatment via the mitochondrial pathway (Zhang et al. 2011). Martín et al. (2014) investigated the protective effect of EC against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide (t-BOOH) in  $\beta$ -cells. INS-1E cells were incubated with EC (5, 10, and 20  $\mu\text{M}$ ) for 20 h and then the medium was discarded and fresh medium containing 50  $\mu\text{M}$  t-BOOH was added for 2 h. Pre-treatment of cells with EC showed a protective effect against the t-BOOH-induced reactive oxygen species, carbonyl groups, p-JNK expression and cell death, and recovered insulin secretion (Martín et al. 2014).

Despite the well-known antioxidant capacity of EGCG, Suh et al. (2010) described the pro-oxidative effects of EGCG in the HIT-T15 pancreatic  $\beta$ -cell line. The cell treatment with EGCG (5–100  $\mu\text{M}$ ) decreased the viability of pancreatic  $\beta$  cells, caused concomitant increases in apoptotic cell death, and increased the production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and ROS, which contribute to oxidative cell damage. Moreover, EGCG did not scavenge exogenous  $\text{H}_2\text{O}_2$ , but rather, it synergistically increased  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative cell damage in HIT-T15 cells (Suh et al. 2010).

#### Flavones

Despite studies investigating the bioactivity of flavones still being very limited, some of them describe their anti-diabetic potential effects.

**Animal studies** The anti-hyperglycaemic effect of apigenin was described by Panda and Kar (2007) in alloxan-induced diabetic mice (120 mg/kg, single dose, i.p.). These authors found that, while a significant decrease in the concentrations of serum insulin with a parallel increase in serum glucose was observed in alloxan-treated diabetic animals, the

administration of apigenin (0.78 mg/kg, daily administration, s.c.) for 10 days increased the levels of serum insulin with a parallel decrease in glucose concentration (Panda and Kar 2007). Rauter et al. (2010) evaluated the anti-hyperglycaemic effect of eight standard flavonoids including the aglycone apigenin and glucosides of apigenin and luteolin in streptozotocin-induced diabetic rats. To this aim, STZ-induced diabetic rats (40 mg/kg, single dose, i.p.) were treated with flavonoids (4 mg/kg, i.p., once daily) for 7 days. Among the flavones tested, only the aglycone apigenin significantly lowered the blood glucose levels of diabetic animals; this effect was also found in the oral glucose tolerance test [oral administration of a 20 % (w/v) aqueous glucose solution (10 ml/kg)] (Rauter et al. 2010).

**In vitro studies on insulin secreting and pancreatic  $\beta$ -cells** Kim et al. (2007a) focused on the preventive effects of apigenin and luteolin on cytokine ( $\text{IL-1}\beta + \text{IFN-}\gamma$ )-induced  $\beta$ -cell damage. Apigenin and luteolin completely protected RINm5F cells against ( $\text{IL-1}\beta + \text{IFN-}\gamma$ )-mediated cytotoxicity. Incubation with apigenin (25 or 50  $\mu\text{M}$ ) or luteolin (25 or 50  $\mu\text{M}$ ) during cytokines treatment resulted in a significant reduction in ( $\text{IL-1}\beta + \text{IFN-}\gamma$ )-induced NO production, which was in accordance with the reduced levels of the inducible form of NO synthase expression. The molecular mechanism by which apigenin and luteolin inhibited iNOS gene expression appeared to involve the inhibition of NF- $\kappa\text{B}$  activation. Moreover, apigenin (25 or 50  $\mu\text{M}$ ) or luteolin (25 or 50  $\mu\text{M}$ ) have also been described to prevent in vitro ( $\text{IL-1}\beta + \text{IFN-}\gamma$ )-mediated inhibition of insulin secretion in isolated rat islets (Kim et al. 2007a).

Moreover, apigenin was described to attenuate 2-deoxy-D-ribose (dRib)-induced oxidative cell damages in HIT-T15 cells (Suh et al. 2012). dRib (30 mM, 24 h) decreased cell viability and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi\text{m}$ ), while it markedly increased intracellular levels of ROS, apoptosis, and activity of the oxidative stress-related transcription factors NF- $\kappa\text{B}$  and AP-1. Pre-treatment of cells with apigenin (10  $\mu\text{M}$ ) for 30 min before the addition of dRib partially attenuated the dRib-induced injuries. The antioxidants, N-acetyl-L-cysteine and alpha-lipoic acid, also prevented both dRib-induced oxidative damage and the activation of NF- $\kappa\text{B}$  and AP-1. Taken together, the authors suggested that apigenin

attenuates dRib-induced cell damage in pancreatic  $\beta$ -cells via the inhibition of oxidative stress-related signalling (Suh et al. 2012).

### Flavanones

**Animal studies** Naringenin, naringin, and hesperidin were also investigated for their anti-diabetic effect in vivo. Sharma et al. (2011) evaluated whether naringin treatment ameliorates insulin resistance (IR) and  $\beta$ -cell dysfunction in high-fat diet (HFD)-STZ-induced type 2 diabetic rats. To this aim, Wistar male rats were fed a HFD (55 % energy from fat and 2 % cholesterol) to develop insulin resistance and on the 10th day were injected with a low dose of streptozotocin (40 mg/kg, single dose, i.p.) to induce type 2 diabetes. After confirmation of hyperglycaemia on the 14th day, different doses of naringin (25, 50 and 100 mg/kg, oral administration, once daily for 28 days) were administered while the rats were maintained on the HFD. Serum glucose, insulin and HOMA-IR levels were significantly elevated in diabetic control rats compared with the normal controls. Naringin significantly decreased hyperglycaemia, hyperinsulinaemia, IR, serum TNF- $\alpha$ , IL-6, and CRP and concomitantly increased  $\beta$ -cell function and adiponectin levels. Increased TBARS and decreased antioxidant enzyme activities in the serum and pancreas of diabetic rats were also normalised. Pancreatic histology showed that diabetic control rats had severe damage of the endocrine pancreas, including significant reduction of the pancreatic islet area and atrophy of cells. Middle and high doses of naringin repaired the injury of pancreatic islet cells; naringin at 100 mg/kg increased the islet area to near-normal control levels. Furthermore, on electron microscopic analysis, compared with normal controls,  $\beta$ -cells from HFD-STZ-treated rats displayed a significantly distended endoplasmic reticulum (ER) and reduced insulin secretory granule numbers. Treatment with naringin 100 mg/kg per day attenuated ER distension and preserved granule content, suggesting that naringin preserves  $\beta$ -cell function by maintaining an adequate pool of secretory granules. Moreover, naringin dose dependently decreased the NF- $\kappa$ B protein expression in pancreas which was found to be overexpressed in HFD-STZ-induced diabetic rats (Sharma et al. 2011). In a similar study, in HFD-STZ-induced diabetic rats

(rats fed a HFD for 2 weeks and injected with a low dose of streptozotocin (35 mg/kg, single dose, i.p.)), after confirmation of hyperglycaemia on the 7th day, naringin or hesperidin (50 mg/kg, oral administration, once daily) was administered for 4 weeks (Mahmoud et al. 2012). In the diabetic control group, levels of glucose, HbA1c, MDA, NO, TNF- $\alpha$  and IL-6 were significantly increased, while serum insulin, GSH, vitamin C, and vitamin E levels were decreased. Both hesperidin and naringin administration significantly reversed these alterations (Mahmoud et al. 2012). The same results have been observed when naringenin (50 mg/kg, oral administration, once daily) was administered for 21 days in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats (injection of streptozotocin (50 mg/kg, single dose, i.p.) and then of nicotinamide (110 mg/kg) after a 15-min interval). Moreover, naringenin showed a protective effect on pancreatic tissue (Annadurai et al. 2012). More recently, the same author described the ameliorative effect of naringenin on hyperglycaemia-mediated inflammation in pancreatic tissues of STZ-nicotinamide-induced diabetic rats (Annadurai et al. 2013). Indeed, naringenin (50 mg/kg, oral administration, once daily, 21 days) significantly down-regulated the C-reactive protein, pro-inflammatory cytokine, NF- $\kappa$ B and inducible NO synthase, at both mRNA and protein levels (Annadurai et al. 2013).

**In vitro studies on insulin secreting and pancreatic  $\beta$ -cells** Among the flavanones, naringenin was found particularly active on insulin secretion and  $\beta$ -cell protection. Lin et al. (2012) tested the ability of naringenin to modulate insulin secretion and to prevent cytokine-induced injuries in INS-1 (832/13) cells. The treatment of cells with a pro-inflammatory cytokine mixture (IL-1 $\beta$  40U/ml; TNF- $\alpha$  220U/ml; and IFN- $\gamma$  80U/ml) resulted in an increase in apoptosis and a strong decrease in insulin secretion. While naringenin (50  $\mu$ M) failed to reverse the reduced glucose-induced insulin secretion, it significantly prevented cytokine-induced apoptosis. The authors proposed that naringenin might possibly be able to protect  $\beta$ -cells from cytokines toxicity by enhancing cell survival through the PI3-kinase pathway, independently of p-p38MAPK or iNOS (Lin et al. 2012). More recently, naringenin was tested in INS1-E cells in order to investigate its effect on expression of genes

involved in  $\beta$ -cell survival and function under normoglycaemic (NC) and glucotoxic (GC) conditions. In acute exposure experiments, INS-1E cells were grown in 11 mM glucose (72 h) and then incubated with naringenin (1 h) with 3.3 mM or 16.7 mM glucose. Naringenin did not affect the basal insulin release, while a significant concentration-dependent increase was found at  $10^{-8}$ M and  $10^{-6}$ M in the presence of 16.7 mM glucose concentration. In chronic exposure experiments (INS-1E cells were grown in 11 mM glucose (72 h) with/without naringenin at  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$ M, and then incubated with 3.3 or 16.7 mM glucose), naringenin did not induce any significant increase in insulin release in basal glucose condition, but an increase was observed at 16.7 mM glucose for all concentrations tested (Bhattacharya et al. 2014). When cells were incubated in glucotoxic conditions (INS-1 were grown in 25 mM glucose for 72 h with/without naringenin at  $10^{-6}$ M), INS1-E showed a significant decrease in insulin response to glucose (16.7 mM), which was partially reversed by naringenin. Moreover, the authors analysed a set of 15 genes related to the regulation of GHS,  $\beta$ -cell function, stress response and apoptosis inhibition both under NC and GC and showed that  $10^{-6}$ M naringenin was able to modulate some of them. Specifically, both at in NC and GC, naringenin was able to significantly up-regulate GLUT2, glucokinase, transcription factor PDX-1, AKT1 and AKT2 (Bhattacharya et al. 2014).

#### Non-flavonoids

##### *Phenolic acids*

*Animal studies* Adisakwattana et al. (2008) investigated the effects of cinnamic acid and derivatives on insulin secretion in normal rats. Rats were anaesthetised and infused with various compounds in the jugular vein (5 mg/kg). Blood samples were collected in the femoral vein before and 3, 6, 10, 15 and 20 min after test compound administration. The intravenous administration of *p*-methoxycinnamic acid and ferulic acid significantly decreased plasma glucose and increased insulin concentration. In contrast, 6 min after infusion, *m*-hydroxycinnamic acid induced a transient decrease in plasma glucose concentration. The authors suggested that *p*-methoxycinnamic acid and ferulic acid may be beneficial for the treatment of diabetes because they

regulated blood glucose level by stimulating insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells (Adisakwattana et al. 2008). Ramar et al. (2012) investigated the protective effects of ferulic acid (10 mg/kg; oral administration, once daily for 15 days) in alloxan-induced diabetic mice (75 mg/kg, single dose, i.p.). In some tissues and serum of diabetic mice, glucose concentration and lipid peroxidation markers were significantly increased while the levels of antioxidants were significantly decreased. Moreover, immunohistochemical studies in pancreatic sections of diabetic mice demonstrated a marked increase in NF- $\kappa$ B immunoreactivity (a marker of inflammation) and a deterioration of  $\beta$ -cells. Oral administration of ferulic acid significantly decreased the alterations described above (Ramar et al. 2012). Prabhakar et al. (2013) investigated the anti-diabetic effect of ferulic acid administered alone or in combination with oral hypoglycaemic drugs (OHD) in STZ-induced diabetic rats (50 mg/kg, single dose, i.p.). Seven days after STZ injection, diabetic rats were orally treated for three weeks with 10 mg/kg or 40 mg/kg of ferulic acid, with or without metformin (12.5 or 50 mg/kg) or a thiazolidinedione (2.5 or 10 mg/kg). Ferulic acid, regardless of the dosage, significantly decreased the blood glucose concentration of diabetic rats; the observed decrease was comparable to that observed with 50 mg/kg metformin or 10 mg/kg thiazolidinedione. The same level of reduction in blood glucose concentration was achieved when ferulic acid was administered in combination with the lower dose of OHD. Histopathological analysis showed that in the untreated diabetic rats, the number and the size of islets were significantly decreased and the grade of insulinitis was very high. The administration of ferulic acid in combination with OHD induced a significant improvement in the number and size of islets as well as in the grade of insulinitis. The authors suggested that the combination of ferulic acid with these OHDs could provide an opportunity to reduce their dosage, which may be useful to diminish their side effects. The anti-diabetic effect of ferulic acid was also confirmed by Roy et al. (2013) in STZ-induced diabetic rats (i.p. dose of 3 mg/kg). Two days after STZ injection, ferulic acid was orally administered to diabetic rats for 8 weeks at 50 mg/kg (alternative day or daily treatment). Ferulic acid induced a significant decrease in blood glucose level and a marked increase in serum insulin level in comparison to diabetic control rats. In the pancreas, ferulic acid induced a decrease in lipid peroxidation and

an increase in SOD and catalase activities, and in GSH levels. Diabetic rats administered daily with ferulic acid presented a significant improvement in the histological appearance of pancreas. Furthermore, ferulic acid induced a significant decrease in apoptosis and in pro-inflammatory cytokines expression in the pancreas. The majority of ferulic acid effects were more significant with daily dose compared to alternative dose treatments (Roy et al. 2013).

Jung and collaborators investigated the blood glucose-lowering effect and antioxidant capacity of caffeic acid in db/db mice. For 5 weeks, diabetic mice were fed a diet with or without caffeic acid supplementation (0.02 %). After the treatment period, caffeic acid induced a significant reduction in the blood glucose, HbA1c and glucagon levels compared to the control diabetic mice. On the other hand, the plasma insulin and C-peptide levels were increased in caffeic acid-treated mice. This increased plasma insulin level was attributable to a protective effect of caffeic acid on islets, which presented a preserved architecture compared to the control diabetic mice. In addition, caffeic acid significantly increased SOD, catalase, and glutathione peroxidase activities and their respective mRNA levels, while lowering the hydrogen peroxide and TBARS levels in the erythrocyte of db/db mice. The authors concluded that caffeic acid exhibits a significant anti-diabetic potential through the enhancement of insulin secretion and antioxidant capacity (Jung et al. 2006).

Similar biochemical results were obtained by Punithavathi et al. (2011) who investigated the anti-diabetic effect of gallic acid (10 or 20 mg/kg, oral administration, once daily for 21 days) in STZ-induced diabetic rats (40 mg/kg, single dose, i.p.). Moreover, compared to diabetic control rats, gallic acid significantly decreased pancreatic TBARS and lipid hydroperoxides and increased the activities of pancreatic SOD, catalase and glutathione peroxidase. Gallic acid at the dose of 20 mg/kg showed the most significant effects for these parameters. Histopathology of pancreas confirmed the protective effects of gallic acid in diabetic rats. Pancreas isolated from control diabetic rats displayed necrotic and fatty infiltrate of the islet cells of Langerhan's; these injuries were not observed in gallic acid-treated rats (20 mg/kg) (Punithavathi et al. 2011).

*In vitro studies on insulin secreting and pancreatic  $\beta$ -cells* In parallel to in vivo experiments,

Adisakwattana et al. (2008) evaluated the effect of cinnamic acid and its derivatives for insulin secreting activity. In INS-1 cells, cinnamic acid was inactive, while the addition of *m*-hydroxy or *p*-methoxy residues on cinnamic acid led to an increase in insulin secretion. The introduction of *p*-hydroxy and *m*-methoxy-substituted groups in cinnamic acid structure (ferulic acid) led to the most potent insulin secreting agent among the various cinnamic acid derivatives tested. Insulin secretion was associated with a rise of  $[Ca^{2+}]_i$  in INS-1 cells and was confirmed in perfused rat pancreas.

The insulin-secreting effect of caffeic acid ( $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-6}$  M) has been tested on INS-1E cells both in acute and chronic conditions (Bhattacharya et al. 2014). For acute studies, the INS-1E cells were grown in 11 mM glucose (72 h) and then incubated (1 h) with caffeic acid either at low (3.3 mM) or high (16.7 mM) glucose concentrations. Caffeic acid had no effect on 3.3 mM glucose-induced insulin secretion, regardless of the concentration tested, while it enhanced 16.7 mM glucose-induced insulin secretion at  $10^{-6}$  M. In chronic exposure experiments (INS-1E cells were grown in 11 mM glucose (72 h) with/without caffeic acid at  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$  M and incubated in the presence of 3.3 or 16.7 mM glucose for 1 h), caffeic acid did not induce any significant increase in insulin release at basal glucose condition, but a concentration-dependent increase was observed at 16.7 mM glucose from  $10^{-10}$  M. When cells were incubated in glucotoxic conditions (INS-1 grown in 25 mM glucose for 72 h with/without caffeic acid),  $10^{-6}$  M caffeic acid partially reversed the decrease in insulin response in the presence of 16.7 mM glucose.

Sameermahmood et al. (2010) investigated the insulin secreting and the protective effects of gallic acid against glucolipotoxicity-induced  $\beta$ -cells injuries. Gallic acid (0.3–10  $\mu$ M) dose-dependently increased basal insulin secretion in RINm5F  $\beta$ -cells, an effect that was associated with mRNA up-regulation of PDX-1 and insulin. RINm5F cells were also exposed to a combination of both high glucose (25  $\mu$ M) and palmitate (500  $\mu$ M) for 24 h in the presence or absence of gallic acid. In glucolipotoxic conditions, cells exhibited lower levels of insulin secretion, an effect that was significantly counteracted by 10  $\mu$ M gallic acid. Moreover, 10  $\mu$ M gallic acid was found to prevent all of the apoptotic signals induced by glucolipotoxicity; it decreased DNA

damage, apoptotic markers and NF- $\kappa$ B signals (Sameermahmood et al. 2010).

Recently, Fernandez-Millan et al. (2014) investigated the potential anti-diabetic properties of the microbial phenolic metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DHPAA), 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA) and 3-hydroxyphenylpropionic acid (HPPA). To this end, their ability to influence  $\beta$ -cell function and to protect against tert-butyl hydroperoxide-induced  $\beta$ -cell toxicity was investigated. Cells were treated with 1–10  $\mu$ M of DHPAA, DHBA or HPPA for 20 h and then incubated in medium containing 4 or 10 mM glucose for 90 min. DHPAA (5  $\mu$ M) and HPPA (1  $\mu$ M) were able to potentiate glucose (4 or 10 mM)-induced insulin secretion in INS-1E and isolated rat pancreatic islets. These potentiating effects were found to be mediated by the activation of PKC and ERK1/2 pathways. The potential of phenolic metabolites to protect  $\beta$ -cell against the impairment of viability and insulin secretion induced by the potent pro-oxidant t-BOOH was also studied. To this end, INS-1E cells were treated with 5  $\mu$ M DHPAA, 1  $\mu$ M HPPA or 10  $\mu$ M DHBA for 20 h and then submitted to 50  $\mu$ M t-BOOH respectively for 2 h or 90 min. Treatment of cells with t-BOOH enhanced ROS generation and protein cell damage and decreased insulin secretion and cell viability. These alterations were recovered when INS-1E cells were previously treated with DHPAA or HPPA (Fernandez-Millan et al. 2014). To the best of our knowledge, this is the only paper published on the *in vitro* anti-diabetic potential of microbial-derived flavonoid metabolites.

### *Stilbenes*

**Animal studies** In the last decade, the anti-diabetic properties of resveratrol have been extensively studied in various animal models, showing that this stilbene is able to ameliorate diabetes (Szkudelski and Szkudelska 2015).

Chen et al. (2007) evaluated plasma glucose and insulin levels after the intraperitoneal administration of resveratrol (3 mg/kg) both in normal and STZ-induced diabetic rats. Blood was collected from the femoral vein before and every 20 min after resveratrol administration. In normal rats, resveratrol increased the insulin levels associated with the reduction of plasma glucose. On the other hand, in STZ-diabetic

rats, the plasma glucose and insulin levels were not significantly modified after resveratrol treatment (Chen et al. 2007). Ku et al. (2012) evaluated the protective effect of resveratrol pre-treatment on  $\beta$ -cells. To this aim, higher doses of resveratrol (15 mg/kg, *i.p.*, twice a day) were administered for 7 days prior to STZ injection (70 mg/kg, single dose, *i.p.*). Three days after STZ injection, authors showed that resveratrol pre-treatment prevented the development of hyperglycaemia. Moreover, blood glucose levels during the intraperitoneal glucose tolerance test were significantly lower in resveratrol-pre-treated rats compared to STZ-control rats. Resveratrol pre-treatment also prevented apoptosis though the inhibition of caspase-3 and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in pancreatic islets (Ku et al. 2012).

Resveratrol has also been tested in STZ-nicotinamide-induced experimental diabetic rats (injection of streptozotocin (50 mg/kg, single dose, *i.p.*) and then of nicotinamide (110 mg/kg) after a 15-min interval). The oral administration of resveratrol (5 mg/kg, once daily for 30 days) induced a decrease in the levels of blood glucose, HbA1c, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, NF- $\kappa$ B p65 unit and NO, with a concomitant increase in plasma insulin. Furthermore, resveratrol-treated diabetic rats elicited a notable attenuation in the levels of lipid peroxides, hydroperoxides and protein carbonyls in both plasma and pancreatic tissues. The diminished activities of pancreatic antioxidant enzymes as well as the decreased levels of plasma vitamin C, vitamin E and reduced glutathione in diabetic rats returned to near-normal values in resveratrol-treated rats. Histological analysis of pancreatic sections of treated diabetic rats indicates that resveratrol preserves the structural and functional integrity of pancreatic  $\beta$ -cells (Palsamy and Subramanian 2010).

In an animal model of type 2 diabetes, Lee et al. (2012) examined the beneficial effects of resveratrol on pancreatic islets. To this aim, diabetic db/db mice were orally treated with resveratrol (20 mg/kg, daily) for 12 weeks. Resveratrol treatment significantly improved the glucose tolerance in db/db mice, resulting in significantly lower blood glucose concentrations 120 min after glucose loading (IPGTT). The mean value of the AUC was also significantly lower in the resveratrol-treated db/db mice than in the db/db control group. These effects were associated with a significant increase in both pancreas weight and  $\beta$ -cell mass. Moreover, the levels oxidative stress marker

8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) decreased both in islet nuclei and in urine (Lee et al. 2012).

Similar effects were observed by Do et al. (2012). In this study, diabetic db/db mice were fed a diet with or without resveratrol supplementation (0.005 and 0.02 %) for 6 weeks. Blood glucose levels were evaluated every 2 weeks during the study, while intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was performed in the 5<sup>th</sup> week. The authors found that initial fasting blood glucose level was not different among the groups. On the other hand, resveratrol significantly reduced hyperglycaemia in the db/db mice from the second week until the sixth week. At the end of the experimental period, after 6 weeks, both doses of resveratrol significantly lowered fasting blood glucose levels compared to the control db/db mice. Moreover, blood HbA1c levels were significantly lower in the 0.02 % resveratrol-treated db/db mice. The IPGTT revealed that blood glucose levels were significantly lower in the 0.02 % resveratrol-treated group than in the control group at 30 and 120 min after glucose load. Moreover, 0.02 % resveratrol-supplemented db/db mice tended to present a lower AUC compared to the control group. Plasma insulin levels were increased by 36 and 64 % in the 0.005 % resveratrol- and the 0.02 % resveratrol-treated group compared to the control db/db group, respectively (Do et al. 2012).

Zhang et al. (2012) described the ability of resveratrol to protect islets from abnormal insulin secretion and morphological changes induced by a high-fat diet. In this study, mice were divided into 3 groups: a normal control (NC) group, a high-fat diet (HF) (59 % fat, 20 % protein, and 21 % carbohydrate) group and high-fat diet under resveratrol treatment (HFR) group. The HFR group was fed high fat diet for 8 weeks and then additionally orally administered with resveratrol at 400 mg/kg daily. After 24 weeks of feeding, high-fat diet fed mice developed type 2 diabetes associated with an impaired intraperitoneal glucose tolerance test with concomitant elevations in fasting plasma insulin. In the HFR group, the changes in blood glucose were particularly remarkable. Indeed, the AUC value after IPGTT was significantly lower than in NC group. The levels of fasting blood glucose were equivalent both in NC and HFR groups. Compared to HF group, insulin secretion in HFR group in vivo (after IPGTT) and in vitro (on isolated pancreatic islets) was improved. It was also shown that treatment with resveratrol

prevented the HF-induced islets morphological changes, increased  $\beta$ -cell mass and oxidative stress. Resveratrol administration promoted the expression of Sirtuin 1 (SIRT1) in islets, while the expression of uncoupling protein 2 (UCP2) was decreased. Resveratrol also presented a beneficial effect on the ratios of expressions of Bcl-2/Bax and levels of malondialdehyde/glutathione peroxidase. The authors concluded that resveratrol can protect islets from abnormal insulin secretion and morphological changes induced by a high-fat diet; effects that might be partly related to the activated SIRT1 signal pathway, improved oxidative stress-induced damage and incidence of apoptosis (Zhang et al. 2012).

*In vitro studies on insulin secreting and pancreatic  $\beta$ -cells* In vitro studies showed inconstant results concerning the resveratrol effect on pancreatic  $\beta$ -cells, described to inhibit or to enhance insulin secretion depending on the model.

Szkudelski described an inhibitory effect of resveratrol on insulin secretion in isolated rat pancreatic islets (Szkudelski 2006, 2008). The treatment of pancreatic islets with resveratrol (1–100  $\mu$ M for 90 min) induced a concentration-dependent decrease in glucose (6.6 or 16.6 mM)-induced insulin secretion. This effect was not permanent and disappeared after resveratrol withdrawal from the buffer. The same inhibitory effect of resveratrol was also described when islets were incubated with other secretagogues, for example 10 mM leucine with 10 mM glutamine, glibenclamide (5  $\mu$ M) or forskolin (5  $\mu$ M) in the presence of 6.6 mM glucose. On the other hand, 100 nM of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), an activator of protein kinase C, completely suppressed the inhibitory effect of 1 and 10  $\mu$ M resveratrol on insulin release. However, at the highest concentration (100  $\mu$ M), resveratrol also diminished insulin secretion even in the presence of PMA.

In the INS-1  $\beta$ -cell line, Youl et al. (2010) described that one hour pre-incubation of resveratrol (tested in a range of 0–200  $\mu$ M) did not modulate 8.3 mM glucose-induced insulin secretion. At a concentration of 200  $\mu$ M, in the absence of glucose, it induced a modest increase in insulin secretion. Resveratrol (20  $\mu$ M) also slightly amplified glibenclamide-induced insulin secretion but, contrary to 20  $\mu$ M quercetin, did not modify glibenclamide-induced ERK1/2 phosphorylation. Moreover, resveratrol was

ineffective in protecting INS-1 cells from oxidative damage induced by 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (Youl et al. 2010).

Chen et al. (2007) also investigated the effect of resveratrol on the electrophysiology and insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. Three  $\beta$  cell lines (MIN6, Hit-T15, and RIN-m5F cells) were used to study the effect of resveratrol (3, 10, 30, and 100  $\mu\text{M}$ ) on insulin secretion. The results showed that resveratrol significantly increased insulin secretion at 10 and 30  $\mu\text{M}$  in MIN6, Hit-T15, and RIN-m5F cells. In RIN-m5F cells, insulin secretion was significantly increased from 3  $\mu\text{M}$  resveratrol. In contrast to MIN6 cells, 100  $\mu\text{M}$  resveratrol increased insulin secretion in Hit-T15 and RIN-m5F cells. Whole-cell voltage clamp study in the MIN-6 cell revealed that resveratrol significantly inhibited ATP-sensitive  $\text{K}^+$  current at 3  $\mu\text{M}$ , and voltage-gated  $\text{K}^+$  currents at 30  $\mu\text{M}$ . Moreover,  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  current was activated by resveratrol at 100  $\mu\text{M}$ . Moreover, resveratrol markedly depolarised membrane potential (3–100  $\mu\text{M}$ ). The authors concluded that resveratrol can act as an insulin-secretagogue through IKATP and IKV inhibition (Chen et al. 2007).

Chronic effects of resveratrol have been studied on insulin secretion and glucose metabolism in the INS-1E  $\beta$ -cell line (Vetterli et al. 2011). INS-1 cells were pre-incubated for 24 h with 1, 5 and 25  $\mu\text{M}$  resveratrol, washed and challenged for insulin secretion. Resveratrol did not change basal (2.5 mM glucose) insulin release, regardless of the concentration tested. However, it potentiated 15 mM glucose-induced insulin secretion in a concentration-dependent manner. A maximal effect was observed at 25  $\mu\text{M}$ . This effect was associated with elevated glycolytic flux, resulting in increased glucose oxidation, ATP generation, and mitochondrial oxygen consumption, together with an up-regulation of key genes involved in  $\beta$ -cell function [glukokinase GK, GLUT2, PDX-1, TFAM (mitochondrial transcription factor A) and HNF-1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor-1)]. The same effects were observed when resveratrol was studied in human isolated islets. Overexpression of SIRT1 in INS-1E cells potentiated resveratrol effects on insulin secretion. Conversely, the inhibition of SIRT1 achieved either by expression of an inactive mutant or by using the EX-527 inhibitor both abolished resveratrol effects on glucose responses. The treatment of INS-1E cells with EX-527 also prevented

resveratrol-induced up-regulation of GLUT2, glucokinase, PDX-1, and TFAM. The authors concluded that resveratrol effects were mediated by and fully dependent on active SIRT1, defining a new role for SIRT1 in the regulation of insulin secretion (Vetterli et al. 2011).

Because cAMP plays a critical role in glucose- and incretin-stimulated insulin secretion as well as overall pancreatic  $\beta$ -cell health, Rouse et al. (2014) hypothesised that phosphodiesterases (PDEs), which degrade cAMP, could be potential therapeutic target in the management of T2DM. Resveratrol (0.1, 1 and 10  $\mu\text{M}$ ), which has been reported to act as a PDE inhibitor in various cell types, has been studied in pancreatic  $\beta$ -cells. In MIN-6  $\beta$ -cells, 0.1 and 1  $\mu\text{M}$  resveratrol increased insulin secretion in a concentration-dependent manner under low-glucose conditions (1 mM). On the other hand, the three doses of resveratrol significantly increased glucose (25 mM)-induced insulin secretion. When examining the effects of resveratrol on human islets, it was found that slightly higher concentrations were required (1 and 10  $\mu\text{M}$ ) to significantly enhance glucose-induced insulin secretion in both low (5 mM) or high (25 mM) glucose conditions. Additionally, treating  $\beta$ -cell lines or human islets with resveratrol led to an increase in intracellular cAMP levels in a similar manner to 3-isobutyl-1-methylxanthine, a classic PDE inhibitor. It was also described that resveratrol treatment significantly down-regulated the mRNA expression of most of the 11 PDE isozymes, including PDE3B, PDE8A, and PDE10A, which have been previously linked to the regulation of insulin secretion in islets. Furthermore, resveratrol inhibited PDE activity in a dose-dependent manner in  $\beta$ -cell lines and human islets. Collectively, these results demonstrated a novel potential role for resveratrol as a PDE inhibitor that enhances pancreatic  $\beta$ -cell function (Rouse et al. 2014).

Lee et al. (2009a) investigated the protective effect of resveratrol against cytokine-induced injuries in  $\beta$ -cells. As SIRT1 is known to interfere with the NF- $\kappa\text{B}$  signalling pathway and because of the central role of NF- $\kappa\text{B}$  in cytokine-mediated pancreatic  $\beta$ -cell damage, the authors postulated that SIRT1 activation by resveratrol might be implicated in pancreatic  $\beta$ -cell protection. The treatment of RINm5F cells with cytokines (IL-1 $\beta$  (2 ng/ml) in combination with IFN-

$\gamma$  (100 units/ml)) induced cell damage correlated with an increase in the expression of iNOS and in NO production associated with a decrease of SIRT1 expression. SIRT1 overexpression completely prevented cytokine-mediated cytotoxicity, NO production, and iNOS expression. The molecular mechanism by which SIRT1 inhibits iNOS expression appeared to involve inhibition of the NF- $\kappa$ B signalling pathway. It was also shown that SIRT1 activation by 50  $\mu$ M resveratrol or adenoviral-directed overexpression of SIRT1 could prevent cytokines toxicity and maintain normal insulin-secreting responses to 20 mM glucose in isolated rat islets (Lee et al. 2009a).

Bhakkiyalakshmi et al. (2014) investigated the protective properties of the antioxidant pterostilbene (PTS), a naturally methoxylated analogue of resveratrol, against pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis and the involvement of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in its mechanism of action. Indeed, Nrf2 is considered to be a key regulator of the antioxidant response and thus plays an important role in preventing oxidative stress-mediated disorders, including diabetes. Because PTS induced cytotoxicity in INS-1 E cells at concentrations higher than 16  $\mu$ M, authors performed experiments in PTS-pre-treated (0–16  $\mu$ M) cells for 24 h, followed by STZ (10 mM) treatment for 1 h to identify the effect of PTS on STZ-induced cytotoxicity. PTS-pre-treated cells showed a concentration-dependent increase in viability at 4 and 8  $\mu$ M concentrations compared to STZ-treated cells. PTS induced a significant activation of Nrf2, in a concentration- and time-dependent manner, in STZ-treated INS-1E cells. Furthermore, PTS increased the expression of target genes downstream of Nrf2, such as haemoxygenase 1 (HO1), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), that confer cellular protection. PTS also up-regulated the expression of anti-apoptotic gene Bcl-2, with a concomitant reduction in pro-apoptotic Bax and caspase-3 expression. It was concluded that Nrf2 activation by PTS could provide a promising approach to safeguard pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative damage in diabetes (Bhakkiyalakshmi et al. 2014).

## Conclusions

Type 2 diabetes (T2D), considered as a major health problem, is characterized by hyperglycemia resulting in

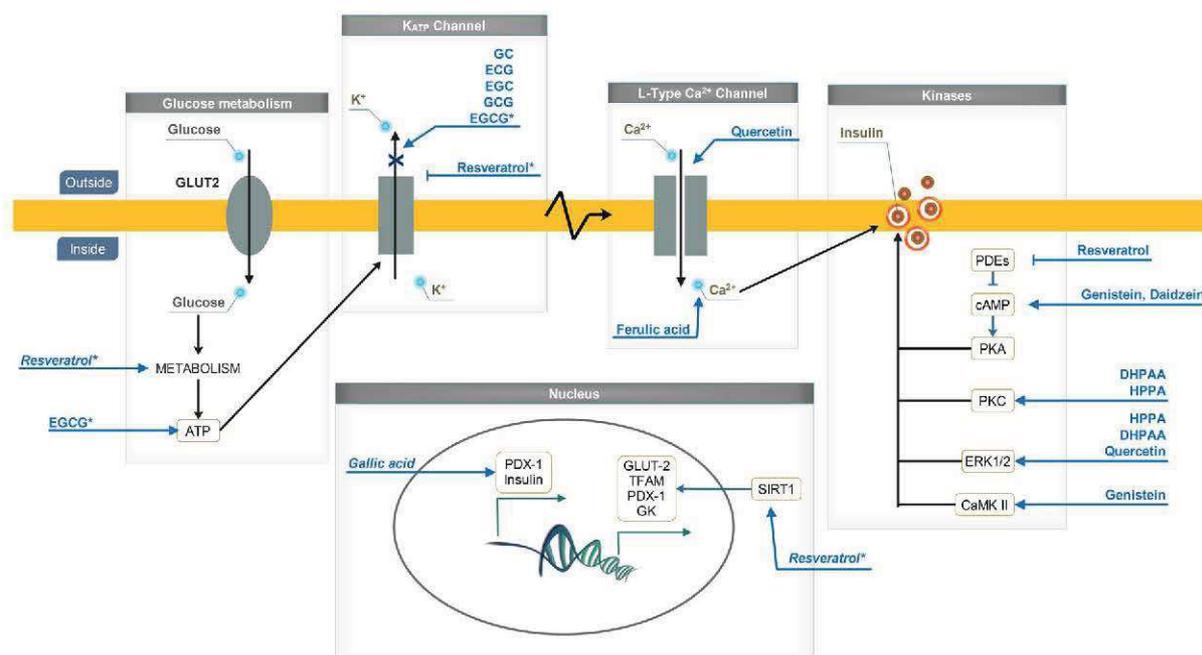
a wide range of physiological dysfunctions. To date, there is no drug to cure T2D, and the current medications used for hyperglycemia management can cause side effects or problems related to long-term efficacy or safety. T2D is a multifactorial complex metabolic disorder, associating insulin resistance and insulin secretion impairment, and  $\beta$ -cell dysfunction is thought to play a pivotal role in its etiology, worsening throughout the progression of the disease. For these reasons, alternative pharmacological interventions aimed at both protecting and improving  $\beta$ -cell function may not only reduce the risk of occurrence of T2D, but also slow down its progression toward the requirement of exogenous insulin treatment.

The hypothesis that certain polyphenolic classes may be used to prevent or treat T2D stems from the fact that consumption of this abundant class of natural molecules have been reported to decrease the likelihood to develop T2D. In line with these epidemiological studies, numerous animal and a few clinical studies have shed light on the antidiabetic action of plant polyphenols. Furthermore, a growing body of evidence raised the possibility that exposure to several classes of polyphenols would have a beneficial impact on glycemic control, notably by improving the  $\beta$ -cell function impaired in T2D.

Here, we reviewed the biological activities of polyphenols and focusing on their capacity to directly act on pancreatic  $\beta$ -cell. In particular, we described the molecular mechanisms underlying the activity of polyphenols in the protection and function of  $\beta$ -cell. Deciphering these molecular processes is of particular significance as it may lead to the identification of new cell signaling pathways that may be relevant as pharmacological targets for the prevention or treatment of T2D.

Many experimental in vivo studies converge towards the finding that both flavonoid and non-flavonoid molecules have the capacity to improve glycaemia and  $\beta$ -cell function in various species and animal models of T2D diabetes. Indeed, animal models of diabetes exposed to specific polyphenols may show improvement of hyperglycemia, of glucose intolerance and high HbA1c levels, decrease in inflammatory and oxidative stress biomarkers and normalization of pancreatic  $\beta$ -cell morphology and mass.

Notably, several conflicting works have also been published regarding the potential effect of specific



**Fig. 2** Potential molecular targets by which polyphenols regulate insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. *Asterisks* indicate that conflicting data exist in literature regarding a specific effect. Polyphenols written in *Italic* refers to long-term (chronic) exposure of cells with that specific compound. *Arrows* refer to stimulation, while symbols describe inhibitory effects. *ATP* adenosine triphosphate, *CaMK II* calmodulin-dependent protein kinase II, *cAMP* cyclic adenosine monophosphate,

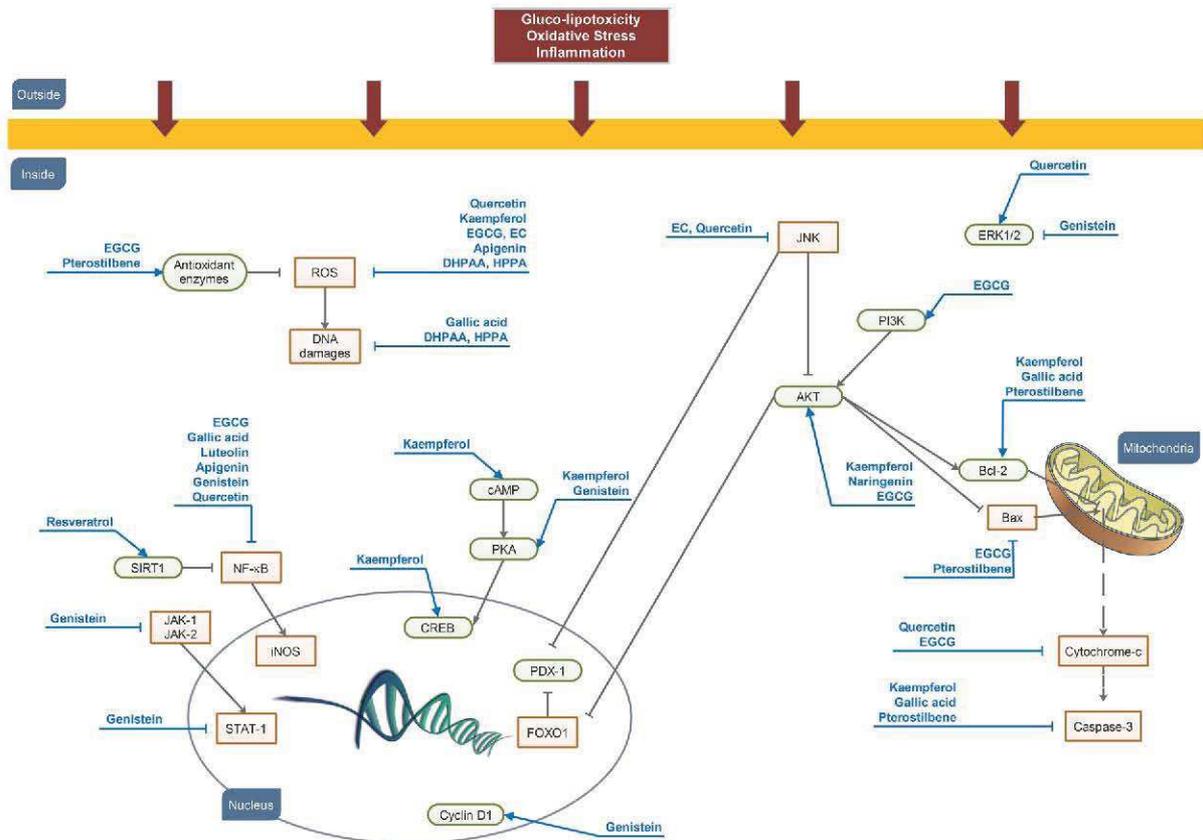
*DHPAA* 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, *EGC* epicatechin-gallate, *EGCG* epigallocatechin-gallate, *ERK1/2*: extracellular-signal-regulated kinase 1/2, *GC* gallo-catechin, *GCG* gallo-catechin-gallate, *GK* glukokinase, *GLUT2* glucose transporter 2, *HPPA* 3-hydroxyphenylpropionic acid, *PDEs* phosphodiesterases, *PDX-1* pancreatic and duodenal homeobox 1, *PKA* protein kinase A, *PKC* protein kinase C, *SIRT1* sirtuin 1, *TFAM* mitochondrial transcription factor A

polyphenols such as EGCG or resveratrol. However, those discrepancies should be carefully evaluated through examination of treatment protocols (i.e. routes, doses, frequency).

Several *in vitro* studies have also been implemented, using different cellular models of  $\beta$ -cells. In agreement with animal studies, polyphenols able to control diabetes *in vivo* were usually also able to improve the capacity of  $\beta$ -cells to secrete insulin in response to glucose and to resist to stressful insults that mimic diabetes conditions (Figs. 2, 3). Importantly, these converging *in vivo* and *in vitro* data indicate that the protective effect of polyphenolic compounds may rely, at least in part, on their capacity to directly modulate  $\beta$ -cell function. Identifying the molecular targets of such polyphenols is challenging, but it's clear that, similarly to currently available anti-diabetic drugs,  $\beta$ -cell exposure to polyphenols leads to the modulation of the activities of several signaling

proteins including ion channels, protein kinases or transcription factors. More precisely, polyphenols may improve  $\beta$ -cell function not only by stimulating survival factors or effectors of insulin secretion, but also by reducing the activity of detrimental cellular processes. This possibility indicates that a single polyphenol may act on several pharmacological targets, and that this putative multifunctional mechanism of action makes polyphenols particularly attractive novel compounds to diversify the drug arsenal to prevent and to treat T2D.

In summary, based on *in vivo* and *in vitro* studies, the beneficial activity of numerous polyphenols in the framework of diabetes management has been reviewed. Further investigations should however be conducted in humans to confirm the beneficial effects of these compounds (or their circulating metabolites) as potential preventive, or even therapeutic treatments of T2D.



**Fig. 3** Potential molecular targets by which polyphenols protect pancreatic  $\beta$ -cells from dysfunction. Red boxes depict negative regulators of  $\beta$ -cell function; green boxes depict positive regulators of  $\beta$ -cell function. Arrows refer to stimulation, while symbols describe inhibitory effect. AKT protein kinase B; Bax Bcl2-associated x protein, Bcl-2 B-cell lymphoma 2, cAMP cyclic adenosine monophosphate, CREB cAMP-responsive element-binding protein, DHPAA 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, EC epicatechin, EGCG epigallocatechin-

gallate, ERK1/2 extracellular-signal-regulated kinase 1/2, FOXO1 forkhead box protein O1, HPPA 3-hydroxyphenylpropionic acid, NF- $\kappa$ B nuclear factor- $\kappa$ B, iNOS inducible nitric oxide synthases, JAK-1 Janus kinase 1, JAK-2 Janus kinase 2, JNK c-Jun N-terminal kinase, PDK-1 pancreatic and duodenal homeobox 1, PI3K phosphatidylinositol 3-kinase, PKA protein kinase A, ROS reacting oxygen species, SIRT1 sirtuin 1, STAT-1 signal transducers and activators of transcription 1

## References

- Adewole SO, Caxton-Martins EA, Ojewole JA (2006) Protective effect of quercetin on the morphology of pancreatic beta-cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 4:64–74
- Adisakwattana S, Moonsan P, Yibchok-Anun S (2008) Insulin-releasing properties of a series of cinnamic acid derivatives in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem* 56:7838–7844
- Ae Park S, Choi MS, Cho SY et al (2006) Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life Sci* 79: 1207–1213
- Al-Numair KS, Chandramohan G, Veeramani C et al (2014) Ameliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Redox Rep*. doi:10.1179/1351000214Y.0000000117
- Annadurai T, Muralidharan AR, Joseph T et al (2012) Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *J Physiol Biochem* 68:307–318
- Annadurai T, Thomas PA, Geraldine P (2013) Ameliorative effect of naringenin on hyperglycemia-mediated inflammation in hepatic and pancreatic tissues of Wistar rats with streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetes mellitus. *Free Radic Res* 47:793–803
- Aron PM, Kennedy JA (2008) Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Mol Nutr Food Res* 52:79–104
- Ashcroft FM, Rorsman P (2004) Molecular defects in insulin secretion in type-2 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 5:135–142
- Babu PV, Liu D, Gilbert ER (2013) Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem* 24:1777–1789

- Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F (2013) Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J Diabetes Metab Disord* 12:43
- Bardy G, Virsolvy A, Quignard JF et al (2013) Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells. *Br J Pharmacol* 169:1102–1113
- Behloul N, Wu G (2013) Genistein: a promising therapeutic agent for obesity and diabetes treatment. *Eur J Pharmacol* 698:31–38
- Bensellam M, Laybutt DR, Jonas JC (2012) The molecular mechanisms of pancreatic beta-cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol* 364:1–27
- Bhakkialakshmi E, Shalini D, Sekar TV et al (2014) Therapeutic potential of pterostilbene against pancreatic beta-cell apoptosis mediated through Nrf2. *Br J Pharmacol* 171:1747–1757
- Bhattacharya S, Oksbjerg N, Young JF et al (2014) Caffeic acid, naringenin and quercetin enhance glucose-stimulated insulin secretion and glucose sensitivity in INS-1E cells. *Diabetes Obes Metab* 16:602–612
- Bonora E (2008) Protection of pancreatic beta-cells: is it feasible? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18:74–83
- Briaud I, Lingohr MK, Dickson LM et al (2003) Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 52:974–983
- Brunzell JD, Robertson RP, Lerner RL et al (1976) Relationships between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests. *J Clin Endocrinol Metab* 42:222–229
- Cai EP, Lin JK (2009) Epigallocatechin gallate (EGCG) and rutin suppress the glucotoxicity through activating IRS2 and AMPK signaling in rat pancreatic beta cells. *J Agric Food Chem* 57:9817–9827
- Cao Y, Bao S, Yang W et al (2014) Epigallocatechin gallate prevents inflammation by reducing macrophage infiltration and inhibiting tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in the pancreas of rats on a high-fat diet. *Nutr Res* 34:1066–1074
- Chaturvedi N (2007) The burden of diabetes and its complications: trends and implications for intervention. *Diabetes Res Clin Pract* 76(Suppl 1):S3–12
- Chen WP, Chi TC, Chuang LM et al (2007) Resveratrol enhances insulin secretion by blocking K(ATP) and K(V) channels of beta cells. *Eur J Pharmacol* 568:269–277
- Chiasson JL, Josse RG, Gomis R et al (2002) Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet* 359:2072–2077
- Cho JM, Chang SY, Kim DB et al (2012) Effects of physiological quercetin metabolites on interleukin-1 $\beta$ -induced inducible NOS expression. *J Nutr Biochem* 23:1394–1402
- Choi MS, Jung UJ, Yeo J et al (2008) Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Res Rev* 24:74–81
- Clifford MN (2000) Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 80:1063–1072
- Coskun O, Kanter M, Korkmaz A et al (2005) Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res* 51:117–123
- Costes S, Broca C, Bertrand G et al (2006) ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 55:2220–2230
- Coward L, Smith M, Kirk M et al (1998) Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am J Clin Nutr* 68:1486S–1491S
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 26:1001–1043
- Crozier A, Del Rio D, Clifford MN (2010) Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol Aspects Med* 31:446–467
- Dai X, Ding Y, Zhang Z et al (2013) Quercetin and quercitrin protect against cytokine-induced injuries in RINm5F beta-cells via the mitochondrial pathway and NF- $\kappa$ B signaling. *Int J Mol Med* 31:265–271
- Dalle S, Burcelin R, Gourdy P (2013) Specific actions of GLP-1 receptor agonists and DPP4 inhibitors for the treatment of pancreatic beta-cell impairments in type 2 diabetes. *Cell Signal* 25:570–579
- Day AJ, Canada FJ, Diaz JC et al (2000) Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 468:166–170
- Del Prato S, Tiengo A (2001) The importance of first-phase insulin secretion: implications for the therapy of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 17:164–174
- Del Rio D, Costa LG, Lean ME et al (2010) Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20:1–6
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP et al (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* 18:1818–1892
- Do GM, Jung UJ, Park HJ et al (2012) Resveratrol ameliorates diabetes-related metabolic changes via activation of AMP-activated protein kinase and its downstream targets in db/db mice. *Mol Nutr Food Res* 56:1282–1291
- Donovan JL, Manach C, Faulks RM et al (2006) Absorption and metabolism of dietary plant secondary metabolites. In: Crozier A, Clifford MN, Ashinara H (eds) *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Publishing, Oxford, pp 303–351
- Drews G, Krippeit-Drews P, Dufer M (2010) Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch* 460:703–718
- Elmarakby AA, Ibrahim AS, Faulkner J et al (2011) Tyrosine kinase inhibitor, genistein, reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced diabetic mice. *Vascul Pharmacol* 55:149–156
- Fernandez-Millan E, Ramos S, Alvarez C et al (2014) Microbial phenolic metabolites improve glucose-stimulated insulin secretion and protect pancreatic beta cells against tert-butyl hydroperoxide-induced toxicity via ERKs and PKC pathways. *Food Chem Toxicol* 66:245–253
- Forouhi NG, Wareham NJ (2010) Epidemiology of diabetes. *Medicine* 38:602–606
- Frodin M, Sekine N, Roche E et al (1995) Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-

- activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *J Biol Chem* 270:7882–7889
- Fu Z, Zhang W, Zhen W et al (2010) Genistein induces pancreatic beta-cell proliferation through activation of multiple signaling pathways and prevents insulin-deficient diabetes in mice. *Endocrinology* 151:3026–3037
- Fu Z, Zhen W, Yuskavage J et al (2011) Epigallocatechin gallate delays the onset of type 1 diabetes in spontaneous non-obese diabetic mice. *Br J Nutr* 105:1218–1225
- Fu Z, Gilbert ER, Pfeiffer L et al (2012) Genistein ameliorates hyperglycemia in a mouse model of nongenetic type 2 diabetes. *Appl Physiol Nutr Metab* 37:480–488
- Fu Z, Yuskavage J, Liu D (2013) Dietary flavonol epicatechin prevents the onset of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *J Agric Food Chem* 61:4303–4309
- Gee JM, DuPont MS, Day AJ et al (2000) Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 130:2765–2771
- Gharib A, Faezizadeh Z, Godarzee M (2013) Treatment of diabetes in the mouse model by delphinidin and cyanidin hydrochloride in free and liposomal forms. *Planta Med* 79:1599–1604
- Gilbert ER, Liu D (2013) Anti-diabetic functions of soy isoflavone genistein: mechanisms underlying its effects on pancreatic beta-cell function. *Food Funct* 4:200–212
- Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF et al (2004) Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr* 134:613–617
- Habtemariam S, Varghese GK (2014) The antidiabetic therapeutic potential of dietary polyphenols. *Curr Pharm Biotechnol* 15:391–400
- Han MK (2003) Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, suppresses cytokine-induced pancreatic beta-cell damage. *Exp Mol Med* 35:136–139
- Hanhineva K, Torronen R, Bondia-Pons I et al (2010) Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci* 11:1365–1402
- Hartley L, Igbinedion E, Holmes J et al. (2013) Increased consumption of fruit and vegetables for the primary prevention of cardiovascular diseases. *Cochrane Database Syst Rev* 6:CD009874
- Hirota S, Nishioka T, Shimoda T et al (2001) Quercetin glucosides are hydrolyzed to quercetin in human oral cavity to participate in peroxidase-dependent scavenging of hydrogen peroxide. *Food Sci Technol Res* 7:239–245
- Ishisaka A, Kawabata K, Miki S et al (2013) Mitochondrial dysfunction leads to deconjugation of quercetin glucuronides in inflammatory macrophages. *PLoS ONE* 8:e80843
- Jayaprakasam B, Vareed SK, Olson LK et al (2005) Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *J Agric Food Chem* 53:28–31
- Jeong SM, Kang MJ, Choi HN et al (2012) Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. *Nutr Res Pract* 6:201–207
- Jung UJ, Lee MK, Park YB et al (2006) Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. *J Pharmacol Exp Ther* 318:476–483
- Kaneko YK, Takii M, Kojima Y et al (2015) Structure-dependent inhibitory effects of green tea catechins on insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Biol Pharm Bull* 38:476–481
- Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y et al (2008) Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem* 283:9424–9434
- Kim EK, Kwon KB, Song MY et al (2007a) Flavonoids protect against cytokine-induced pancreatic  $\beta$ -cell damage through suppression of nuclear factor  $\kappa$ B activation. *Pancreas* 35:e1–e9
- Kim EK, Kwon KB, Song MY et al (2007b) Genistein protects pancreatic beta cells against cytokine-mediated toxicity. *Mol Cell Endocrinol* 278:18–28
- Kim MK, Jung HS, Yoon CS et al (2010) EGCG and quercetin protected INS-1 cells in oxidative stress via different mechanisms. *Front Biosci (Elite Ed)* 2:810–817
- Kim JH, Kang MJ, Choi HN et al (2011) Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. *Nutr Res Pract* 5:107–111
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE et al (2002) Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346:393–403
- Knowler WC, Hamman RF, Edelstein SL et al (2005) Prevention of type 2 diabetes with troglitazone in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes* 54:1150–1156
- Knutson KL, Hoenig M (1994) Identification and subcellular characterization of protein kinase-C isoforms in insulinoma beta-cells and whole islets. *Endocrinology* 135:881–886
- Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Takahashi Y (2009) Dietary quercetin alleviates diabetic symptoms and reduces streptozotocin-induced disturbance of hepatic gene expression in mice. *Mol Nutr Food Res* 53:859–868
- Ku CR, Lee HJ, Kim SK et al (2012) Resveratrol prevents streptozotocin-induced diabetes by inhibiting the apoptosis of pancreatic beta-cell and the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase. *Endocr J* 59:103–109
- Landete JM (2011) Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food Res Int* 44:1150–1160
- Lee JS (2006) Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 79:1578–1584
- Lee MJ, Lambert JD, Prabhu S et al (2004) Delivery of tea polyphenols to the oral cavity by green tea leaves and black tea extract. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 13:132–137
- Lee JH, Song MY, Song EK et al (2009a) Overexpression of SIRT1 protects pancreatic  $\beta$ -cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway. *Diabetes* 58:344–351
- Lee SJ, Kim HE, Choi SE et al (2009b) Involvement of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II (CaMK II) in genistein-induced potentiation of leucine/glutamine-stimulated insulin secretion. *Mol Cells* 28:167–174
- Lee YE, Kim JW, Lee EM et al (2012) Chronic resveratrol treatment protects pancreatic islets against oxidative stress in db/db mice. *PLoS ONE* 7:e50412
- Li JM, Wang W, Fan CY et al (2013) Quercetin preserves beta-cell mass and function in fructose-induced hyperinsulinemia through modulating pancreatic Akt/FoxO1 activation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:303902

- Lin CY, Ni CC, Yin MC et al (2012) Flavonoids protect pancreatic beta-cells from cytokines mediated apoptosis through the activation of PI3-kinase pathway. *Cytokine* 59:65–71
- Lindstrom J, Ilanne-Parikka P, Peltonen M et al (2006) Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet* 368:1673–1679
- Liu D, Zhen W, Yang Z et al (2006) Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic beta-cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *Diabetes* 55:1043–1050
- Longuet C, Broca C, Costes S et al (2005) Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans. *Endocrinology* 146:643–654
- Mahmoud AM, Ashour MB, Abdel-Moneim A et al (2012) Hesperidin and naringin attenuate hyperglycemia-mediated oxidative stress and proinflammatory cytokine production in high fat fed/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *J Diabetes Complications* 26:483–490
- Manach C, Williamson G, Morand C et al (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81:230S–242S
- Marchetti P, Dotta F, Lauro D et al (2008) An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment. *Regul Pept* 146:4–11
- Martin MA, Fernandez-Millan E, Ramos S et al (2014) Cocoa flavonoid epicatechin protects pancreatic beta cell viability and function against oxidative stress. *Mol Nutr Food Res* 58:447–456
- Mears D (2004) Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca(2+)channels. *J Membr Biol* 200:57–66
- Mena P, Garcia-Viguera C, Navarro-Rico J et al (2011) Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *J Sci Food Agric* 91:1893–1906
- Neveu V, Perez-Jimenez J, Vos F et al (2010) Phenol-explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* 2010:bap024
- Ock KC, Sang JC, Song WO (2007) Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr* 137:1244–1252
- Palsamy P, Subramanian S (2010) Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic beta-cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *J Cell Physiol* 224:423–432
- Panda S, Kar A (2007) Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice. *J Pharm Pharmacol* 59:1543–1548
- Pinet M, Castell A, Baiges I et al (2008) Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 7:299–308
- Poitout V, Robertson RP (2008) Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29:351–366
- Prabhakar PK, Prasad R, Ali S, et al (2013) Synergistic interaction of ferulic acid with commercial hypoglycemic drugs in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytomedicine* 20:488–494
- Prasath GS, Sundaram CS, Subramanian SP (2013) Fisetin averts oxidative stress in pancreatic tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *Endocrine* 44:359–368
- Punithavathi VR, Prince PS, Kumar R et al (2011) Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. *Eur J Pharmacol* 650:465–471
- Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM et al (2008) Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 10(Suppl 4):32–42
- Ramar M, Manikandan B, Raman T et al (2012) Protective effect of ferulic acid and resveratrol against alloxan-induced diabetes in mice. *Eur J Pharmacol* 690:226–235
- Rauter AP, Martins A, Borges C et al (2010) Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* 24:S133–S138
- Rodriguez-Mateos A, Vauzour D, Krueger CG et al (2014) Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Arch Toxicol* 88:1803–1853
- Rouse M, Younès A, Egan JM (2014) Resveratrol and curcumin enhance pancreatic  $\beta$ -cell function by inhibiting phosphodiesterase activity. *J Endocrinol* 223:107–117
- Roy M, Sen S, Chakraborti AS (2008) Action of pelargonidin on hyperglycemia and oxidative damage in diabetic rats: implication for glycation-induced hemoglobin modification. *Life Sci* 82:1102–1110
- Roy S, Metya SK, Sannigrahi S et al (2013) Treatment with ferulic acid to rats with streptozotocin-induced diabetes: effects on oxidative stress, pro-inflammatory cytokines, and apoptosis in the pancreatic  $\beta$  cell. *Endocrine* 44:369–379
- Sala R, Mena P, Savi M et al (2015) Urolithins at physiological concentrations affect the levels of pro-inflammatory cytokines and growth factor in cultured cardiac cells in hyperglucidic conditions. *J Funct Foods* 15:97–105
- Sameer-mahmood Z, Raji L, Saravanan T et al (2010) Gallic acid protects RINm5F beta-cells from glucolipototoxicity by its antiapoptotic and insulin-secretagogue actions. *Phytother Res* 24(Suppl 1):S83–94
- Sartor G, Schersten B, Carlstrom S et al (1980) Ten-year follow-up of subjects with impaired glucose tolerance: prevention of diabetes by tolbutamide and diet regulation. *Diabetes* 29:41–49
- Scalbert A, Manach C, Morand C et al (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:287–306
- Scully T (2012) Diabetes in numbers. *Nature* 485:S2–S3
- Selma MV, Espin JC, Tomas-Barberan FA (2009) Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem* 57:6485–6501
- Sharma AK, Bharti S, Ojha S et al (2011) Up-regulation of PPAR $\gamma$ , heat shock protein-27 and -72 by naringin attenuates insulin resistance,  $\beta$ -cell dysfunction, hepatic steatosis and kidney damage in a rat model of type 2 diabetes. *Br J Nutr* 106:1713–1723
- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ (2010) Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 87:4–14
- Song EK, Hur H, Han MK (2003) Epigallocatechin gallate prevents autoimmune diabetes induced by multiple low

- doses of streptozotocin in mice. *Arch Pharm Res* 26:559–563
- Sorenson RL, Brelje TC, Roth C (1994) Effect of tyrosine kinase inhibitors on islets of Langerhans: evidence for tyrosine kinases in the regulation of insulin secretion. *Endocrinology* 134:1975–1978
- Suh KS, Chon S, Oh S et al (2010) Prooxidative effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate on the HIT-T15 pancreatic beta cell line. *Cell Biol Toxicol* 26:189–199
- Suh KS, Oh S, Woo JT et al (2012) Apigenin attenuates 2-deoxy-D-ribose-induced oxidative cell damage in HIT-T15 pancreatic  $\beta$ -cells. *Biol Pharm Bull* 35:121–126
- Szkudelski T (2006) Resveratrol inhibits insulin secretion from rat pancreatic islets. *Eur J Pharmacol* 552:176–181
- Szkudelski T (2008) The insulin-suppressive effect of resveratrol—an in vitro and in vivo phenomenon. *Life Sci* 82:430–435
- Szkudelski T, Szkudelska K (2015) Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochim Biophys Acta* 1852:1145–1154
- Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG et al (2001) Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344:1343–1350
- Vessal M, Hemmati M, Vasei M (2003) Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 135C:357–364
- Vetterli L, Brun T, Giovannoni L et al (2011) Resveratrol potentiates glucose-stimulated insulin secretion in INS-1E  $\beta$ -cells and human islets through a SIRT1-dependent mechanism. *J Biol Chem* 286:6049–6060
- Walle T, Browning AM, Steed LL et al (2005) Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr* 135:48–52
- Wang X, Ouyang Y, Liu J et al (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
- Wenham RM, Landt M, Easom RA (1994) Glucose activates the multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II in isolated rat pancreatic islets. *J Biol Chem* 269:4947–4952
- Whalen K, Miller S, Onge ES (2015) The role of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors in the treatment of Type 2 diabetes. *Clin Ther* 37:1150–1166
- Whiting DR, Guariguata L, Weil C et al (2011) IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 94:311–321
- Williamson G (2013) Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol Nutr Food Res* 57:48–57
- Wollheim CB, Sharp GW (1981) Regulation of insulin release by calcium. *Physiol Rev* 61:914–973
- Wu X, Beecher GR, Holden JM et al (2006) Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem* 54:4069–4075
- Youl E, Bardy G, Magous R et al (2010) Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic beta-cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *Br J Pharmacol* 161:799–814
- Youl E, Magous R, Cros G et al (2014) MAP Kinase cross talks in oxidative stress-induced impairment of insulin secretion. Involvement in the protective activity of quercetin. *Fundam Clin Pharmacol* 28:608–615
- Yun SY, Kim SP, Song DK (2006) Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on pancreatic beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 541:115–121
- Zamora-Ros R, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventos RM et al (2008) Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort. *Br J Nutr* 100:188–196
- Zanotti I, Dall'Asta M, Mena P et al (2015) Atheroprotective effects of (poly)phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. *Food Funct* 6:13–31
- Zhang Y, Liu D (2011) Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. *Eur J Pharmacol* 670:325–332
- Zhang Z, Ding Y, Dai X et al (2011) Epigallocatechin-3-gallate protects pro-inflammatory cytokine induced injuries in insulin-producing cells through the mitochondrial pathway. *Eur J Pharmacol* 670:311–316
- Zhang J, Chen L, Zheng J et al (2012) The protective effect of resveratrol on islet insulin secretion and morphology in mice on a high-fat diet. *Diabetes Res Clin Pract* 97:474–482
- Zhang Y, Zhen W, Maechler P et al (2013) Small molecule kaempferol modulates PDX-1 protein expression and subsequently promotes pancreatic beta-cell survival and function via CREB. *J Nutr Biochem* 24:638–646

## Résumé et conclusion

La partie bibliographique nous a permis de fixer les enjeux de notre travail expérimental en rappelant la physiologie de la cellule  $\beta$  insulino-sécrétrice, la physiopathologie du diabète de type 2 ainsi que les activités potentielles des polyphénols dans le contrôle glycémique.

Ainsi, la cellule  $\beta$  qui sécrète l'insuline, est au centre de la physiopathologie du diabète de type 2. Protéger et/ou améliorer sa fonctionnalité constitue un enjeu thérapeutique majeur. En effet, l'hyperglycémie chronique caractéristique du diabète est à l'origine d'un stress oxydant qui survient sur une cellule qui possède peu de défenses anti-oxydantes. La cellule  $\beta$  apparaît particulièrement vulnérable dans un contexte qui se traduit par une dysfonction exprimée par :

- une **altération de la sécrétion d'insuline** induite par le glucose du fait :
  - o d'une diminution de l'expression du gène de l'insuline ;
  - o d'une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la gluco-compétence tels que les gènes du GLUT-2 et de la glucokinase ;
  - o d'une altération des capacités d'exocytose ;
- une **augmentation du processus apoptotique** conduisant à une baisse de la masse cellulaire  $\beta$ .

Agir à la fois sur des cellules  $\beta$  normales mais aussi sur des cellules  $\beta$  en dysfonction représente donc un réel intérêt thérapeutique. C'est pourquoi nous avons réalisé nos travaux expérimentaux sur la cellule  $\beta$  à la fois en condition physiologique et en condition de stress oxydant.

Dans ces conditions, les polyphénols, molécules bien connues pour leurs propriétés anti-oxydantes, peuvent effectivement apparaître comme particulièrement utiles. Des études menées chez l'animal suggèrent que des polyphénols appartenant aux groupes des flavonoïdes et des non-flavonoïdes pourraient présenter des effets antidiabétiques. Certains travaux suggèrent cependant que ces polyphénols seraient capables de posséder des effets additionnels à leur activité anti-oxydante, en modulant diverses cibles moléculaires connues pour contrôler la fonctionnalité des cellules  $\beta$  pancréatiques.

Cependant, même si ces molécules sont actives *in vitro*, il est toutefois admis qu'une fois consommées, elles subissent un métabolisme au niveau intestinal (par la microflore colique

notamment) et au niveau hépatique, posant la question de l'identité des molécules actives à l'origine des effets « santé » attribués à une supplémentation en polyphénols.

Les urolithines font partie des métabolites de polyphénols susceptibles d'être détectés au niveau plasmatique à la suite d'une consommation d'aliments riches en acide ellagique. De nombreux travaux suggèrent que ces métabolites auraient diverses propriétés biologiques anti-oxydantes, anti-inflammatoires ou anti-prolifératives, même si un nombre très limité d'études renseignent sur leurs activités *in vivo*.

Dans ce contexte, nous analyserons dans la partie expérimentale le potentiel antidiabétique des urolithines, en nous focalisant plus particulièrement sur leurs effets modulateurs de la sécrétion d'insuline.

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

## **Chapitre 1 : Article en préparation “The ellagitannin metabolite urolithin-C is a glucose-dependent regulator of insulin secretion through L-type calcium channel activation”**

---

### **Introduction**

Comme il a été mentionné précédemment dans la partie bibliographique, la dysfonction de la cellule  $\beta$  pancréatique joue un rôle majeur dans la physiopathologie du diabète de type 2. Le déficit insulino-sécrétoire de ces cellules est également associé à une baisse de la sensibilité à l'insuline des tissus cibles (foie, muscle squelettique et tissu adipeux).

Les approches thérapeutiques actuelles peuvent agir notamment sur l'insulino-sécrétion (ex : les sulfamides hypoglycémiantes ou les analogues GLP-1 qui stimulent la sécrétion d'insuline) ou sur l'insulino-résistance (ex : la metformine qui améliore la sensibilité à l'insuline). Cependant, l'existence d'effets indésirables ou la perte d'efficacité des antidiabétiques nécessitant l'association de médicaments, posent les limites des thérapeutiques actuelles disponibles pour la prise en charge du diabète de type 2.

La recherche de nouvelles molécules, notamment d'origine naturelle est très active. Elle s'oriente, entre autre, vers l'étude des polyphénols dont les travaux suggèrent depuis plusieurs années une activité biologique *in vitro* et *in vivo* avec la mise en lumière de mécanismes d'action associés.

Par exemple, des études réalisées dans ce laboratoire se sont intéressées au mécanisme d'action de la quercétine, un flavonoïde ayant démontré une activité *in vivo* dans la régulation du métabolisme glucidique notamment chez le rat diabétique (Coskun et al., 2005; Vessal et al., 2003). L'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse a montré que ce polyphénol potentialise la sécrétion d'insuline et protège la cellule  $\beta$  contre le stress oxydant *via* l'activation de la voie ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) (Youl et al., 2010). De plus, l'effet insulino-sécrétoire de la quercétine est médié par une activation directe des canaux calciques  $Ca_v$  de type L (Bardy et al., 2013).

Cependant, étant donné que les métabolites de polyphénols sont les molécules détectées dans l'organisme, il semblerait qu'elles soient à l'origine des effets biologiques attribués à la consommation de polyphénols.

Dans ce contexte, un screening de l'activité insulino-sécrétoire de 30 métabolites de polyphénols avait été réalisé sur la lignée cellulaire  $\beta$  INS-1 dans ce laboratoire. Cette étude avait identifié 4 métabolites amplifiant la sécrétion d'insuline induite par le glucose : les urolithines A, B, C et D. L'acide ellagique (le précurseur) était en revanche inactif.

Sur la base de ce travail préliminaire nous avons souhaité caractériser les effets insulino-sécrétoires des urolithines sur les cellules  $\beta$  pancréatiques, en condition physiologique et en condition de dysfonction.

## **The Ellagitannin Metabolite Urolithin-C is a Glucose-Dependent Regulator of Insulin Secretion through L-type calcium channel activation**

Bayle M., Dall'Asta M., Neasta J., Virsolvy A., Quignard J.F., Youl E.,  
Magous R., Crozier A., Del Rio D., Cros G., Oiry C.

### **ABSTRACT**

Urolithins A, B C and D are plasma circulating metabolites of dietary polyphenols resulting from the conversion of ellagitannins present in foodstuffs by colonic microbiota. Although they have been attributed various biological properties, the activity of urolithins on pancreatic insulin-secreting  $\beta$ -cell is unknown. Here, we show that urolithins A, B, C and D, with different potency and efficacy, (a) amplified glucose-, exendin-4- or glibenclamide-stimulated insulin secretion as determined in INS-1 $\beta$ -cell line or rat isolated pancreatic islets and (b) restore some insulin secretion in INS-1 cells which have been rendered unresponsive to glucose by incubation in the presence of a high glucose concentration (glucotoxicity). As urolithin C appeared as the most active compound, we further characterized its activity and mechanism of action. On the physiological model isolated pancreas preparation, urolithin C induced insulin secretion in a strictly glucose-dependent manner, having no effect under a non-stimulant concentration of glucose and enhancing the insulin-secretory effect of glucose. Mechanistic studies suggested that the effect of urolithin C on insulin secretion was linked to the amplification of calcium influx into  $\beta$ -cells through an interaction with L-type calcium channel. In summary, our findings identify urolithin C as a potential new therapeutic of type 2 diabetes.

## INTRODUCTION

Many epidemiological and interventional studies suggest that, among phytochemicals, antioxidant polyphenols underlie plant consumption-induced health benefits against metabolic syndrome and type 2 diabetes (T2D), notably through their capacity to decrease oxidative stress and inflammation (Johanningsmeier and Harris, 2011; Martel et al., 2016; Paquette et al., 2017). It was also shown that polyphenols ameliorate glucose metabolism by directly targeting the two pathophysiological factors causing T2D, *i.e.* insulin resistance and impairment of insulin secretion. For instance, resveratrol was reported to stimulate duodenal AMPK signaling pathway, initiating a gut–brain–liver neuronal axis that improved insulin sensitivity (Côté et al., 2015), while we demonstrated that quercetin potentiates glucose-induced insulin secretion and protects pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative stress through the activation of the ERK1/2 pathway (Youl et al., 2010), a result recently confirmed by other authors (Kittl et al., 2016). It was also observed that oral administration of polyphenol-rich cranberry extracts exerts a prebiotic effect with benefits regarding glucose metabolism (Anhê et al., 2015a, 2015b). However, despite significant advances in the knowledge of the possible health-promoting effects of polyphenols, their intensive metabolism in both the gastrointestinal tract and liver have questioned the identity of actual active circulating molecules (Del Rio et al., 2010; Espín et al., 2013).

Among circulating metabolites of polyphenols, urolithins originate from ellagitannins present in plants such as pomegranates, nuts and berries. Ellagitanins are hydrolyzed in the gut to produce ellagic acid, which itself undergoes conversion by microbiota into urolithins through the loss of one of its two lactones and by successive removal of hydroxyl groups (Espín et al., 2013). This process leads to closely-related molecules termed as urolithin A, urolithin B, urolithin C and urolithin D, which constitute the main human metabolites of dietary ellagic acid measured in plasma following consumption of ellagitanin-rich foodstuff (Kang et al., 2016).

Growing body of research highlighted that urolithins are bioactive on different cell types, displaying diverse valuable properties including antioxidant (Bialonska et al., 2009; Ishimoto et al., 2011), anti-proliferative (Adams et al., 2010; González-Sarrias et al., 2014; Kasimsetty et al., 2010) or anti-inflammatory (Giménez-Bastida et al., 2012; Piwowarski et al., 2015) activities. A few studies have also documented that urolithin A is active following *in vivo* administration either acutely by reducing the size of myocardial infarct in an ischemia reperfusion model (Tang et al., 2017) or chronically by promoting mitophagy in mammalian skeletal muscle cells, which in turn ameliorates muscle function in aged and normal rodents (Ryu et al., 2016).

In the present paper, we explored the activity of urolithins A, B, C and D on pancreatic insulin secreting  $\beta$ -cell function determined on cellular models. We also characterized the insulin-secreting activity of the most active molecule urolithin C on the whole isolated pancreas preparation and explored its mechanism of action as a calcium channel activator.

## METHODS

### Materials

Urolithin A, B, C and D were purchased from Dalton Pharma Services (Toronto, ON, Canada). RPMI-1640 media was purchased from Lonza (Levallois Perret, France). FCS was purchased from Eurobio (Les Ulis, France). Chemical reagents used for buffer preparation, collagenase V, exendin-4, glibenclamide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, BSA, DMSO, Ficoll, trypsin, penicillin, streptomycin, and L-glutamine were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Insulin concentrations in cell supernatants were determined using the HTRF Insulin assay kit (Cisbio International, Bagnols-sur-Cèze, France). Fura-2AM was purchased from TEF labs (Austin, TX, USA). Pluronic F-127 was purchased from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Urolithins were dissolved in DMSO (20 mmol.L<sup>-1</sup>) and stored at -20°C. When these compounds were used, control cells were treated with the solvent at the same concentration. The final concentration of DMSO did not exceed 0.1% (v/v), and did not affect insulin secretion or Ca<sup>2+</sup> measurements (data not shown).

### Animals

All animal care and experimental procedures adhered to the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication #85-23, revised 1985). Animal Care and were approved by the local Ethical committee. Male Wistar rats (Charles River, France) were weighing 280-300 g at the time of the experiments. Animals were housed in a temperature and humidity-controlled room under a 12 h light:dark cycle. Rats that were used for pancreatic islets preparation had food and water *ad libitum*. Rats that were used for isolated perfused pancreas experiments had water *ad libitum* and fed with 20 g per day of standard diet.

### Insulin secretion experiments in INS-1 cells

INS-1 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 U.mL<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg.mL<sup>-1</sup> streptomycin, 2 mmol.L<sup>-1</sup> L-glutamine, 10 mmol.L<sup>-1</sup> HEPES, 1 mmol.L<sup>-1</sup> sodium pyruvate and 50 µmol.L<sup>-1</sup> 2-mercaptoethanol, in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). INS-1 cells were plated in 24-well plates pre-coated with poly-L-lysine (4.10<sup>5</sup> cells per well) and cultured for 5 days before insulin secretion experiments. Glucotoxicity was induced by culturing cells for 48 h in RPMI medium containing 25 mmol.L<sup>-1</sup> glucose.

Insulin secretion was performed using static incubation experiments. Cells were washed with buffer 1 (123 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl, 5.4 mmol.L<sup>-1</sup> KCl, 1.3 mmol.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4 mmol.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 2.9 mmol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 5 mmol.L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> and 20 mmol.L<sup>-1</sup> HEPES, pH 7.4) supplemented with 0.1% (w/v) bovine serum albumin (BSA). Then, cells were incubated for 1h (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) in 500 µL buffer 1/BSA containing urolithin A, B, C or D in the absence (basal condition; i.e. 1.4 mmol.L<sup>-1</sup> glucose) or in the

presence of secretagogue (8.3 mmol.L<sup>-1</sup> glucose; 1.4 mmol.L<sup>-1</sup> glucose + 10 nmol.L<sup>-1</sup> glibenclamide or 8.3 mmol.L<sup>-1</sup> glucose + 1 nmol.L<sup>-1</sup> exendin-4).

#### **Insulin secretion experiments in rat pancreatic islets**

Rats were anesthetized with halothane and killed by decapitation. The common bile duct was cannulated and the pancreas was filled by injection of collagenase V solution (10 mL, 1 mg.mL<sup>-1</sup>), excised and digested at 37°C for 16 min. Islets were separated by Ficoll gradient and selected by hand-picking under a microscope. Then, islets were stabilized for 1 h (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) in buffer 2 (120 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl, 4.7 mmol.L<sup>-1</sup> KCl, 1.2 mmol.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mmol.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mmol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 24 mmol.L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 0.1% BSA, pH 7.4) containing 2.8 mmol.L<sup>-1</sup> glucose. Batches of 5 islets were incubated for 1 hour at 37°C, in 1 mL buffer 2/BSA containing 2.8 mmol.L<sup>-1</sup> or 8.3 mmol.L<sup>-1</sup> glucose in the absence or presence of 20 μmol.L<sup>-1</sup> urolithin A, B, C or D. At the end of the incubation period, supernatants were saved and stored at -20°C until insulin assay.

#### **Insulin secretion experiments in rat isolated perfused pancreas**

Rat was anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg; i.p) and pancreas was isolated from the neighboring tissues using the method of Loubatières et al. (Loubatières et al., 1969). Then, the organ was transferred into a thermostated (37°C) plastic chamber and was perfused through its own arterial system with buffer 3 (119 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl, 4.7 mmol.L<sup>-1</sup> KCl, 1.2 mmol.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mmol.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mmol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 23 mmol.L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 0.2% BSA, pH 7.4) containing 5 mmol.L<sup>-1</sup> or 8.3 mmol.L<sup>-1</sup> glucose depending on the experiment. Perfused medium was maintained at 37°C and continuously bubbled with 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>. Infusion pressure was adjusted to provide a pancreatic outflow rate of 2.5 mL.min<sup>-1</sup> throughout the experiment. A 30 min equilibration period was allowed before taking the first sample. Two more samples were collected 10 and 15 min later. Then, depending of the topic of the experiment, each pancreas was perfused with 5 mmol.L<sup>-1</sup> or 8.3 mmol.L<sup>-1</sup> glucose, in the absence or in the presence of 20 μmol.L<sup>-1</sup> urolithin C, as indicated in the figure legend (incubation period).

All fractions were collected for 1 min, allowing pancreatic effluent output to be determined, and were stored at -20°C until insulin assay. Insulin release was calculated by multiplying the hormone concentration by the flow rate. The area under the curve (AUC) depicted evolution on insulin concentration as a function of time.

#### **Insulin assays**

Insulin quantification was performed using homogeneous time-resolved fluorescence method (HTRF)-based CisBio insulin assay kit according to manufacturer's instructions (Cisbio, France) and as previously described (Youl et al., 2010).

### **Preparation of dispersed cells from rat pancreatic islets and images analysis of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in cells**

Isolated cells were prepared by dispersion of islets with trypsin and plated on culture chamber (equivalent to 10 islets per chamber) in RPMI-1640 medium containing 10 mmol.L<sup>-1</sup> glucose and the experiments were performed on clusters of cells after 2 days of culture. Intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) were measured using the ratiometric fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator Fura-2AM (22 ± 2°C) as previously described (Gysebergh et al., 1999; Youl et al., 2010). Briefly, cells isolated from rat pancreatic islets were incubated with 2.5 μmol.L<sup>-1</sup> Fura-2AM plus 0.02% Pluronic F-127 as described. Cells were rinsed with buffer 2 and chambers mounted on a microscope stage (Axiovert, Zeiss, Iena, Germany; 20x objective) during a 15-minute waiting period for the de-esterification of Fura-2AM in presence of urolithin C (20 μmol.L<sup>-1</sup>). Media and drugs were then applied directly on top of the imaged cells using a perfusion system, as indicated in the legend to the figures. Images were captured digitally every 2 seconds with a cooled CCD camera (Photometrics, Roper scientific, Evry, France). Cells loaded with Fura-2AM were illuminated by excitation with a dual UV light source at 340 nm (Ca<sup>2+</sup>-bound) and 380 nm (Ca<sup>2+</sup>-free) using a lambda DG-4 excitation system (Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA). Fluorescence emission was measured at 510 nm and analyzed (Metafluor software, Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA). Changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> were deduced from variations in the F340/F380 ratio after correction for background and dark currents. Data were averaged with *n* representing the number of fields.

### **INS-1 cells treatment for electrophysiological recording**

Ca<sup>2+</sup> channel currents were recorded using the whole-cell patch-clamp technique with a Biologic RK400 amplifier (Biologic, France). Data acquisition and analysis were performed using the pCLAMP system (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Currents were recorded with patch pipettes of 2–5 MΩ. Capacitive transients were electronically compensated for. Residual capacitive transient and linear leakage currents were subtracted using a 4 sub-pulse protocol. The extracellular solution contained: 130 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl, 5.6 mmol.L<sup>-1</sup> KCl, 1 mmol.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol.L<sup>-1</sup> glucose, 10 mmol.L<sup>-1</sup> HEPES, 5 mmol.L<sup>-1</sup> BaCl<sub>2</sub>, adjusted to pH 7.4 with NaOH. The pipette solution contained: 130mmol.L<sup>-1</sup> CsCl, 10 mmol.L<sup>-1</sup> EGTA, 5 mmol.L<sup>-1</sup> ATPNa<sub>2</sub>, 2 mmol.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol.L<sup>-1</sup> HEPES, adjusted to pH 7.3 with CsOH. The holding potential (HP) was set at -80 mV, and depolarizing test pulses were applied as described. Drugs were applied to cells by pressure ejection from a glass pipette. All experiments were performed at room temperature.

### **Data and Statistical analyses**

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Calculations of areas under the curve (AUC) and statistical analysis was performed using GraphPad Prism v6 software. Depending on the design of the experiment, data were analyzed with two-tailed unpaired t test, one-way ANOVA or two-way ANOVA only when there was no significant variance inhomogeneity. ANOVAs were further investigated with comparison analysis of data using the uncorrected Fisher's LSD test only if F achieves the necessary level of statistical significance. The limit of statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Effects of urolithins A, B, C and D on insulin secretion in INS-1 cells

#### *Effects of urolithins A, B, C and D on basal and glucose-induced insulin secretion*

We first evaluate the effects of urolithins A, B, C and D (**Figure 1**) in rat  $\beta$ -cell-derived INS-1 cells since we and others have reported that INS-1 cell line recapitulates several *in vivo* effects of polyphenols (Kittl et al., 2016; Vetterli et al., 2011; Youl et al., 2010) and since this cell line is widely used to study  $\beta$ -cell function (Guo et al., 2017; Kwak et al., 2017; Pradhan et al., 2017).

Concentration-response curves of urolithin A, B, C or D (2, 5, 10 and 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) on insulin secretion were carried out in INS-1 cells under basal (1.4  $\text{mmol.L}^{-1}$  glucose) or stimulated (8.3  $\text{mmol.L}^{-1}$  glucose) conditions (**Figure 2**). As illustrated, urolithins differently modulate basal and glucose-induced insulin secretion. Under basal condition, we found that the highest concentration of urolithin B and urolithin C (20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) only slightly increased insulin secretion (**Figure 2B and 2C**) whereas urolithin A and urolithin D had no effect at either concentration tested (**Figure 2A and 2D**). Glucose (8.3  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) provoked a 3.3-fold increase in insulin secretion (from 28.5  $\pm$  1.4  $\text{ng.ml}^{-1}$  to 94.2  $\pm$  6.2  $\text{ng.ml}^{-1}$ ; n=5; p<0.05). Interestingly, at the highest concentration tested (20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), urolithin A, B, C and D increased glucose-induced insulin secretion up to 1.6-, 1.4-, 2-, 1.6-fold respectively. Urolithin C was particularly active as it amplified glucose-induced insulin secretion from 94.2  $\pm$  6.2  $\text{ng.ml}^{-1}$  to 203.2  $\pm$  31.9  $\text{ng.ml}^{-1}$ ; n=5; p<0.05 (**Figure 2C**).

Our data also indicated that the lowest stimulating concentration of urolithins A, C and D was 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (**Figures 2A, 2C and 2D**), while urolithin B was less potent since it was not active at a concentration lower than 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (**Figure 2B**). Ellagic acid, the precursor of urolithins, was devoid of any effect in both basal and stimulated conditions (data not shown).

#### *Effects of urolithins A, B, C and D on insulin secretion induced by glibenclamide or exendin-4*

Next, various concentrations of urolithin A, B, C or D (2, 5, 10 and 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) were tested in the presence of 1.4  $\text{mmol.L}^{-1}$  glucose + 10  $\text{nmol.L}^{-1}$  glibenclamide (sulfonyurea) or in the presence of 8.3  $\text{mmol.L}^{-1}$  glucose + 1  $\text{nmol.L}^{-1}$  exendin-4 (GLP-1 analog) (**Figure 3**).

As expected, glibenclamide induced a 3.2-fold increase in basal insulin secretion (from 17.6  $\pm$  1.7  $\text{ng.ml}^{-1}$  to 56.8  $\pm$  6.9  $\text{ng.ml}^{-1}$ ; n=5; p<0.05) and exendin-4 promoted a 1.9- fold potentiation of glucose-induced insulin secretion (from 66.22  $\pm$  6.8  $\text{ng.ml}^{-1}$  to 128.9  $\pm$  17.2  $\text{ng.ml}^{-1}$ ; n=5; p<0.05) (data not shown).

As depicted in **Figure 3**, we observed that urolithins A, B, C and D potentiated glibenclamide-induced insulin secretion in a concentration dependent manner. At the highest concentration tested (20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), urolithins A, B, C and D increased glibenclamide-induced insulin secretion up to 2.1-, 1.8-, 2.6-, 1.9-fold respectively (**Figure 3**). Urolithin C was particularly active, as it amplified glibenclamide-induced

insulin secretion from  $56.8 \pm 6.9 \text{ ng.ml}^{-1}$  to  $138.2 \pm 14.5 \text{ ng.ml}^{-1}$ ;  $n=5$ ;  $p<0.05$ . Noteworthy, our data also suggested that urolithin C is likely to be the more potent molecule as it displayed the minimum effective concentration ( $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) for strengthening the action of glibenclamide (Figure 3C).

In addition, we found that urolithins C and D ( $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), were able to amplify exendin-4 effect on insulin release (up to 1.8 and 1.4-fold, respectively) (Figures 3C and 3D) whereas urolithin A and B were only poorly effective (Figure 3A and 3B). Again, urolithin C appeared to be the more active compound since it amplified exendin-4- induced insulin secretion from  $128.9 \pm 17.2 \text{ ng.ml}^{-1}$  to  $229 \pm 14.1 \text{ ng.ml}^{-1}$ ;  $n=5$ ;  $p<0.05$ .

#### Effects of urolithins A, B, C and D on insulin secretion in rat pancreatic islets.

Given the effects of urolithins on insulin release in INS-1, we next tested whether these molecules could also modulate basal or glucose-induced insulin secretion, in a more physiologically-relevant cellular model. Therefore, islets of Langerhans were isolated from rat pancreas and then treated with urolithin A, B, C or D ( $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) in the presence of either a non-stimulating ( $2.8 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) or a stimulating concentration of glucose ( $8.3 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) (Figure 4). As expected, treatment of islets with  $8.3 \text{ mmol.L}^{-1}$  glucose stimulated insulin secretion (from  $1.4 \pm 0.1 \text{ ng per islet}$  to  $3.9 \pm 0.3 \text{ ng per islet}$ ;  $n=5$ ;  $p<0.05$ ).

In accordance with data collected in INS-1 cells, we found that urolithin A, B and C were also able to differently modulate insulin secretion in pancreatic islets. Specifically, we observed that these three compounds increased glucose-induced insulin secretion by 1.6-, 1.4-, 1.4-fold, respectively (from  $3.9 \pm 0.3$  to  $6.2 \pm 0.6 \text{ ng per islet}$  for urolithin A; to  $5.4 \pm 0.4 \text{ ng per islet}$  for urolithin B, and to  $5.3 \pm 0.3 \text{ ng per islet}$  for urolithin C;  $n=5$ ;  $p<0.05$ ), while urolithin D was ineffective in those experimental conditions. Noteworthy, urolithin B also increased insulin secretion under basal glucose condition (about 1.7-fold), from  $1.4 \pm 0.1 \text{ ng.ml}^{-1}$  to  $2.4 \pm 0.2 \text{ ng.ml}^{-1}$ ;  $n=5$ ;  $p<0.05$ . Thus, our data also suggested that urolithin C and urolithin A modulate insulin secretion in a glucose-dependent manner.

#### Effects of urolithins A, B, C and D in glucotoxicity-induced dysfunctional INS-1 cells

$\beta$ -cell dysfunction was induced by culturing INS-1 cells in  $25 \text{ mM}$  glucose for 48 hours (Figure 5). In these conditions of glucotoxicity, insulin secretion was almost abolished when INS-1 cells were challenged with  $8.3 \text{ mM}$  of glucose ( $3.1 \pm 2.6\%$  of control;  $n=5$ ;  $p<0.05$ ). As shown in figure 5A, urolithin A and urolithin C ( $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) retained some stimulating activity of insulin secretion ( $25.9 \pm 2.1\%$  of control;  $n=5$ ;  $p<0.05$  and  $32.8 \pm 3.5\%$  of control;  $n=5$ ;  $p<0.05$  for urolithin A and urolithin C, respectively), whereas urolithin D was less active and urolithin B was ineffective ( $16.9 \pm 3.1\%$  of control;  $n=5$ ;  $p<0.05$  and  $2.5 \pm 2.7\%$  of control;  $n=5$ ;  $p<0.05$  for urolithin D and urolithin B, respectively). When tested in the same experimental conditions, exendin-4 ( $1 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) also retained

some stimulating activity (16.9 +/- 2.4 % of control; n=5; p<0.05) while glibenclamide (10 nmol.L<sup>-1</sup>) was totally ineffective (0.1 +/- 2.4 % of control; n=5; p<0.05) (Figure 5B).

In summary, these data indicate that urolithin C and urolithin A were able to induce insulin secretion in INS-1 cells that had been rendered unresponsive to glucose by glucotoxic insult.

As data gathered from INS-1 cells and pancreatic islets pointed out the urolithin C as the most promising and valuable compound for its capacity to improve  $\beta$ -cell function under both normal and dysfunctional conditions, the insulin secreting capacity of urolithin C was further characterized in a physiological model (the rat isolated pancreas preparation) and its capacity to modulate calcium exchange was explored at the cellular level.

#### Effects of urolithin C on insulin secretion in rat isolated perfused pancreas.

In a first set of experiments, insulin secretion of isolated pancreas was stabilized under a moderately stimulating concentration of glucose (8.3 mmol.L<sup>-1</sup>), then perfused with 20  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> urolithin C. As illustrated, urolithin C enhanced glucose-induced insulin secretion (Figure 6A). The stimulatory effect of urolithin C occurred very rapidly, as insulin secretion peaked within minutes and was sustained throughout the 30-minute perfusion following urolithin C infusion. The areas under the curves corresponding to insulin secretion during the 30-min perfusion period (from 17 to 47 min) in the absence or presence of 20  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> urolithin C were 3127.3  $\pm$  466 ng, (n=5), and 5982.2  $\pm$  1045.6 ng, (n=4), respectively (p<0.05).

Urolithin C (20  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>) was also perfused under 5 mmol.L<sup>-1</sup> glucose and did not induce insulin secretion (Figure 6B). To further explore the reversibility of the effect of urolithin C under non-stimulating (5 mM glucose) condition, the pancreas were first infused with 20  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> urolithin C in the presence of 8.3 mmol.L<sup>-1</sup> glucose for 30 min, before switching the glucose concentration down to 5 mmol.L<sup>-1</sup>, while urolithin C was maintained at 20  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>. As shown in Figure 6C, the abrupt reduction of glucose concentration overlapped with the concomitant decrease in insulin secretion, illustrating the glucose-dependency of the insulin secreting activity of urolithin C.

Altogether, these findings obtained on a physiological model indicate that urolithin C is a glucose-dependent regulator of insulin secretion.

#### Effects of urolithin C on intracellular calcium in INS-1 and dispersed cells

In order to investigate urolithin C mechanism of action and as calcium plays a central role in the induction of insulin secretion, we studied whether the potentiation of insulin secretion by urolithin C involves changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. When used on INS-1 cells, the depolarizing agent KCl (15 mmol.L<sup>-1</sup>) induced a fast and sustained [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase as illustrated by increase in F340/F380 variations of fura-2 fluorescence ratio (Figure 7A). Urolithin C (20  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>) potentiated the KCl-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise (Figure 7B) while it displayed no effect on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> under basal conditions (Figure 7C).

The same observations were made in a more physiological model. Indeed, on dispersed cells isolated from rat islets, while urolithin C ( $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) had no effect on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  under basal conditions (not illustrated), it amplified the  $15 \text{ mmol.L}^{-1}$  KCl-induced calcium increase, an effect maintained during the response to KCl (Figures 8A-C).

#### Effect of urolithin C on the L-type $\text{Ca}^{2+}$ current in INS-1 cells.

As urolithin C increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and insulin secretion, we analyzed the ability of urolithin C to modulate the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in INS-1  $\beta$ -cells. In the whole-cell configuration of patch-clamp technique, with  $\text{Ba}^{2+}$  as the charge carrier, figure 9A shows that urolithin C ( $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) increased the L-type  $\text{Ba}^{2+}$  current. This effect of urolithin C was concentration-dependent and was observed within the micromolar range with a maximal effect at  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (Figure 9B). As described before (Bardy et al., 2013), INS-1 cell expressed also rapidly inactivating T-Type  $\text{Ca}^{2+}$  current that was not stimulated by  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  urolithin C (Figure 9C). Urolithin C stimulated the L-type  $\text{Ba}^{2+}$  current at all potential as illustrated by increase of the current stimulated by a ramp depolarization (Figure 9D). Similar result was observed on a current-voltage relationship (data not shown). Normalization of the current-voltage relationship to 1 showed that the relative increase was greater at a small depolarization of  $-30$  and  $-20$  mV compared with that at a large depolarization (Figure 9E). Consequently, urolithin C shifted the potential at half-maximal activation ( $V_{0.5}$ ) of the L-type current of  $-4.5 \pm 1$  mV ( $n = 5$ ). The effect of urolithin C developed rapidly, reaching steady state within 30 s and remaining stable thereafter (Figure 9F).

## DISCUSSION

Various studies have documented the biological activity of colonic polyphenol metabolites (Espin et al 2013, Ryu D et al 2016, Tang et al 2017; Kang et al 2016; references). Urolithins are generally described as potent anti-oxidant and anti-inflammatory compounds although their effect varies depending on assay system and conditions, urolithin A being described as the most active compound in some studies and conversely the less active in others (Bialonska et al., 2009; Ishimoto et al., 2011; Piwowarski et al., 2015; Tang et al., 2017; Wang et al., 2015). However, the capacity of urolithins to modulate insulin secreting  $\beta$ -cell function has never been investigated.

In the present work, we showed that urolithins A, B, C and D differently (a) amplified on an insulin-secreting  $\beta$ -cell line or islets of Langerhans insulin secretion induced by glucose, a GLP-1 analog (exendin-4) or a sulfonylurea (glibenclamide), and (b) restored some insulin secretion in  $\beta$ -cells which have been rendered unresponsive to glucose by glucotoxicity. As urolithin C appeared globally as the most active compound, we further characterized its activity and mechanism of action. We found that urolithin C induced insulin secretion in a strictly glucose-dependent manner on the isolated pancreas preparation and demonstrated that urolithin C works by amplifying calcium influx in  $\beta$ -cells through an interaction with L-type calcium channel.

We first found in the rat  $\beta$ -cell-derived INS-1 cells that urolithins A, B, C and D differently potentiated glucose-induced insulin secretion, urolithin C appearing as the most active compound. The fact that the closely chemically related compounds urolithins had different potencies is possibly due to their slightly different structural characteristics. This could be related to distinct pharmacological capacities to modulate signaling cascades (Giménez-Bastida et al., 2012) or molecular targets, in line with the report of Giorgio et al. (Giorgio et al., 2015) indicating that urolithins C and D bind to EphA2 receptors while urolithins A and B did not. However, our results are not in accordance with publications showing comparable effects between urolithins and their parent molecule ellagic acid (Qiu et al., 2013), as ellagic acid did not modulate insulin secretion (not illustrated). We can hypothesize that the chemical structure of ellagic acid, very different from that of urolithins, does not allow any interaction with the molecular target of urolithins. In any case, these data further illustrate the importance of studying the biological activities of polyphenol metabolites present in the general circulation in addition to that of their parent molecules.

Consistently with the results obtained in INS-1 cells and islets, glucose-induced insulin release from perfused pancreas in rats was amplified by urolithin C under the same order of magnitude as in INS-1 cells (about 200%). Interestingly, urolithin C effect was reversible since insulin secretion returned to baseline levels as soon as pancreas was perfused by a non-stimulating concentration of glucose (equivalent to fasting normoglycemia), even in the presence of urolithin C. These findings further confirm that urolithin C amplifies insulin secretion in a strictly glucose-dependent manner. Although

the potentiating effect of some polyphenol metabolites has been described once in INS-1 or isolated islet (Fernández-Millán et al., 2014), the demonstration of the glucose dependency of a polyphenol metabolites on a physiological preparation such as the isolated perfused pancreas preparation had never been shown before. This is a crucial result for the possible development of any novel secretagogue for the treatment of type 2 diabetes, as hypoglycemia is a frequent and serious side-effect occurring with insulin secretion-stimulating drugs such as sulfonylureas.

Mechanistically, calcium plays a central role in the induction of insulin secretion (Mears, 2004; Yang and Berggren, 2006). We had previously shown that a polyphenol (quercetin) directly modulate L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and increase intracellular calcium in relation with insulin secretion (Bardy et al., 2013; Youl et al., 2010) while a direct activation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel had never been described for a metabolite of polyphenol. In this study, we hypothesized that urolithin C could also amplify insulin response to primary stimulants through an increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Our results obtained using  $\text{Ca}^{2+}$  imaging in both INS-1 and rat dispersed islet of Langerhans cells indicated that urolithin C did amplify depolarization-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase. In addition, we showed through patch clamp studies that urolithin C directly activates L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in INS-1 cells. Interestingly, urolithin C had no effect on the activation threshold of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, explaining why urolithin C by itself is devoid of any secreting effect in basal condition (low resting membrane potential). However, urolithin C amplified L-type current activation for levels of depolarization above this threshold (mainly for depolarization around -30 and -20 mV), explaining why urolithin C induces the amplification of glucose-induced insulin secretion *i.e.* when cells are depolarized. Future studies will aim at determining the site of interaction of urolithin C with the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel.

In addition to their capacity to increase glucose-induced insulin secretion response, we also examined the capacities of urolithins to amplify insulin secretion induced by two different classes of antidiabetic drugs, namely the sulfonylurea glibenclamide and the GLP-1 analog exendin-4. Whereas glibenclamide triggers insulin secretion in a glucose-independent manner by closing the ATP-sensitive potassium channels of pancreatic  $\beta$ -cells, which in turn induces depolarization and promotes calcium influx, exendin-4 potentiates glucose-induced insulin secretion by activating the Gs-coupled GLP-1 receptor and subsequently increasing cellular cAMP levels. We found that the various urolithins differently modulate the activity of these two insulin secretagogues, urolithin C appearing again as the most active compound for amplifying both insulinotropic drug. Since we found that urolithin C amplifies the depolarization-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase by increasing the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current, especially under small depolarization, it is tempting to speculate that this mechanism will also explain the major amplifying effect of urolithin C on insulin secretion induced by a drug (glibenclamide) inducing depolarization through the closing of ATP-sensitive potassium channel.

The inability of  $\beta$ -cells to secrete adequate amounts of insulin results in chronic hyperglycaemia, leading to an excessive oxidative stress that will further impair the pancreatic  $\beta$ -cell function observed in T2D, a phenomenon termed as glucotoxicity (Bensellam et al., 2012; Poitout and Robertson, 2008; Rehman and Akash, 2017). The present work also aimed at studying the effects of urolithins A, B, C and D on  $\beta$ -cell dysfunction induced by long-term exposure to high glucose concentration. As expected, we found that glucotoxicity totally impaired glucose-induced insulin secretion (Guo et al., 2017; Kong et al., 2014; Quinault et al., 2016). We also found that urolithin A, C and D, but not urolithin B, were able to restore some insulin secretion in cells which had been rendered unresponsive to glucose, urolithin C appearing again as the most active compound. In the same conditions, the sulfonylurea glibenclamide had no effect, while the GLP-1 analog exendin-4 retained some stimulating effects. These data suggest that, like exendin-4, urolithin C is able to restore some glucose-induced insulin secretion in cells rendered unresponsive to glucose by glucotoxicity.

Glucotoxicity was described in pancreatic  $\beta$ -cells as an inducer of oxidative stress, inflammation and endoplasmic reticulum (ER) stress (Broca et al., 2014), explaining the major impairment of glucose-induced insulin secretion. In addition, it was previously shown that long-term exposure of rat insulinoma cells (INS-1) or primary isolated rat islet cells to elevated glucose increased the basal calcium and decreased the mRNA expression of the channels involved with insulin secretion, leading to diminished level of stimulated calcium influx (Taylor et al., 2005). The complete lack of effect of glibenclamide, a depolarizing agent and indirect opener of calcium channels, may be explained by a diminished expression of calcium channels, while the restoration of some insulin secretion by urolithins C may be linked to its sensitizing effect on the remaining  $\text{Ca}^{2+}$  channels, as suggested by the data described in the current paper.

In summary, we found that the ellagic acid colonic metabolites urolithins, and notably urolithin C, were able to induce insulin secretion in a glucose-dependent manner, even in cells that have rendered unresponsive to glucose by glucotoxicity, the mechanism of urolithin C being related with the amplification of the  $\beta$ -cells L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel opening.

The *in vivo* antidiabetic potential of urolithin C remains to be further explored.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Structural formulas of urolithins A, B, C and D.**

**Figure 2: Effects of urolithins A, B, C and D on basal or glucose-induced insulin secretion in INS-1 cells.**

The effects of increasing concentrations (2-20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) of urolithin A (Figure 2A), urolithin B (Figure 2B), urolithin C (Figure 2C) and urolithin D (Figure 2D) were determined in basal (1.4  $\text{mmol.L}^{-1}$  glucose) or in stimulated condition (8.3  $\text{mmol.L}^{-1}$  of glucose). Insulin secretion was quantified by the HTRF method and data are expressed as percentages of the response obtained with 8.3  $\text{mmol.L}^{-1}$  glucose, taken as 100%. Results are presented as means  $\pm$  SEM of 4-5 separate experiments. A multiple comparison analysis of data was performed for each concentration of glucose tested. Bars with the same letter do not differ significantly ( $p>0.05$ ).

**Figure 3: Effects of urolithins A, B, C and D on insulin secretion induced by glibenclamide or exendin-4.**

The effects of increasing concentrations (2-20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) of urolithin A (Figure 3A), urolithin B (Figure 3B), urolithin C (Figure 3C) and urolithin D (Figure 3D) were determined in the presence of 1.4  $\text{mmol.L}^{-1}$  glucose + 10  $\text{nmol.L}^{-1}$  glibenclamide (orange histograms) or in the presence of 8.3  $\text{mmol.L}^{-1}$  glucose + 1  $\text{nmol.L}^{-1}$  exendin-4 (blue histograms). Insulin secretion was quantified by the HTRF method and data are expressed as percentages of the response obtained with 1.4  $\text{mmol.L}^{-1}$  glucose + 10  $\text{nmol.L}^{-1}$  glibenclamide or 8.3  $\text{mmol.L}^{-1}$  glucose + 1  $\text{nmol.L}^{-1}$  exendin-4, taken as 100%. Results are presented as means  $\pm$  SEM of 3-4 separate experiments. A multiple comparison analysis of data was performed for each experimental condition (presence of glibenclamide or exendin-4). Bars with the same letter do not differ significantly ( $p>0.05$ ).

**Figure 4: Effects of urolithins A, B, C and D on basal or glucose-induced insulin secretion in rat pancreatic islets.**

Islets were incubated in the absence (CT) or presence of 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  urolithin A (URO-A), urolithin B (URO-B), urolithin C (URO-C) or urolithin D (URO-D), in the presence of glucose used at the concentrations indicated. Insulin secretion was quantified by the HTRF method and data are expressed in  $\text{ng / mL / islet / h}$ . Means  $\pm$  SEM from 5 separate experiments are presented. A multiple comparison analysis of data was performed for each concentration of glucose tested. Bars with the same letter do not differ significantly ( $p>0.05$ ).

**Figure 5: Effects of urolithins A, B, C and D on insulin secretion in dysfunctional INS-1 cells**

INS-1 cells, cultured or not (CT) in 25 mM glucose for 48 hours, were incubated in the presence of glucose (8.3  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) and in the absence (GTox) or presence of 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  urolithin A (URO-A),

urolithin B (URO-B), urolithin C (URO-C) or urolithin D (URO-D) (Fig.5A). INS-1 cells, cultured or not (CT) in 25 mM glucose for 48 hours, were incubated in the presence of glucose (8.3 mmol.L<sup>-1</sup>) and in the absence (GTox) or presence of 1 nmol.L<sup>-1</sup> exendin-4 (Ex-4) or 10 nmol.L<sup>-1</sup> glibenclamide (Glib) (Figure 5B). Insulin secretion was quantified by the HTRF method and data are expressed as percentages of the response obtained with 8.3 mmol.L<sup>-1</sup> glucose, taken as 100%. Results are presented as means ± SEM of 5 separate experiments. A multiple comparison analysis of data was performed. Bars with the same letter do not differ significantly (p>0.05).

**Figure 6: Effects of urolithin C on insulin secretion in rat isolated perfused pancreas.**

Pancreas was perfused with glucose (8.3 mmol.L<sup>-1</sup>) during the equilibration period, then with 8.3 mmol.L<sup>-1</sup> glucose + 20 µmol.L<sup>-1</sup> urolithin C (URO-C) or vehicle for 30 min during the incubation period (Figure 6A). Insert in figure 6A depicted the area under the curve (AUC) showing evolution on insulin concentration as a function of time.

Pancreas was perfused with glucose (5 mmol.L<sup>-1</sup>) during the equilibration period, then with 5 mmol.L<sup>-1</sup> glucose + 20 µmol.L<sup>-1</sup> urolithin C (URO-C) for 25 min during the incubation period (Figure 6B).

Pancreas was perfused with glucose (8.3 mmol.L<sup>-1</sup>) during the equilibration period, with 8.3 mmol.L<sup>-1</sup> glucose + 20 µmol.L<sup>-1</sup> urolithin C (URO-C) for 30 min and then with 5 mmol.L<sup>-1</sup> glucose + 20 µmol.L<sup>-1</sup> urolithin C (URO-C) for 20 min (Figure 6C). Insert in figure 6C depicted the area under the curve (AUC) showing evolution on insulin concentration as a function of time. Results are presented as mean ± SEM of 4-5 separate experiments. A multiple comparison analysis of data was performed (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

**Figure 7: Effects of urolithin C on depolarisation-induced rise in intracellular calcium in INS-1 cells.**

The intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) was measured using the ratiometric fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator Fura-2AM. Typical recording of the rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (fluorescence ratio F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub>) after addition of 15 mmol.L<sup>-1</sup> KCl either under basal KRB condition (Figure 7A) or after a 15 minutes pre-incubation period with urolithin C 20 µmol.L<sup>-1</sup> (URO-C) (Figure 7B) is shown. Figure 7C depicted the typical recording of the rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (fluorescence ratio F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub>) after addition of 20 µmol.L<sup>-1</sup> urolithin C under basal KRB condition.

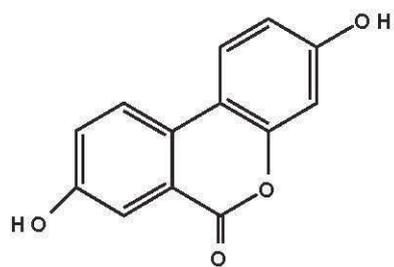
**Figure 8: Effects of urolithin C on depolarisation-induced rise in intracellular calcium in rat isolated pancreatic β cells**

The intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) was measured using the ratiometric fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator Fura-2AM. Typical recording of the rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (fluorescence ratio F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub>) after addition of 15 mmol.L<sup>-1</sup> KCl either under basal KRB condition (Figure 8A) or after a 15 minutes pre-incubation

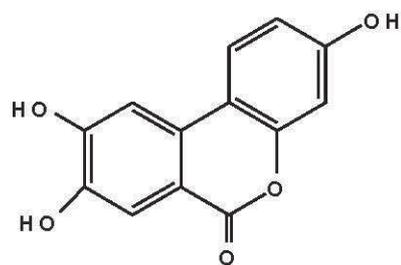
period with urolithin C  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (URO-C) (Figure 8B) is shown. Bar graph representing the maximal variation in the fluorescence ratio induced by  $15 \text{ mmol.L}^{-1}$  KCl in the absence or presence of  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  urolithin C (Figure 8C). Results are presented as means  $\pm$  SEM of four separate experiments. (\*\*) indicates a statistically significant difference ( $p < 0.01$ ) (Figure 8C).

**Figure 9: Effects of urolithin C on low and high-voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents carried by  $\text{Ba}^{2+}$  in INS-1 cells.**

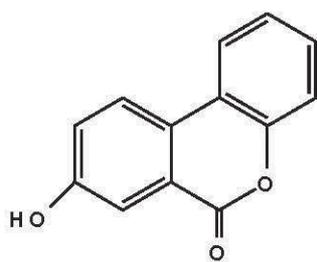
Urolithin C stimulated L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents carried by  $\text{Ba}^{2+}$  in INS-1 cells. (A) Typical traces of slow inactivated L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in the absence (CT) or presence of  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  urolithin C (holding potential  $-80 \text{ mV}$ , step depolarization  $-10 \text{ mV}$ ). (B) Concentration–response bar graph for the effects of urolithin C on the L-type current recorded at  $-10 \text{ mV}$ . (C) Absence of effect of urolithin C ( $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) on typical T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current (holding potential  $-80 \text{ mV}$ , step depolarization at  $-35 \text{ mV}$ ). (D) Typical traces of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current stimulated by a ramp depolarization ( $-80 \text{ mV}$  up to  $60 \text{ mV}$ ) in the absence or presence of  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  urolithin C (holding potential  $-80 \text{ mV}$ ). (E) Effect of urolithin C ( $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) on the current-to-voltage ( $I/V$ ) relationship of L-type current. The both curves were normalized to 1 to highlight that the stimulating effect of urolithin C is more obvious for small depolarization (left of the curve) (holding potential  $-80 \text{ mV}$ , depolarization steps in  $10 \text{ mV}$  increments at  $0.1 \text{ Hz}$  from  $-80$  to  $40 \text{ mV}$ ). (F) Time course of the effect of  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  urolithin C on L-type  $\text{Ba}^{2+}$  current (same condition as in A, frequency of stimulation  $0.1 \text{ Hz}$ ). Data points indicate means  $\pm$  SEM ( $n = 5$  cells).



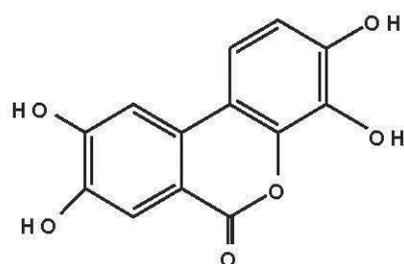
**Urolithin A**



**Urolithin C**



**Urolithin B**



**Urolithin D**

**Fig. 1**

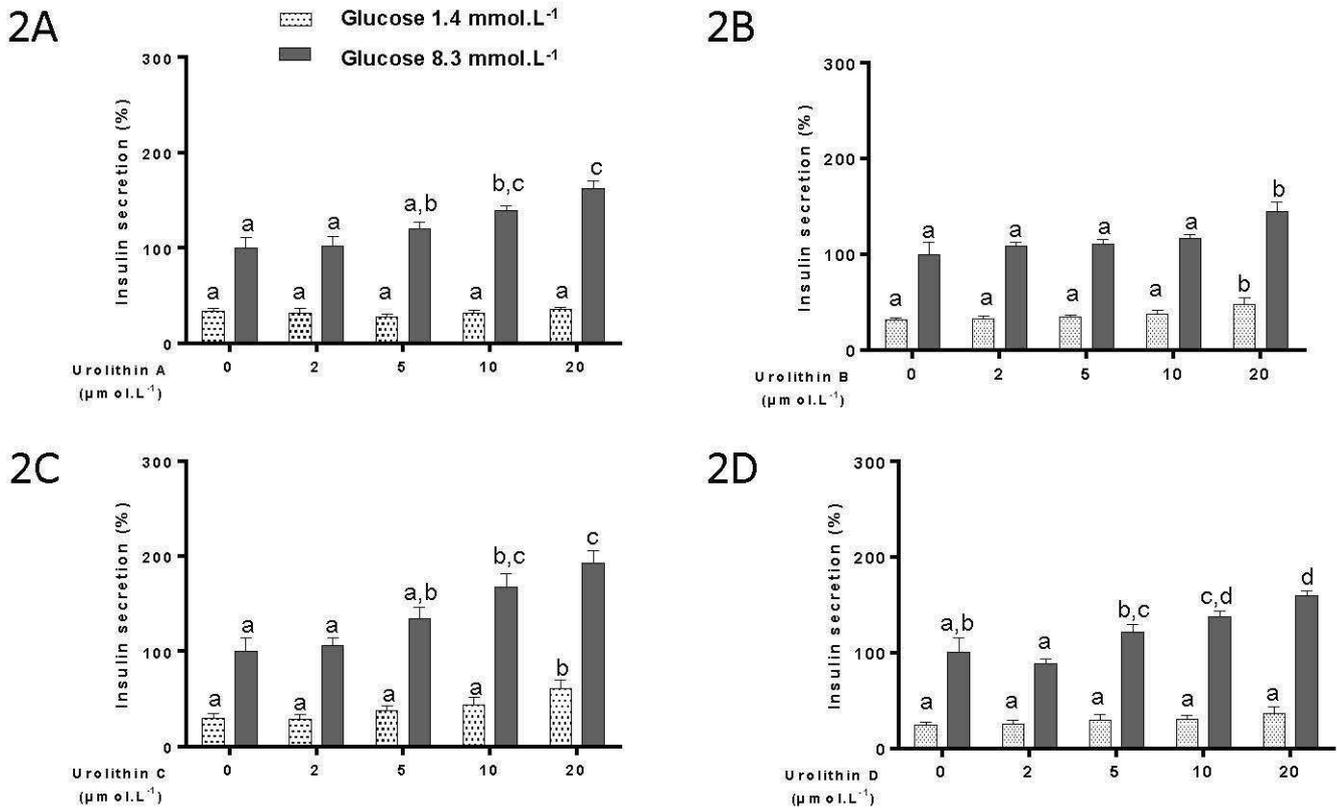
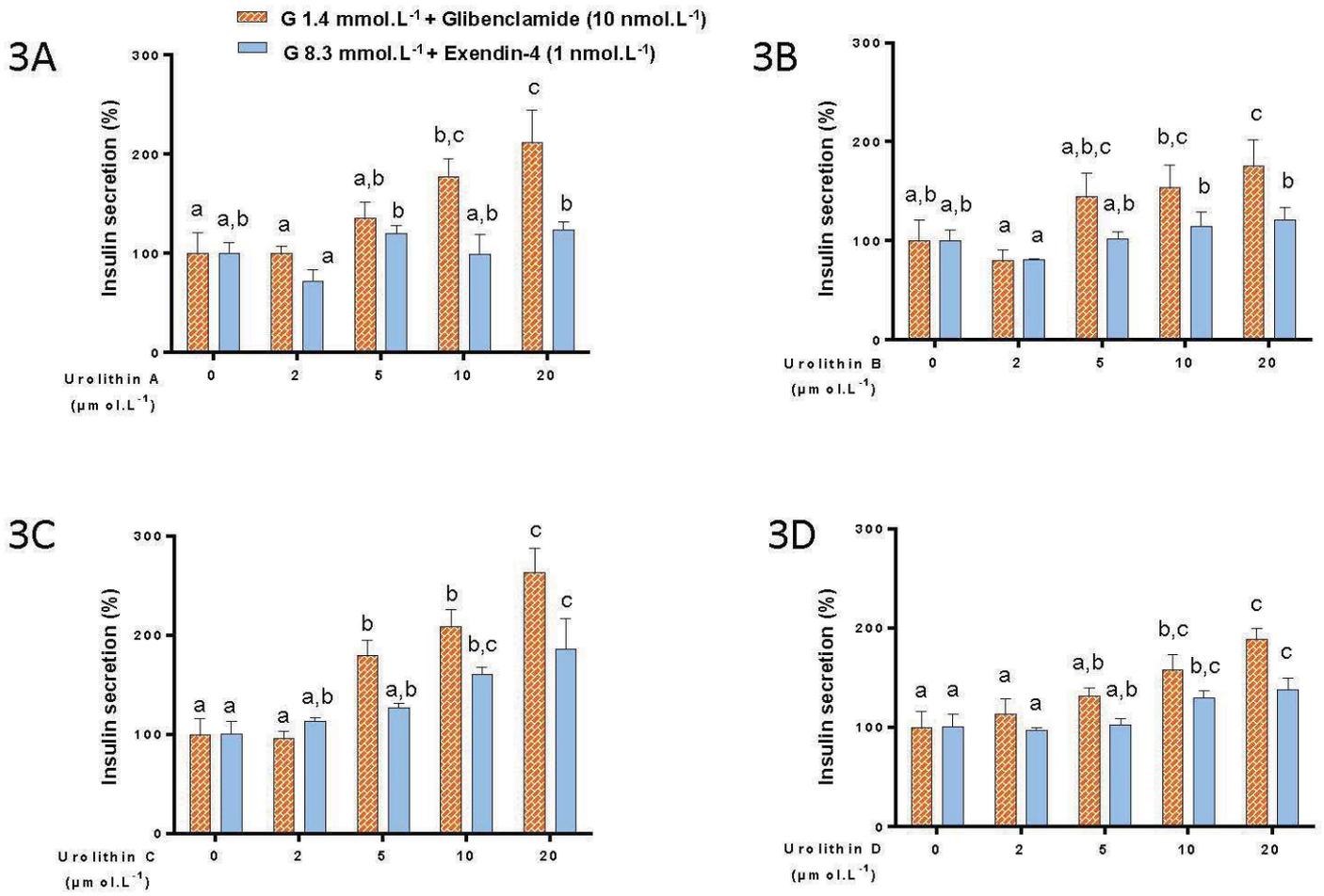


Fig. 2



**Fig. 3**

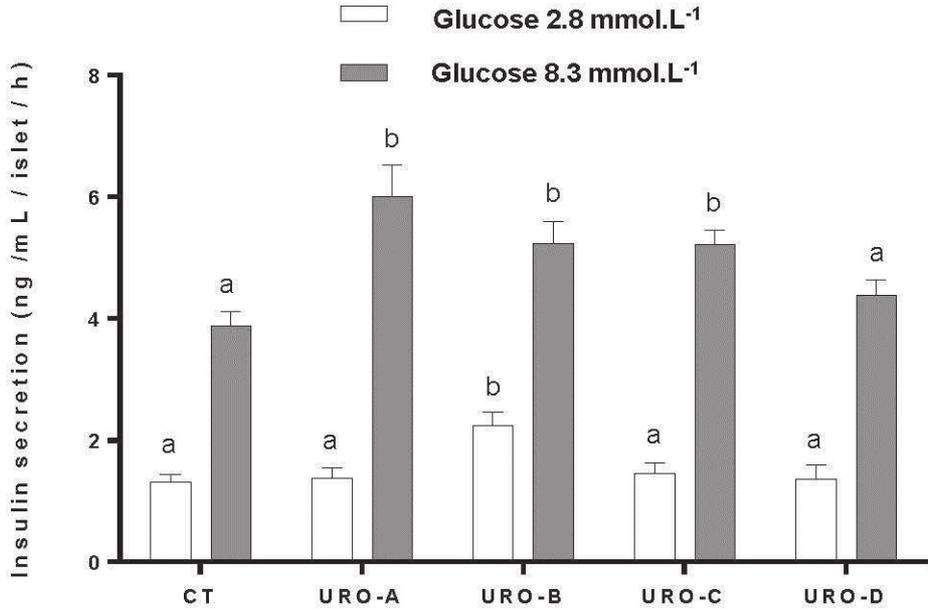


Fig. 4

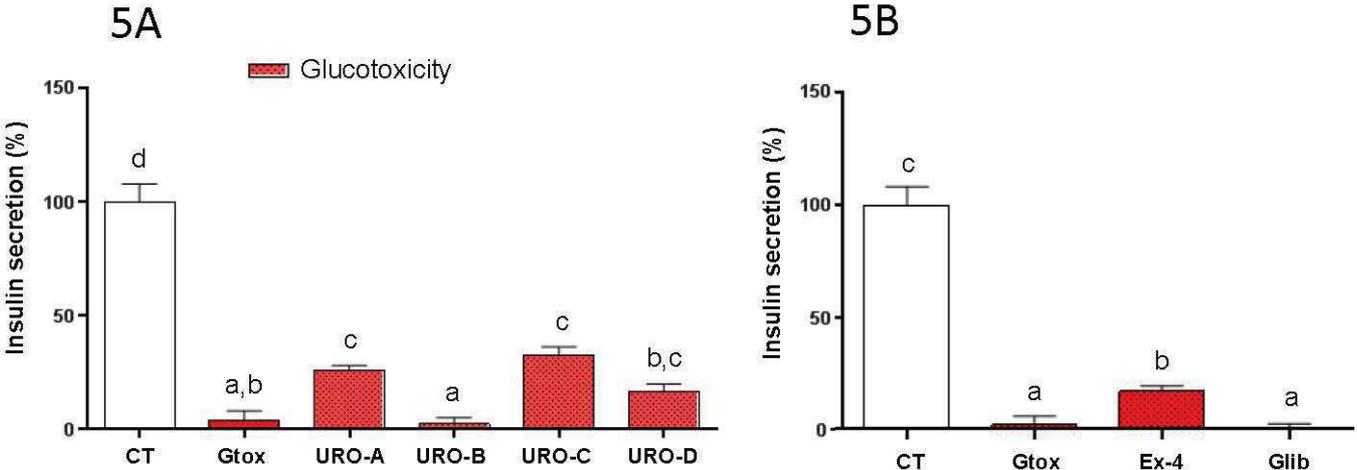


Fig. 5

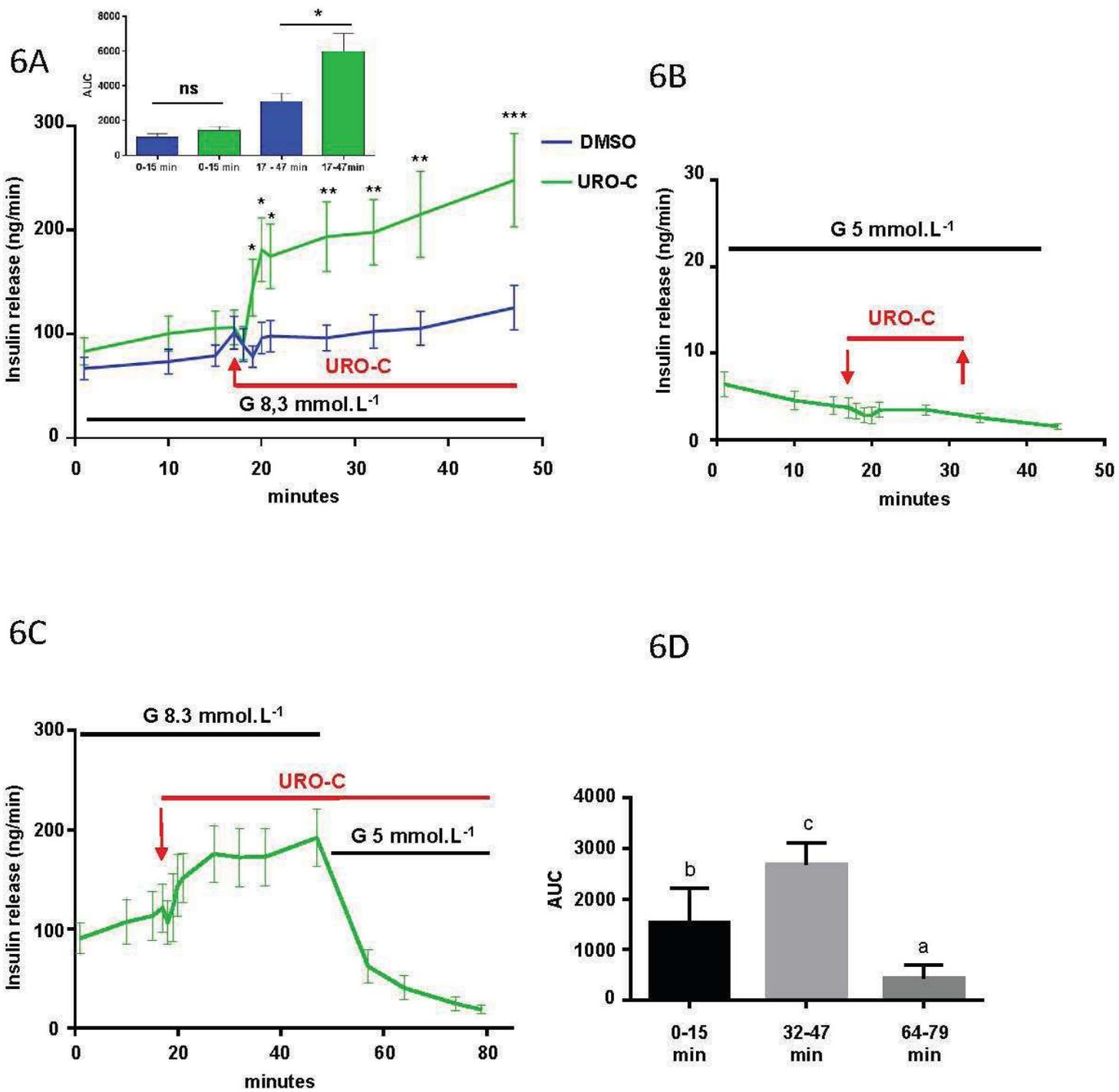


Fig. 6

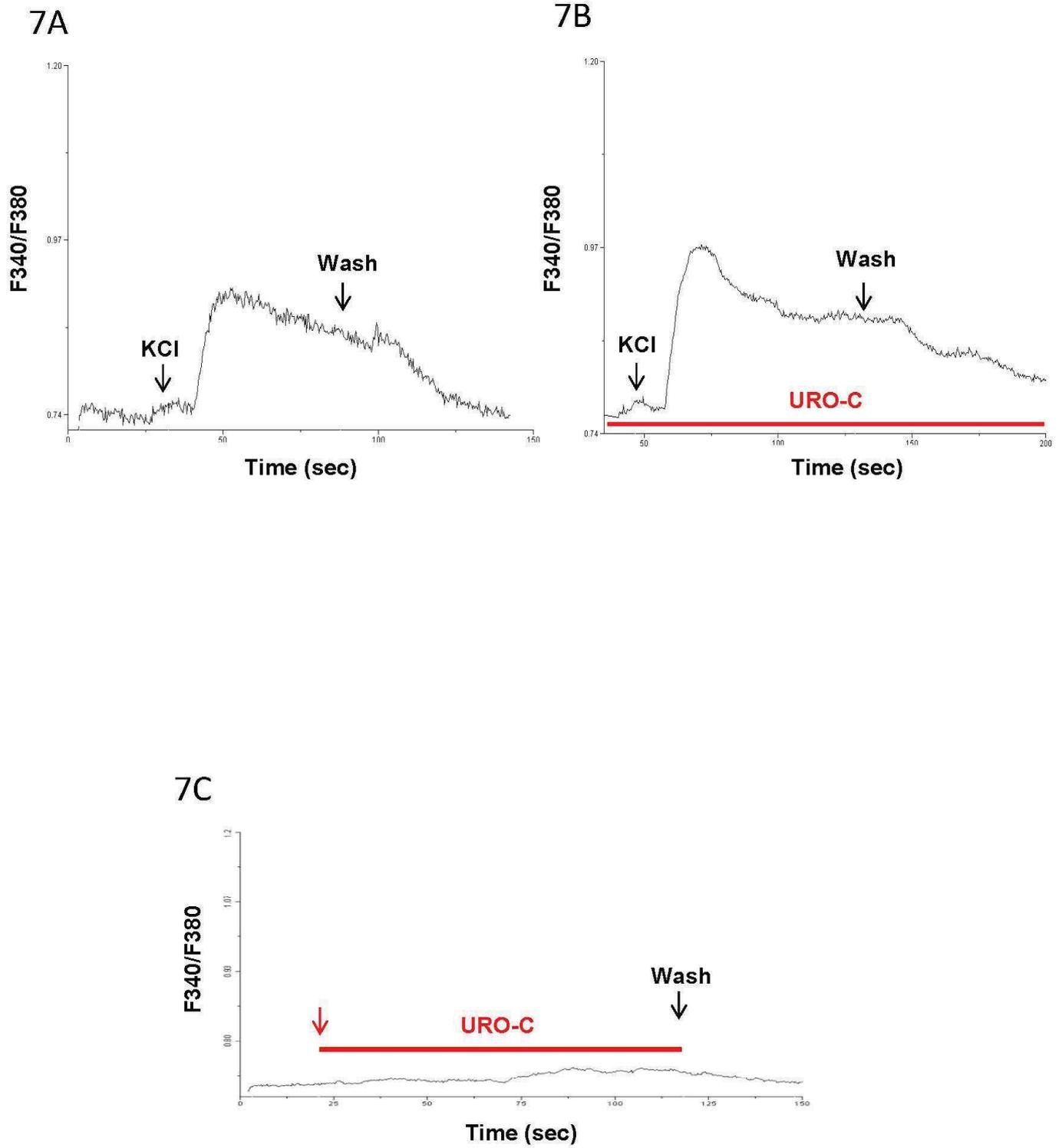


Fig. 7

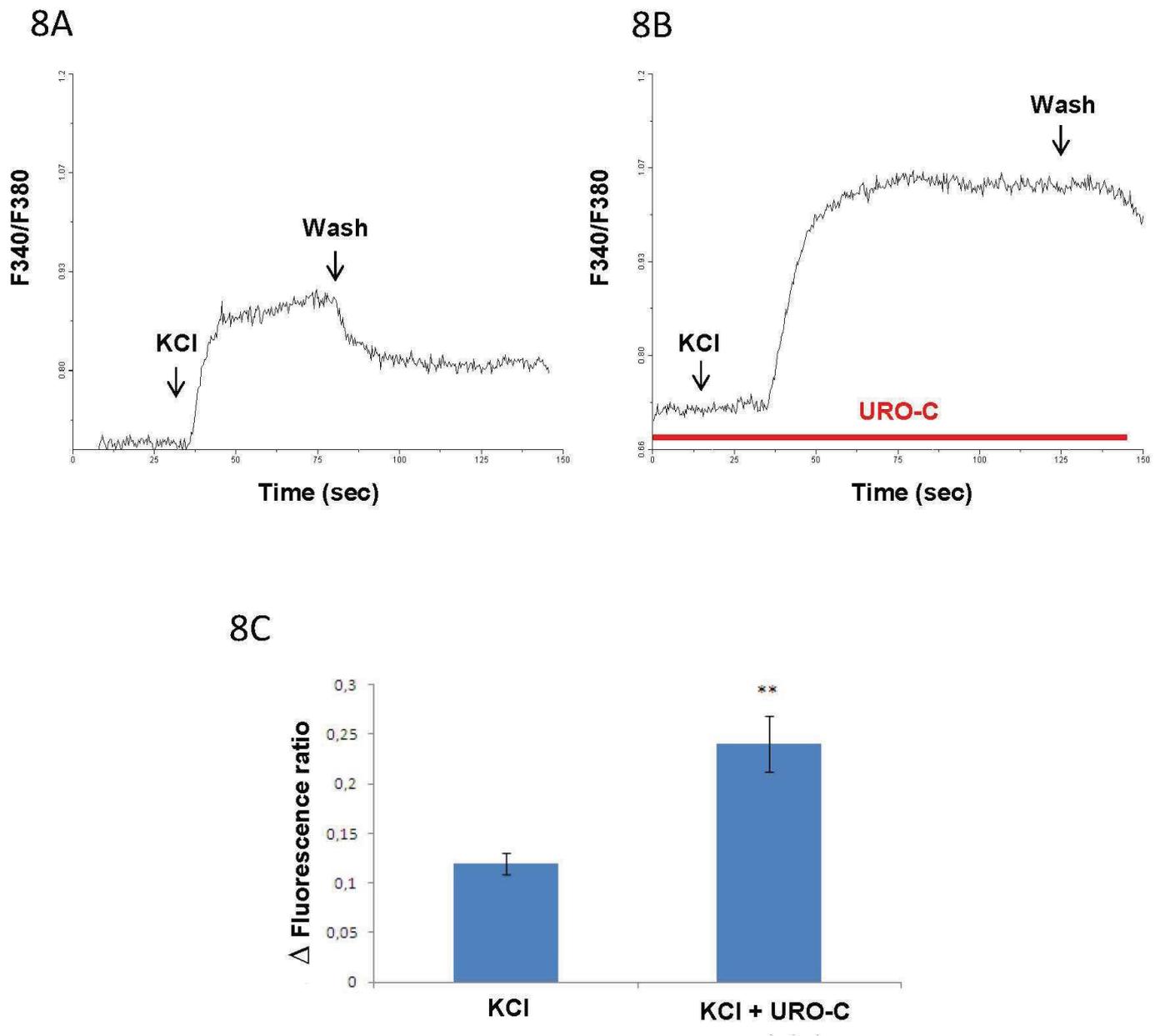
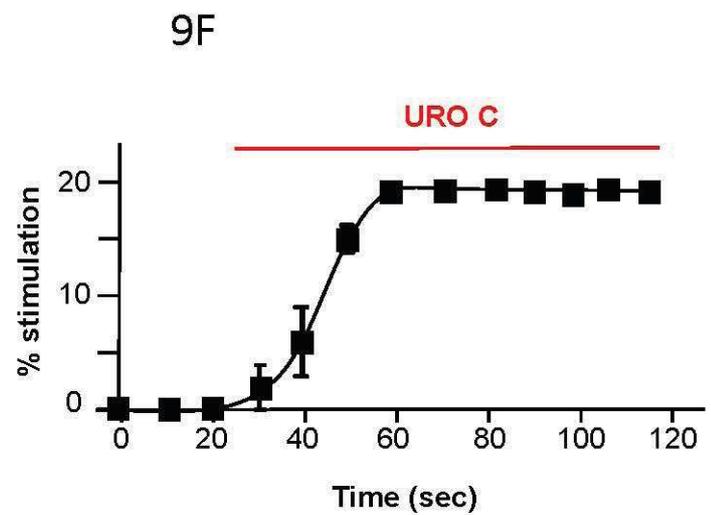
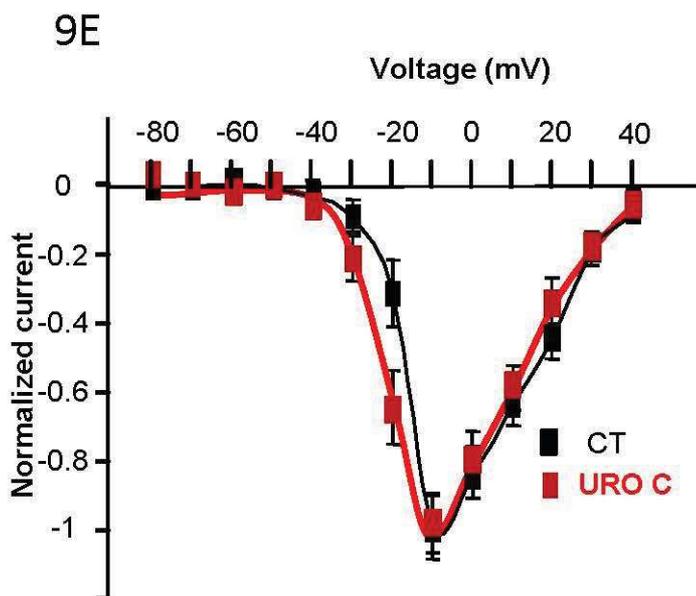
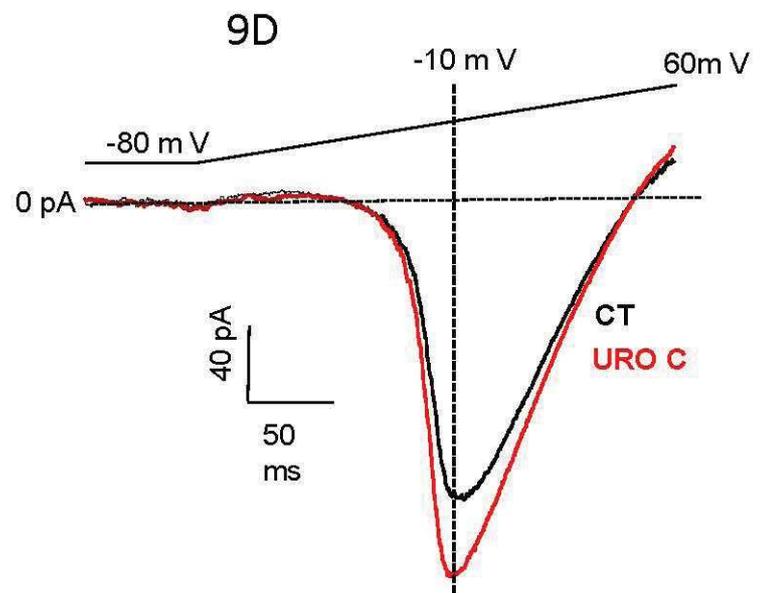
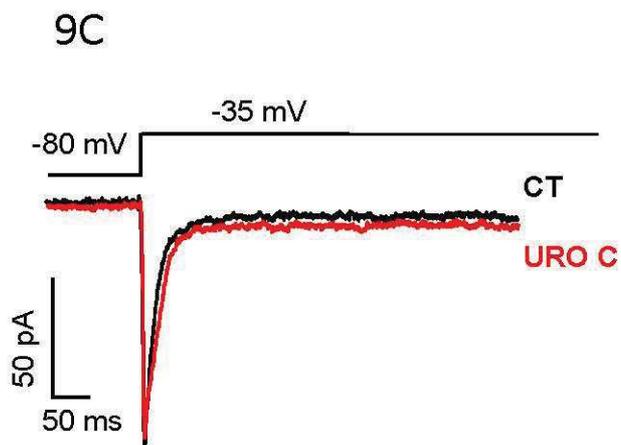
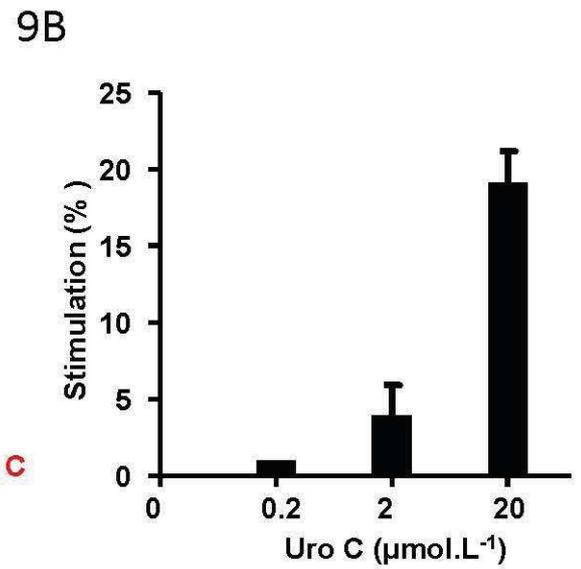
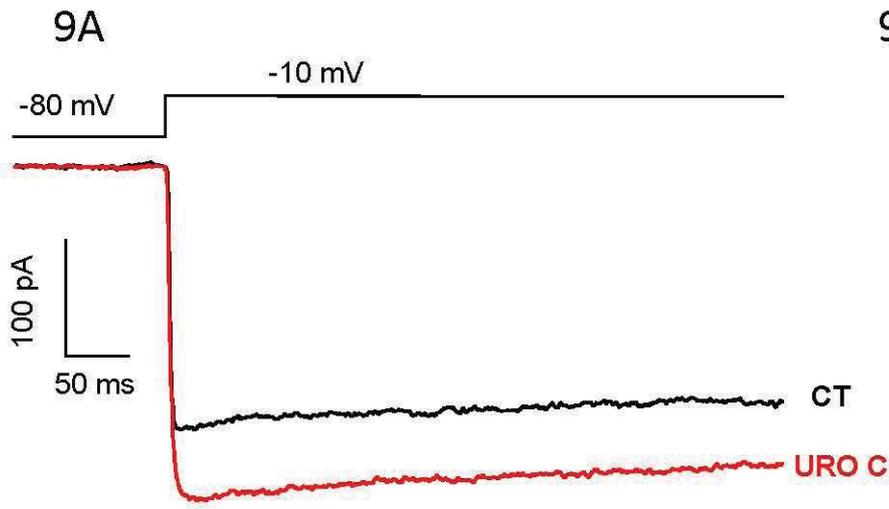


Fig. 8



Adams, L.S., Zhang, Y., Seeram, N.P., Heber, D., and Chen, S. (2010). Pomegranate Ellagitannin-Derived Compounds Exhibit Antiproliferative and Antiaromatase Activity in Breast Cancer Cells In vitro. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* 3, 108–113.

Anhê, F.F., Roy, D., Pilon, G., Dudonné, S., Matamoros, S., Varin, T.V., Garofalo, C., Moine, Q., Desjardins, Y., Levy, E., et al. (2015a). A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* 64, 872–883.

Anhê, F.F., Varin, T.V., Le Barz, M., Desjardins, Y., Levy, E., Roy, D., and Marette, A. (2015b). Gut Microbiota Dysbiosis in Obesity-Linked Metabolic Diseases and Prebiotic Potential of Polyphenol-Rich Extracts. *Curr. Obes. Rep.* 4, 389–400.

Bardy, G., Virsolvy, A., Quignard, J.F., Ravier, M.A., Bertrand, G., Dalle, S., Cros, G., Magous, R., Richard, S., and Oiry, C. (2013). Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells: Quercetin increases L-type Ca currents in beta cells. *Br. J. Pharmacol.* 169, 1102–1113.

Bensellam, M., Laybutt, D.R., and Jonas, J.-C. (2012). The molecular mechanisms of pancreatic  $\beta$ -cell glucotoxicity: Recent findings and future research directions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 364, 1–27.

Bialonska, D., Kasimsetty, S.G., Khan, S.I., and Ferreira, D. (2009). Urolithins, Intestinal Microbial Metabolites of Pomegranate Ellagitannins, Exhibit Potent Antioxidant Activity in a Cell-Based Assay. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10181–10186.

Broca, C., Varin, E., Armanet, M., Turrel-Cuzin, C., Bosco, D., Dalle, S., and Wojtusciszyn, A. (2014). Proteasome dysfunction mediates high glucose-induced apoptosis in rodent beta cells and human islets. *PLoS One* 9, e92066.

Côté, C.D., Rasmussen, B.A., Duca, F.A., Zadeh-Tahmasebi, M., Baur, J.A., Daljeet, M., Breen, D.M., Filippi, B.M., and Lam, T.K.T. (2015). Resveratrol activates duodenal Sirt1 to reverse insulin resistance in rats through a neuronal network. *Nat. Med.* 21, 498–505.

Del Rio, D., Costa, L.G., Lean, M.E.J., and Crozier, A. (2010). Polyphenols and health: What compounds are involved? *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 20, 1–6.

Espín, J.C., Larrosa, M., García-Conesa, M.T., and Tomás-Barberán, F. (2013). Biological Significance of Urolithins, the Gut Microbial Ellagic Acid-Derived Metabolites: The Evidence So Far. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013, 1–15.

Fernández-Millán, E., Ramos, S., Alvarez, C., Bravo, L., Goya, L., and Martín, M.Á. (2014). Microbial phenolic metabolites improve glucose-stimulated insulin secretion and protect pancreatic beta cells against tert-butyl hydroperoxide-induced toxicity via ERKs and PKC pathways. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 66, 245–253.

Giménez-Bastida, J.A., Larrosa, M., González-Sarrias, A., Tomás-Barberán, F., Espín, J.C., and García-Conesa, M.-T. (2012). Intestinal Ellagitannin Metabolites Ameliorate Cytokine-Induced Inflammation and Associated Molecular Markers in Human Colon Fibroblasts. *J. Agric. Food Chem.* 60, 8866–8876.

Giorgio, C., Mena, P., Del Rio, D., Brighenti, F., Barocelli, E., Hassan-Mohamed, I., Callegari, D., Lodola, A., and Tognolini, M. (2015). The ellagitannin colonic metabolite urolithin D selectively inhibits EphA2 phosphorylation in prostate cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 2155–2167.

- González-Sarrías, A., Giménez-Bastida, J.A., Núñez-Sánchez, M.Á., Larrosa, M., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F.A., and Espín, J.C. (2014). Phase-II metabolism limits the antiproliferative activity of urolithins in human colon cancer cells. *Eur. J. Nutr.* *53*, 853–864.
- Guo, L.X., Liu, J.H., Zheng, X.X., Yin, Z.Y., Kosaraju, J., and Tam, K.Y. (2017). Geniposide improves insulin production and reduces apoptosis in high glucose-induced glucotoxic insulinoma cells. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.*
- Gysembergh, A., Lemaire, S., Piot, C., Sportouch, C., Richard, S., Kloner, R.A., and Przyklenk, K. (1999). Pharmacological manipulation of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> signaling mimics preconditioning in rabbit heart. *Am. J. Physiol.* *277*, H2458-2469.
- Ishimoto, H., Shibata, M., Myojin, Y., Ito, H., Sugimoto, Y., Tai, A., and Hatano, T. (2011). In vivo anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *21*, 5901–5904.
- Johanningsmeier, S.D., and Harris, G.K. (2011). Pomegranate as a Functional Food and Nutraceutical Source. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* *2*, 181–201.
- Kang, I., Buckner, T., Shay, N.F., Gu, L., and Chung, S. (2016). Improvements in Metabolic Health with Consumption of Ellagic Acid and Subsequent Conversion into Urolithins: Evidence and Mechanisms. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* *7*, 961–972.
- Kasimsetty, S.G., Bialonska, D., Reddy, M.K., Ma, G., Khan, S.I., and Ferreira, D. (2010). Colon Cancer Chemopreventive Activities of Pomegranate Ellagitannins and Urolithins. *J. Agric. Food Chem.* *58*, 2180–2187.
- Kittl, M., Beyreis, M., Tumurkhuu, M., Fürst, J., Helm, K., Pitschmann, A., Gaisberger, M., Glasl, S., Ritter, M., and Jakab, M. (2016). Quercetin Stimulates Insulin Secretion and Reduces the Viability of Rat INS-1 Beta-Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* *39*, 278–293.
- Kong, X., Yan, D., Sun, J., Wu, X., Mulder, H., Hua, X., and Ma, X. (2014). Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin secretion via inhibiting RhoA/ROCK signaling and disassembling glucotoxicity-induced stress fibers. *Endocrinology* *155*, 4676–4685.
- Kwak, H.J., Yang, D., Hwang, Y., Jun, H.-S., and Cheon, H.G. (2017). Baicalein protects rat insulinoma INS-1 cells from palmitate-induced lipotoxicity by inducing HO-1. *PloS One* *12*, e0176432.
- Loubatières, A., Mariani, M.M., Ribes, G. de, De Malbosc, H., and Chapal, J. (1969). Etude expérimentale d'un nouveau sulfamide hypoglycémiant particulièrement actif, le HB 419 ou glibenclamide. *Diabetologia* *5*, 1–10.
- Martel, J., Ojcius, D.M., Chang, C.-J., Lin, C.-S., Lu, C.-C., Ko, Y.-F., Tseng, S.-F., Lai, H.-C., and Young, J.D. (2016). Anti-obesogenic and antidiabetic effects of plants and mushrooms. *Nat. Rev. Endocrinol.*
- Mears, D. (2004). Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca<sup>2+</sup>channels. *J. Membr. Biol.* *200*, 57–66.
- Paquette, M., Medina Larqué, A.S., Weisnagel, S.J., Desjardins, Y., Marois, J., Pilon, G., Dudonné, S., Marette, A., and Jacques, H. (2017). Strawberry and cranberry polyphenols improve insulin sensitivity in insulin-resistant, non-diabetic adults: a parallel, double-blind, controlled and randomised clinical trial. *Br. J. Nutr.* *117*, 519–531.

- Piwowarski, J.P., Kiss, A.K., Granica, S., and Moeslinger, T. (2015). Urolithins, gut microbiota-derived metabolites of ellagitannins, inhibit LPS-induced inflammation in RAW 264.7 murine macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 2168–2177.
- Poitout, V., and Robertson, R.P. (2008). Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr. Rev.* 29, 351–366.
- Pradhan, G., Wu, C.-S., Han Lee, J., Kanikarla, P., Guo, S., Yechool, V.K., Samson, S.L., and Sun, Y. (2017). Obestatin stimulates glucose-induced insulin secretion through ghrelin receptor GHS-R. *Sci. Rep.* 7, 979.
- Qiu, Z., Zhou, B., Jin, L., Yu, H., Liu, L., Liu, Y., Qin, C., Xie, S., and Zhu, F. (2013). In vitro antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 59, 428–437.
- Quinault, A., Gausseres, B., Bailbe, D., Chebbah, N., Portha, B., Movassat, J., and Turrel-Cuzin, C. (2016). Disrupted dynamics of F-actin and insulin granule fusion in INS-1 832/13 beta-cells exposed to glucotoxicity: partial restoration by glucagon-like peptide 1. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 1401–1411.
- Rehman, K., and Akash, M.S.H. (2017). Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked? *J. Cell. Biochem.*
- Ryu, D., Mouchiroud, L., Andreux, P.A., Katsyuba, E., Moullan, N., Nicolet-dit-Félix, A.A., Williams, E.G., Jha, P., Lo Sasso, G., Huzard, D., et al. (2016). Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nat. Med.* 22, 879–888.
- Tang, L., Mo, Y., Li, Y., Zhong, Y., He, S., Zhang, Y., Tang, Y., Fu, S., Wang, X., and Chen, A. (2017). Urolithin A alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486, 774–780.
- Taylor, J.T., Huang, L., Keyser, B.M., Zhuang, H., Clarkson, C.W., and Li, M. (2005). Role of high-voltage-activated calcium channels in glucose-regulated  $\beta$ -cell calcium homeostasis and insulin release. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 289, E900–E908.
- Vetterli, L., Brun, T., Giovannoni, L., Bosco, D., and Maechler, P. (2011). Resveratrol Potentiates Glucose-stimulated Insulin Secretion in INS-1E -Cells and Human Islets through a SIRT1-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 286, 6049–6060.
- Wang, Y., Qiu, Z., Zhou, B., Liu, C., Ruan, J., Yan, Q., Liao, J., and Zhu, F. (2015). In vitro antiproliferative and antioxidant effects of urolithin A, the colonic metabolite of ellagic acid, on hepatocellular carcinomas HepG2 cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 29, 1107–1115.
- Yang, S.-N., and Berggren, P.-O. (2006). The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocr. Rev.* 27, 621–676.
- Youl, E., Bardy, G., Magous, R., Cros, G., Sejalon, F., Virsolvy, A., Richard, S., Quignard, J., Gross, R., Petit, P., et al. (2010). Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway: Quercetin effects on pancreatic  $\beta$ -cells. *Br. J. Pharmacol.* 161, 799–814.

## Résumé et conclusion

Ce travail a permis de mettre en évidence que les urolithines sont capables de réguler la fonction insulino-sécrétrice des cellules  $\beta$  pancréatiques en condition physiologique et en condition de dysfonction. Dans la lignée cellulaire INS-1, toutes les urolithines potentialisent la sécrétion d'insuline induite par le glucose avec une meilleure activité pour les urolithines A et C. Dans le modèle plus physiologique des îlots de Langerhans isolés à partir de rats, nous avons montré que l'urolithine D n'est pas active (à la concentration testée). Il est important de noter que dans ce modèle cellulaire, seules les urolithines A et C amplifient la sécrétion d'insuline de façon gluco-dépendante. Il s'agit d'une propriété pharmacologique essentielle dans le cas du développement d'une molécule à visée thérapeutique permettant un contrôle glycémique précis tout en minimisant la survenue d'hypoglycémies.

Au cours de notre étude, nous avons aussi montré que les urolithines modulent de façon différentielle la sécrétion d'insuline induite par d'autres sécrétagogues que le glucose, le glibenclamide et l'exendine-4 qui sont deux composés appartenant à deux classes d'antidiabétiques. Toutes les urolithines augmentent l'effet du glibenclamide, l'urolithine C étant cependant la plus active, alors que seules les urolithines C et D amplifient l'effet de l'exendine-4. Ces résultats ouvrent la voie à l'étude des urolithines, notamment l'urolithine C, en tant que traitement complémentaire aux thérapies antidiabétiques actuelles dans le but non seulement de maximiser l'effet recherché des traitements actuels mais également de minimiser leurs effets indésirables en diminuant les posologies tout en conservant le même bénéfice thérapeutique.

Les urolithines possèdent également une activité sur des cellules INS-1 en condition de dysfonction. Les urolithines A et C sont capables également d'améliorer la fonction insulino-sécrétrice de cellules INS-1 soumises à un stress glucotoxique tandis que les urolithines B et D sont inactives.

Puisque nos travaux ont mis en exergue l'urolithine C pour sa capacité à augmenter la fonction insulino-sécrétrice en condition physiologique et en condition de dysfonction, nous avons poursuivi nos travaux en nous concentrant sur l'étude de ce métabolite.

Nous avons montré que l'urolithine C augmente la sécrétion d'insuline de façon gluco-dépendante dans le modèle de pancréas perfusé isolé de rat. L'effet de l'urolithine C est rapide, soutenue et réversible dès lors que la concentration en glucose devient non stimulante.

D'un point de vue mécanistique, des travaux d'imagerie calcique par fluorescence montrent que l'uro lithine C augmente la concentration intracellulaire de calcium dans des cellules isolées d'îlots de Langerhans suite à un traitement par le KCl, un agent dépolarisant. De plus, des expériences d'électrophysiologie sur cellules INS-1 montrent que l'uro lithine C sensibilise et augmente l'ouverture des canaux calciques de type L à des potentiels de l'ordre de -20 mV. Il est intéressant de noter que l'uro lithine C n'a pas d'effet sur ces canaux au potentiel de repos ( $\approx -80$  mV) ce qui pourrait expliquer pourquoi ce métabolite ne modifie pas la sécrétion d'insuline en condition basale.

De façon générale, nous avons donc relevé que même si les urolithines sont des molécules chimiquement apparentées issues d'un précurseur commun (acide ellagique), chacune d'elle possède un profil d'activité singulier sur la fonction insulino-sécrétrice. Ces résultats suggèrent que les urolithines possèderaient des propriétés pharmacologiques distinctes en termes d'affinité ou de sélectivité envers des cibles moléculaires et /ou de capacité à moduler l'activité de cibles ou de voies de signalisation cellulaires impliquées dans la sécrétion d'insuline. Ces résultats sont en accord avec la littérature et montrent la pertinence d'évaluer l'activité biologique des différents métabolites des polyphénols. Des études de type structure/activité permettront d'identifier les déterminants chimiques des urolithines (notamment en termes de nombre et de position des fonctions hydroxyles) responsables de ces activités différentielles. De plus, nos résultats suggèrent que l'uro lithine C potentialise la sécrétion d'insuline, au moins en partie, en augmentant l'activité des canaux calciques de type L et donc l'influx de calcium, processus clé dans l'exocytose. Des travaux complémentaires seront nécessaires afin de déterminer si l'uro lithine C est un ligand des canaux calciques de type L.

Enfin, ces travaux ont montré que l'uro lithine C régule la fonctionnalité de la cellule  $\beta$  pancréatique de façon gluco-dépendante. Cette propriété pharmacologique est essentielle lorsqu'il s'agit de développer une molécule à visée thérapeutique permettant un contrôle glycémique précis tout en minimisant la survenue d'hypoglycémies.

## **Chapitre 2 : Article “Development and validation of a liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for the determination of urolithin C in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study”**

---

### **Introduction**

Le potentiel antidiabétique de l’urolithine C est illustré notamment par les données suivantes :

- Capacité à stimuler de façon gluco-dépendante la sécrétion d’insuline, bien mise en évidence sur un modèle *ex vivo*, le pancréas isolé perfusé ;
- Capacité à amplifier la sécrétion d’insuline induite par un analogue GLP-1 ou une sulfonylurée (deux classes de médicaments antidiabétiques utilisées en thérapeutique), suggérant une association possible avec ce type de médicaments ;
- Capacité à stimuler la sécrétion d’insuline sur des cellules  $\beta$  ne répondant plus au glucose du fait d’une gluco-toxicité.

La prochaine étape préclinique visera à obtenir une preuve de concept d’activité anti-diabétique *in vivo* en faisant appel à des modèles animaux de diabète type 2 (notamment le rat GK, pour lequel le déficit insulino-sécrétoire est le facteur physiopathologique prédominant). Cette étape nécessitera la détermination des conditions d’administration permettant d’obtenir des concentrations plasmatiques d’urolithine C susceptibles d’amplifier la sécrétion d’insuline (de l’ordre de 20  $\mu$ M) et donc de connaître au préalable le devenir pharmacocinétique de l’urolithine C *in vivo*.

Certaines études concernant l’urolithine A administrée *in vivo* chez le rat et la souris (Ryu et al., 2016; Seeram et al., 2007) ont été effectivement couplées à son dosage plasmatique. Cependant, aucune étude n’a été réalisée sur le devenir de l’urolithine C administrée *in vivo*. Il apparaît donc nécessaire :

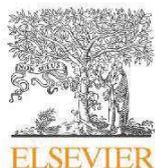
- de mettre au point et valider le dosage plasmatique de l’urolithine C chez le rat ;
- de réaliser une première étude visant à déterminer son modèle pharmacocinétique après administration par voie injectable (intra-péritonéale).

C'est cet objectif que nous avons poursuivi dans la publication intitulée :

*“Development and validation of a liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for the determination of urolithin C in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study”.*

par Bayle M, Roques C, Marion B, Audran M, Oiry C, Bressolle-Gomeni FM, Cros G.

dans la revue : J Pharm Biomed Anal. 2016 Nov 30;131:33-39.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)

## Development and validation of a liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for the determination of urolithin C in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study



Morgane Bayle<sup>a</sup>, Céline Roques<sup>a</sup>, Bénédicte Marion<sup>a</sup>, Michel Audran<sup>a</sup>, Catherine Oiry<sup>a</sup>, Françoise M.M. Bressolle-Gomeni<sup>b,\*</sup>, Gérard Cros<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) UMR 5247, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, Faculté de Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahault BP14491, 34093 Montpellier Cedex 5, France

<sup>b</sup> R&D Department, Pharmacometrica, Longcol, La Fouillade, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 April 2016

Received in revised form 26 July 2016

Accepted 29 July 2016

Available online 5 August 2016

#### Keywords:

Urolithin C  
Type 2 diabetes  
Rat Plasma  
Quantitation  
LC-ESI-MS/MS

### ABSTRACT

Urolithins are microflora human metabolites of dietary ellagic acid derivatives. There is now a growing interest in the biological activities of these compounds. Several studies suggest that urolithins have potential antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and anti-glycative activities. Recently, our group investigated the role of urolithins as potential anti-diabetic treatments; among the four urolithins, urolithin C was the most promising compound. The purpose of this paper was to develop a rapid, sensitive and specific liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) method for the determination of urolithin C in rat plasma. To date, no method is reported for the quantification of urolithin C in any of the matrices. Plasma samples were extracted with ethyl acetate. Urolithin D was selected as the internal standard. The separation was carried out on a C18 Kinetex EVO column (2.1 mm × 150 mm, 2.6 μm) using a mobile phase of acetonitrile–1% aqueous formic acid solution (30:70, v/v). A triple quadrupole mass spectrometer in the negative ion mode was used for the determination of the target analyte. The monitored ion transitions were  $m/z$  243 → 187 for urolithin C and  $m/z$  259 → 213 for the internal standard. The calibration curve range was 4.95–1085 μg/L ( $r^2 > 0.994$ ). The intra- and inter-day precisions were less than 10%; accuracies ranged from 96.6 to 109%. The mean extraction recovery of urolithins C and D was greater than 91%. No significant matrix effects and no carryover effects were observed. Small changes in LC-ESI-MS/MS conditions did not have significant effect on the determination of urolithin C. Stability tests under various conditions were also investigated. This highly specific and sensitive method was used to analyze samples collected during preclinical pharmacokinetic studies in rats. Glucuronyl and sulfate conjugates of urolithin C were the main metabolites detected in plasma.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

### 1. Introduction

Urolithins are metabolites of ellagic acid (EA), of punicalagins, punicalins, tellimagrandins and other ellagitannins. They are dibenzopyran-6-one derivatives with different hydroxyl substitutions produced by the microbial transformation within the intestinal lumen of dietary EA derivatives [1] (Fig. 1). They are produced by the opening and decarboxylation of one of the lactone rings of EA and the sequential removal of hydroxyls from different

positions. Transformation of EA starts in the jejunum and the first metabolite produced, urolithin D, retains four phenolic hydroxyl groups. The metabolism continues along the gastrointestinal tract with the sequential removal of hydroxyl groups, leading to the production of urolithin C, urolithin A, and finally urolithin B in the distal parts of the colon.

There is now a growing interest in the biological activities of urolithins. Several studies carried out *in vitro* [2–10] or in animal models [11–13] suggest that urolithins have potential antioxidant [2,13], anti-inflammatory [4–6,11,13], anticancer [7–10] and anti-glycative [3] activities. González-Sarrías et al. [14] showed that urolithin A potentiates the anticancer effects of 5-fluorouracil and could be used as a chemotherapy adjuvant. Recently, Kang et al.

\* Corresponding author.

E-mail address: [fbressolle@yahoo.fr](mailto:fbressolle@yahoo.fr) (F.M.M. Bressolle-Gomeni).

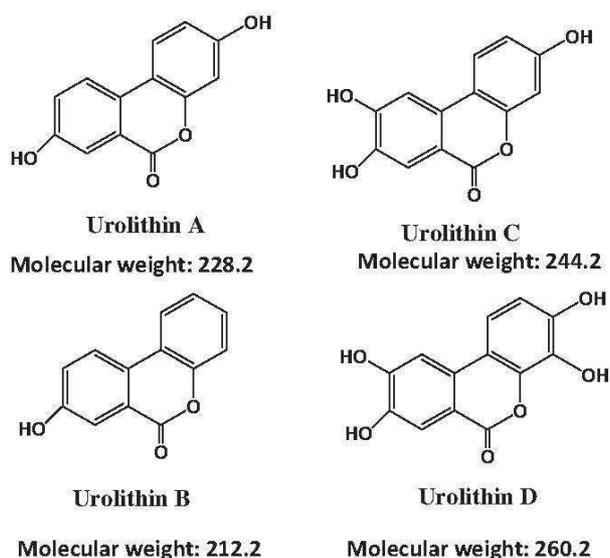


Fig. 1. Structural formulas of urolithins.

[15] reported that urolithins A, C, and D reduce triglyceride accumulation and increase fatty acids oxidation in adipocytes as well as hepatocytes.

During the last few years, our group investigated the role of urolithins as potential anti-diabetic treatments. Noticeably, urolithins were able to stimulate insulin secretion in INS-1 insulin secreting beta-cell line and in isolated perfused pancreas preparation, with concentration- and glucose-dependent profiles [16]. These findings have been recently confirmed in isolated rat islets of Langerhans (unpublished data). Urolithins were also able to prevent the impairment of insulin secretion associated with oxidative stress [16]. These data suggest [16] the potential interest of urolithins for the treatment of established type 2 diabetes or for its prevention in at-risk patients. In addition, our preliminary data indicated that, among the four urolithins, urolithin C was the most promising compound that should be developed first.

Several pharmacokinetic studies have been conducted in animals or human after administration of EA, ellagitannins or urolithin A. Glucuronyl and sulfate conjugates of urolithin A or B were the main metabolites detected in plasma and urine [1,17–24]. However, no studies have been conducted after administration of urolithin C and its main pharmacokinetic parameters remain unknown.

The recent interest focused on urolithins requires the development of appropriate methods to quantify these compounds in biological matrices. To date, no validated methods have been developed for quantifying urolithins in any of the matrices. The present work describes a simple, selective and sensitive method, which employs a liquid–liquid extraction technique for sample preparation and liquid chromatography electrospray ionization–tandem mass spectrometry (LC–ESI–MS/MS) for quantitation of urolithin C in rat plasma. The application of this assay method to a pharmacokinetic study in rats following intraperitoneal administration of urolithin C is described.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Urolithins (A, purity 98.4%; B, purity 99.4%; C, purity 98.8%; D, purity, 99.6%) were purchased from Dalton Pharma Services

(Toronto, ON, Canada). They were stored with light protection at 4 °C. Acetonitrile and ethyl acetate (HPLC grade), and formic acid were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dimethylsulfoxide was obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Water used throughout the experiments was generated by a Milli-Q water purification system (Milford, MA, USA). For the validation of the method, blood samples from Wistar rats (Charles River Laboratories, L'Arbresle Cedex, France) were collected with lithium heparin and plasma was obtained by centrifugation at  $1000 \times g$  for 10 min. Six different lots of pooled drug-free plasma samples were prepared, aliquoted, frozen at  $-20$  °C. The same lot was used during the study in the preparation of standards and quality control (QC) samples. The other lots were used to verify the specificity of the method and the absence of matrix effect.

Stock solutions of urolithins were prepared by dissolving accurately weighed amounts of the drugs in dimethylsulfoxide to give stock solutions containing 20 mM (i.e., 4.56 g/L for urolithin A, 4.54 g/L for urolithin B, 4.88 g/L for urolithin C, 5.2 g/L for urolithin D).

During optimization of the analytical method, urolithins A, B and D were tested as internal standards. According to the results of extraction recovery, accuracy, precision, and specificity, urolithin D was chosen as internal standard.

For urolithins C and D, two separate stock standard solutions were prepared: one was used for the preparation of the calibration curve standards and the second was used for the preparation of QC samples. They were stored at  $-20$  °C until use.

### 2.2. Instrumentation

The LC–ESI–MS/MS system consisted of an Agilent 1100 LC system (Agilent Technologies, Les Ulis, France) linked with an API 3000 tandem triple quadrupole mass spectrometer (AB Sciex, Courtaboeuf, France). The chromatographic separation was achieved isocratically on a C18 Kinetex EVO column (2.6  $\mu\text{m}$ ,  $2.1 \times 150$  mm) from Phenomenex (Le Pecq, France). A guard column (C18 UHPLC EVO, 2  $\mu\text{m}$ ,  $2.1 \times 2$  mm) was used to safeguard the analytical column. The column temperature was maintained at 30 °C. A mixture of water containing 1% formic acid (v/v, eluent A) and acetonitrile (eluent B) (70:30, v/v) was used as mobile phase at a flow rate of 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  without split. All solvents were filtered through a 0.20  $\mu\text{m}$  millipore filter (Molsheim, France) before use and degassed 15 min in an ultrasonic bath. The autosampler was set at 4 °C and the injection volume was 5  $\mu\text{L}$ .

Urolithins C and D were detected by electrospray ionization (ESI) using multiple reaction monitoring (MRM) in a negative ionization mode. The optimal MRM transitions for precursor ion  $[\text{M}-\text{H}]^-$  to specific product ion were  $m/z$  243  $\rightarrow$  187 and  $m/z$  243  $\rightarrow$  215 for urolithin C and  $m/z$  259  $\rightarrow$  213 for urolithin D. LC–MS/MS spectra are presented in Fig. 1 of the online Data Supplement. The optimal instrument dependent parameters were as follows: curtain gas, 8 psi; nebulizer gas, 8 psi; ion spray voltage, 4200 V; entrance potential, 10 V; and source temperature, 350 °C. Nitrogen gas (4 psi) was used as the collision gas. MRM transitions and optimal compound dependent parameters are given in Table 1. The dwell time for each ion was set at 200 ms. Data acquisition and integration were carried out with LC–MS software (version 1.5; AB Sciex) linked directly to the API 3000 LC–MS/MS system.

### 2.3. Working solutions

Stock solutions of urolithin C were extemporaneously and serially diluted with purified water to obtain ten working solutions ranging from 0.1 to 21.7 mg/L for the preparation of calibrators and from 0.31 to 12.1 mg/L for the preparation of QC samples. The

**Table 1**  
Multiple reaction monitoring transitions selected for quantitation and optimal compound dependent MS/MS parameters.

	Quadrupole 1 ( <i>m/z</i> )	Quadrupole 2 ( <i>m/z</i> )	DP (V)	FP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Urolithin C	243	187	61	220	40	7
	243	215	61	220	40	7
Urolithin D (EI)	259	213	76	310	47	11

Quadrupole 1 was set to transmit the molecular ion and quadrupole 2 to transmit the product ions. DP, declustering potential; FP, focusing potential; CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential.

stock solution of urolithin D was serially diluted in the mobile phase before use to obtain a concentration of 9.63 mg/L.

Unextracted solutions containing 4.95, 98.5 and 705.5 µg/L of urolithin C and 481.5 µg/L of urolithin D in the mobile phase were injected before each run to check the performance of the LC-ESI-MS/MS system.

#### 2.4. Sample processing

To a 0.2 mL aliquot of blank plasma, calibration standards or unknown samples, a 10 µL volume of the internal standard solution (9.63 mg/L, i.e. plasma concentration of 481.5 µg/L) was added. After vortex mixing for 15 s, 10 µL of 1% (v/v) formic acid in water was added. After vortex for 15 s, 600 µL of ethyl acetate were added. The mixture was vigorously vortexed twice for 15 s and then centrifuged at 4 °C (5 min at 25830 × g). The upper organic phase was removed and evaporated to dryness at 40 °C under a gentle stream of nitrogen. The residue was reconstituted in 200 µL of mobile phase. The mixture was vortexed for 15 s and then centrifuged at 4 °C (5 min at 9400 × g). One hundred microliters of the supernatant were transferred into polypropylene autosampler vials and a 5-µL volume was injected into the LC-MS/MS system.

#### 2.5. Preparation of calibration curves and QC samples

Calibrators were prepared by adding 10 µL of the appropriate working solutions into 0.2 mL of drug-free plasma. The effective concentrations of urolithin C in plasma were 4.95, 9.9, 24.75, 49.5, 98.5, 197.5, 493.5, 705.25 and 1085 µg/L. A calibration curve also included a blank matrix. Sixteen validation runs were performed each on separate days (between-day repeatability). Within-day repeatability was determined for six calibration curves prepared on the same day. The analyte-to-IS peak area ratios (response) against the respective analyte concentrations were used to assess the relationship between the response and concentration. Different models were tested; linear calibration curves ( $Y = aX + b$ , where  $Y$  is the peak area ratio,  $X$  the introduced concentration of the analyte,  $a$  the slope and  $b$  the intercept) with the weighting factor of  $1/X^2$  gave the best results. The resulting equation parameters were used to calculate “back-calculated” concentrations for the calibrators, which were then statistically evaluated.

QC samples used in the validation were prepared in the same way as the calibrators, by mixing drug-free plasma samples with appropriate volumes of working solutions to achieve four different concentrations: 15.5, 37.0, 148.1 and 604.5 µg/L.

#### 2.6. Method validation

Method validation was performed based on the “guidance for Industry Bioanalytical Method Validation” recommended by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) [25–28].

The selectivity of the method was assessed by analyzing six plasma specimens from different pools. Each blank sample was extracted and chromatographed to determine the extent to which endogenous rat plasma components may contribute to chromatographic interference with urolithins C and D. One hemolyzed rat plasma was also checked for specificity.

Within-day accuracy and precision were determined by analyzing six replicates of each QC sample in the same day against a calibration curve. Between-day accuracy and precision were determined by analyzing QC samples on sixteen separate days against a calibration curve. Accuracy was expressed as percentage recovery and precision as relative standard deviation (R.S.D.) of replicate measurements.

The lower limit of quantitation (LLOQ) was defined as the lowest concentration that could be determined with an accuracy within 80–120% and a precision < 20% on a day-to-day basis. To determine the analytical error in the LLOQ, spiked QC samples were used.

The matrix effect (influence of matrix on electrospray ionization) and extraction efficiency were evaluated at concentrations of QC samples ( $n = 3$  replicates per QC). This involved a comparison of: (i) the peak areas of urolithin C and D in extracted samples of blank matrix from six different drug-free batches spiked with the analytes (post-extraction spiked samples); (ii) the peak areas of the two analytes added to the biological matrix before extraction (pre-extraction spiked samples) and (iii) the peak areas obtained by direct injection of standard solutions at the same concentrations in the mobile phase (neat solutions). The matrix effect [25–28] was measured by comparing the responses from post-extraction spiked samples with those from pure solutions. If the ratio is < 85% or > 115%, an exogenous matrix effect is implied. Extraction efficiency was calculated by comparing the responses from pre-extraction spiked samples with those from neat solutions.

Carryover was assessed by injecting blank sample after a high concentration sample or standard. Ruggedness of the method was evaluated by using different analysts and different lots of columns, and by performing small changes in LC-MS/MS conditions (composition of the mobile phase, percentage of formic acid solution, flow rate, column temperature and mass spectrometer parameters). The ruggedness experiment should meet the acceptance criteria for linearity and intra-batch accuracy and precision.

Dilution integrity

#### 2.7. Dilution integrity

In order to establish that dilution of plasma samples with urolithin C concentrations above the upper limit of the standard curve does not interfere with method performance, QC samples containing this compound at concentrations of 1355.5, 2711.1 and 5422.2 µg/L were prepared. The three QC samples were diluted 2-, 5- and 10-fold, respectively, with drug-free rat plasma in order to bring concentrations within the range of standard curves. Each analysis was performed three times at each concentration, using calibration curves and QC samples. The found concentrations calculated by applying the dilution factors 2, 5 and 10 were compared to the nominal concentrations.

#### 2.8. Stability

The stability of urolithins C and D stock solutions was tested at the storage temperature of –20 °C after a six-month period, by comparing with freshly prepared stock solutions.

The stability of urolithin C in rat plasma including (i) three freeze–thaw cycles; (ii) storage for four months at  $-20^{\circ}\text{C}$ ; (iii) storage for 72 h at  $4^{\circ}\text{C}$ ; and (iii) storage at room temperature ( $20^{\circ}\text{C}$ ) for 6 h was investigated by analyzing QC samples against a calibration curve. Each determination was performed in triplicate. In addition, the stability of urolithins C and D was assessed at concentrations of calibration curve in processed samples in the autosampler (72 h at  $4^{\circ}\text{C}$ ).

### 2.9. Pharmacokinetic study

This method was used to quantify urolithin C in male Wistar rat plasma after intraperitoneal administration of  $10\text{ mg/kg}$  dissolved in dimethylsulfoxide. The rats (Charles River Laboratories) used in this study were  $140\text{--}160\text{ g}$  (mean,  $156 \pm 12\text{ g}$ ). This research adhered to the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication #85-23, revised 1985). The animal study was approved by the local Animal Use Committee. Blood samples (one sample per rat) were drawn in heparinized polypropylene tubes at the following time-points (3 animals per time-point), before administration, 5, 15, 30 min, and 2, 4, 8, 10 and 24 h after drug administration. Blood samples were collected after sacrifice of the animal by section of the carotid artery. Two minutes prior to sampling, animals were anaesthetized with isoflurane. Blood samples were centrifuged at  $4^{\circ}\text{C}$  ( $1000 \times g$  for 10 min). Plasma samples were transferred into polypropylene tubes and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assay. Pharmacokinetic parameters were computed from the average concentration values at each time point using the Pk-fit software [29].

## 3. Results and discussion

### 3.1. Method development

Organic precipitation, liquid–liquid and solid–liquid extractions were tested for sample preparation in this experiment. It was found that organic precipitation with acetonitrile, methanol or acetone as well as solid-phase extraction using Oasis HLB cartridge did not provide the satisfactory recovery of urolithin C. To achieve higher recovery and sensitivity as well as eliminating endogenous interferences, liquid–liquid extraction was undertaken. Different extraction reagents (ether, pentane, dichloromethane and ethyl acetate) and pH conditions were evaluated. Finally, better recovery for urolithin C was achieved by adding 1% formic acid in the extraction solution and conducting the extraction with ethyl acetate.

The selection of the internal standard is very important for the analysis of target compounds. Urolithins A, B and D were tested as internal standard because of their similar basic structures. Under the chosen optimal conditions of sample pretreatment, urolithin B is poorly extractible (recovery lower than 1%) and urolithin A presents an interfering peak at a retention time very near to that of urolithin C, mainly at low concentration of the analyte. Thus, urolithin D was chosen as internal standard because of its similar structure, physicochemical properties and mass spectrometric behavior compared to those of urolithin C. In addition, there was no interference at the retention time of urolithin C.

Chromatographic conditions were optimized to improve peak shape, increase signal response of analytes and shorten run time. This included column type (C8 [Zorbax Eclipse XDB, 150 mm length (particle size,  $5\ \mu\text{m}$ ) and 50 mm length (particle size  $1.8\ \mu\text{m}$ )], and C18 [RP18 Nucleoshell, C18HD nucleosil, ODS Hypersil, EVO Kinetex]), composition of the mobile phase, pH of buffer solution and flow rate. Acetonitrile was chosen as the organic phase because it could provide better peak shape and lower background noise than methanol. Using acetonitrile–water as mobile phase, comparisons were made between isocratic and gradient elutions. An

isocratic elution was adopted because urolithin C and D were satisfactorily separated under this condition. In our experiment, the presence of organic acid (formic, acetic, or trifluoroacetic acid) or buffer (formate or acetate) in the mobile phase were tested for the enhancement of ionization and improvement of peak symmetry. It was found that the peak shape and response of urolithins C and D were better and the runtime was suitable (lower than 5 min) with eluent A containing 1% formic acid.

The full scan of urolithins C and D in positive and negative ionization modes showed that the signals obtained in negative mode had much higher intensities than those obtained in positive mode. Thus, for urolithin C, the most intense transition  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$  at  $m/z$   $243 \rightarrow 187$  (loss of  $2\text{CO}$ ) was used as a quantifier, and the second transition at  $m/z$   $243 \rightarrow 215$  (loss of  $\text{CO}$ ) was used as qualifier. The monitored ion transition was  $m/z$   $259 \rightarrow 213$  (loss of formic acid) for urolithin D (Fig. 1 of the online Data Supplement). The tandem mass spectrometer parameters were automatically optimized via direct infusion into the mass spectrometer of tuning standard solutions ( $705.5\ \mu\text{g/L}$  for urolithin C;  $481.5\ \mu\text{g/L}$  for urolithin D) dissolved in the mobile phase.

### 3.2. Method validation

Urolithins C and D eluted at retention times (rt) of  $3.09 \pm 0.03\text{ min}$  and  $2.35 \pm 0.02\text{ min}$  ( $n=40$ ), respectively. Representative MRM chromatograms of rat plasma spiked at the LLOQ, and those of an in vivo rat plasma sample collected 10 min after intraperitoneal administration of urolithin C are presented in Fig. 2b,c. The six different lots of rat matrix were chromatographically screened; as shown, the assay was free of interference from compounds in the biomatrices (Fig. 2a).

The method was validated over the range  $4.95\text{--}1085\ \mu\text{g/L}$ . Different calibration curves were performed on the same day ( $n=6$ ) and on separate days ( $n=16$ ) with freshly aliquoted standards and the back-calculated concentrations recorded. The  $r^2$  values were consistently  $>0.994$  during the course of validation. The R.S.D. values on the slope were below 15%. Mean regression parameters are as follows:  $Y=0.00438 (\pm 0.000259)+0.00273$  for within-day repeatability and  $0.00383 (\pm 0.000562) - 0.00062$  for between-day repeatability. Variations in back-calculated concentrations (given as R.S.D. (%)) of all calibration curves ranged from 5.0 to 11%; the mean relative deviations between back-calculated and introduced concentrations were between  $-8.75$  to  $9.45\%$ . The goodness of fit between back-calculated concentrations and introduced concentrations was statistically verified (Student's  $t$ -test). The mean relative predictor error calculated from the difference between back-calculated and introduced concentrations was not statistically different from zero. The 95% confidence interval was  $-2.72;9.52$ . The distribution of residuals is presented Fig. 3.

Precision and accuracy complied with the FDA and EMA recommendations [25–27]. Results of the analysis of QC samples are reported in Table 2.

For urolithin C, extraction recovery was 96% (R.S.D., 6.3%,  $n=14$ ). It was 92% (R.S.D., 6.5%,  $n=10$ ) for the internal standard. These recoveries were not statistically different over the range of concentrations studied. Using 0.2 mL of plasma, the LLOQ was  $4.95\ \mu\text{g/L}$ . At this level, the precision of determination, expressed as R.S.D. was  $<7\%$  with adequate assay accuracy (101%).

For urolithin C, the calculated matrix effects were in the range of 99.0–110% (R.S.D.,  $<9\%$ ), which meant that there was no significant matrix effect in this method. For urolithin D, the matrix effect was 102% (R.S.D., 13%).

No carryover effects were observed. The results indicated that small changes in the LC–MS/MS conditions did not have significant effect on the determination of urolithin C. The R.S.D. ranged from

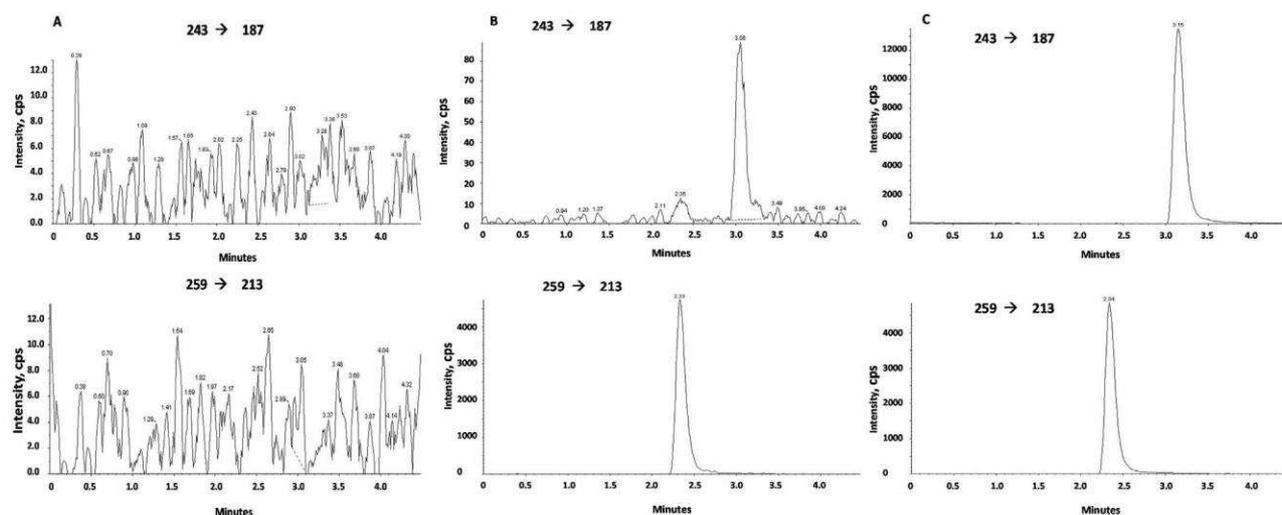


Fig. 2. Representative MRM chromatograms of (A) Blank plasma; (B) blank plasma spiked with urolithin C at LLOQ; and (C) plasma sample collected 10 min after intraperitoneal administration of 10 mg/kg urolithin C, this sample has been diluted to 1/5 before analysis, concentration 4330  $\mu\text{g/L}$ .

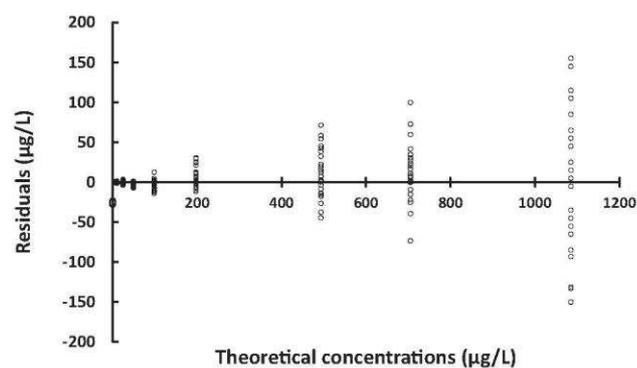


Fig. 3. Residuals versus theoretical concentrations.

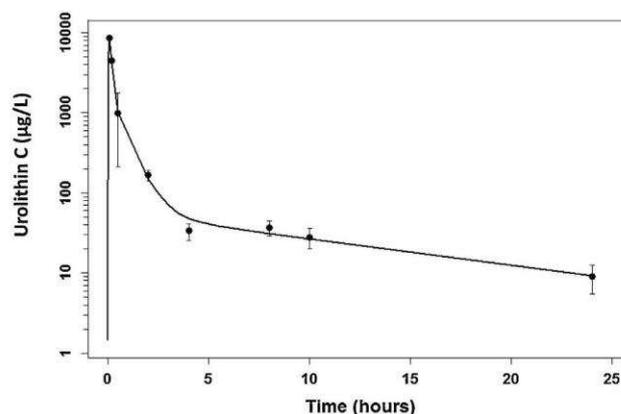


Fig. 4. Mean  $\pm$  SD plasma concentration-time profile of urolithin C in male Wistar rats after intraperitoneal administration of 10 mg/kg.

3.15 to 13.7 and the percentage of nominal values ranged from 92.3 to 113.3.

### 3.3. Dilution integrity

The upper concentration limits can be extended to 5422.2  $\mu\text{g/L}$ . The mean back-calculated concentrations for 1/10, 1/5 and 1/2 dilution samples were within 85–115% of their nominal values. Results are presented in Table 2.

### 3.4. Stability

Stock solutions of urolithins C and D were stable for at least six months at  $-20^\circ\text{C}$ .

After bench-top storage at room temperature, a significant decrease in urolithin C concentrations was observed. Thus, it is recommended that the storage time at  $20^\circ\text{C}$  not exceed 2 h. Urolithin C can be stored for up to 72 h at  $4^\circ\text{C}$ . The long-term freezer stability indicated that urolithin C was stable at  $-20^\circ\text{C}$  for at least 4 months. Results are presented in Fig. 2 of the online Data Supplement. Good stability of urolithin C was observed after repeated three freeze/thaw cycles. This drug was also stable during processed extracted samples at  $4^\circ\text{C}$  in the autosampler for 72 h.

### 3.5. Pharmacokinetic study

Fig. 4 shows the plasma concentration-time profile of urolithin C in male Wistar rats (mean  $\pm$  SD). Results are compatible with a three-compartment model. The half-life of the terminal part of the curve was 11.3 h and the total clearance (CL/F) was 3.41 L/h/kg. The initial volume of distribution ( $V_1/F$ ) and the steady-state volume of distribution ( $V_{ss}/F$ ) were 0.831 L/kg and 55.6 L/kg, respectively.

Published data reported that phase II metabolites of urolithin A or B were the main metabolites detected in plasma and urine [1,17–24]. Thus, plasma samples collected 30 min and 2 h post-dose were analyzed after simple protein precipitation by acetonitrile (1:3, v/v) using LC-MS/MS in the positive- and negative-ion modes. In positive mode, a peak ( $t_r = 1.7$  min) was detected at  $m/z$  421 i.e. 176 Da more than  $m/z$  245. Increasing the collision energy, the loss of 176 Da ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) generated fragment ion at  $m/z$  245 suggesting the glucuronidation of urolithin C. In negative mode, a peak was detected at  $m/z$  323 ( $t_r = 1.65$  min). The loss of 80 Da from the parent ion and the presence of  $m/z$  80 in the product ion spectra ( $t_r = 1.44$  min) are the indicative of sulfate conjugate of urolithin C.

**Table 2**  
Within-day and between-days accuracy and precision of the method.

Added concentration, µg/L	Within-day (n=6)		Between-days (n=16)	
	Accuracy (%)	Precision (R.S.D., %)	Accuracy (%)	Precision (R.S.D., %)
15.5	96.6	9.84	101.4	6.45
37.0	101.1	8.92	100.2	5.79
148.1	107.0	7.53	99.3	7.63
6045	109.0	6.88	102.8	6.81
<sup>a</sup> Bias, µg/L	7.32		2.67	
<sup>b</sup> 95% confidence intervals	−0.18;14.8		−0.42;5.75	
Dilution Integrity (n=3)				
1355.5			98.8	2.86
2711.1			106.8	1.38
5422.2			102.3	1.03

<sup>a</sup> bias is calculated by comparing spiked and calculated QC concentrations.

<sup>b</sup> 95% confidence intervals for bias.

#### 4. Conclusion

The current paper describes for the first time a sensitive and selective LC-ESI-MS/MS method for the determination of urolithin C in rat plasma, a microflora human metabolite of dietary EA derivative that showed some potential as new anti-diabetic agent. The method exhibited excellent performance with wide range (4.95–1085 µg/L), short running time (5 min), and easy sample preparation process. The applicability of this assay was demonstrated in a preclinical pharmacokinetic study carried out in rats receiving intraperitoneal administration of urolithin C.

The current method can be easily adapted for the analysis of other urolithins in biological matrices.

Further studies will be done to determine the absolute oral bioavailability and metabolism of urolithin C, along with the conditions of oral treatment susceptible to maintain active plasma concentrations on the endocrine pancreas.

#### Financial disclosures

Non applicable

#### Acknowledgments

The authors wish to thank the following contributors to the Urolithins and Diabetes project: Alan Crozier (U Davis, CA, USA), Daniele Del Rio (U Parma, It), Margherita Dall'Asta (U Parma, It), Richard Magous, Jérémie Neasta and Michel Tournier (U Montpellier, Fr). The IBM research group thanks the Société d'Accélération du Transfert de Technologie AxLR (Montpellier, Fr) for its financial support (October 2013).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.046>.

#### References

- J.C. Espín, M. Larrosa, M.T. García-Conesa, F. Tomás-Barberán, Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: the evidence so far, *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2013 (2013) 270418.
- D. Bialonska, S.G. Kasimsetty, S.I. Khan, D. Ferreira, Urolithins intestinal microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 10181–10186.
- E. Verzelloni, C. Pellacani, D. Tagliazucchi, S. Tagliaferri, L. Calani, L.G. Costa, F. Brighenti, G. Borges, A. Crozier, A. Conte, D. Del Rio, Antigliocative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites, *Mol. Nutr. Food Res.* 55 (Suppl. 1) (2011) S35–S43.
- J.A. Giménez-Bastida, M. Larrosa, A. González-Sarrías, F.A. Tomás-Barberán, J.C. Espín, M.T. García-Conesa, Intestinal ellagitannin metabolites urolithins and ellagic acid ameliorate cytokine induced inflammation and associated molecular markers in human colon fibroblasts, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 8866–8876.
- A. González-Sarrías, M. Larrosa, F.A. Tomás-Barberán, P. Dolara, J.C. Espín, NF-κB-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts, *Brit. J. Nutr.* 104 (2010) 503–512.
- J.A. Giménez-Bastida, A. González-Sarrías, M. Larrosa, F. Tomás-Barberán, J.C. Espín, M.T. García-Conesa, Ellagitannin metabolites urolithin A glucuronide and its aglycone urolithin A, ameliorate TNF-α induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endothelial cells, *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (2012) 784–796.
- A. González-Sarrías, J.C. Espín, F.A. Tomás-Barberán, M.T. García-Conesa, Gene expression cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins, *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (2009) 686–698.
- S.G. Kasimsetty, D. Bialonska, M.K. Reddy, G. Ma, S.I. Khan, D. Ferreira, Colon cancer chemopreventive activities of pomegranate ellagitannins and Urolithins, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 2180–2187.
- A. González-Sarrías, J.A. Giménez-Bastida, M.A. Núñez-Sánchez, M. Larrosa, M.T. García-Conesa, F.A. Tomás-Barberán, J.C. Espín, Phase-II metabolism limits the antiproliferative activity of urolithins in human colon cancer cells, *Eur. J. Nutr.* 53 (2014) 853–864.
- L.S. Adams, Y. Zhang, N.P. Seeram, D. Heber, S. Chen, Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro, *Cancer Prev. Res. (Phila.)* 3 (2010) 108–113.
- M. Larrosa, A. González-Sarrías, M.J. Yáñez-Gascón, M.V. Selma, M. Azorín-Ortuño, S. Toti, F. Tomás-Barberán, P. Dolara, J.C. Espín, Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism, *J. Nutr. Biochem.* 21 (2010) 717–725.
- R. González-Barrio, C.A. Edwards, A. Crozier, Colonic Catabolism of ellagitannins ellagic acid, and raspberry anthocyanins: in vivo and in vitro studies, *Drug Metab. Dispos.* 39 (2011) 1680–1688.
- H. Ishimoto, M. Shibata, Y. Myojin, H. Ito, Y. Sugimoto, A. Tai, T. Hatano, In vivo anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin A, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 5901–5904.
- A. González-Sarrías, J. Tomé-Carneiro, A. Bellesia, F.A. Tomás-Barberán, J.C. Espín, The ellagic acid-derived gut microbiota metabolite, urolithin A, potentiates the anticancer effects of 5-fluorouracil chemotherapy on human colon cancer cells, *Food Funct.* 6 (2015) 1460–1469.
- I. Kang, Y. Kim, F.A. Tomás-Barberán, J.C. Espín, S. Chung, Urolithin A, C and D, but not iso-Urolithin A and Urolithin B, attenuate triglyceride accumulation in human cultures of adipocytes and hepatocytes, *Mol. Nutr. Food Res.* 60 (2016) 1129–1138.
- G. Cros, A. Crozier, M. Dall'Asta, R. Daniele Del, R. Magous, C. Oiry, Compositions comprising urolithins and uses thereof for the stimulation of insulin secretion. European patent 2862568 A1 applied for by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 15 October 2013, WO 2015055736A1, published April 22, 2015.
- R. González-Barrio, G. Borges, W. Mullen, A. Crozier, Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 3933–3939.
- R. González-Barrio, P. Truchado, H. Ito, J.C. Espín, F.A. Tomás-Barberán, UV and MS identification of Urolithins and Nasutins, the bioavailable metabolites of ellagitannins and ellagic acid in different mammals, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 1152–1162.
- N.P. Seeram, Y. Zhang, R. McKeever, S.M. Henning, R.P. Lee, M.A. Suchard, Z. Li, S. Chen, G. Thames, A. Zerlin, M. Nguyen, D. Wang, M. Dreher, D. Heber,

- Pomegranate juice and extracts provide similar levels of plasma and urinary ellagitannin metabolites in human subjects, *J. Med. Food* 11 (2008) 390–394.
- [20] N.P. Seeram, S.M. Henning, Y. Zhang, M. Suchard, Z. Li, D. Heber, Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours, *J. Nutr.* 136 (2006) 2481–2485.
- [21] M. Azorín-Ortuño, C. Urbán, J.J. Cerón, F. Tecles, A. Gil-Izquierdo, F.J. Pallarés, F.A. Tomás-Barberán, J.C. Espín, Safety evaluation of an oak-flavored milk powder containing ellagitannins upon oral administration in the rat, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 2857–2865.
- [22] S.U. Mertens-Talcott, P. Jilma-Stohlawetz, J. Rios, L. Hingorani, H. Derendorf, Absorption metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 8956–8961.
- [23] N.P. Seeram, Y. Zhang, M. Sartipipour, S.M. Henning, L. Ru-Po, D.M. Harris, A. Moro, D. Heber, Pharmacokinetics and tissue disposition of urolithin A, an ellagitannin-derived metabolite, in mice, *FASEB J.* 21 (2007) A1081.
- [24] L. Yan, P. Yin, C. Ma, Y. Liu, Method development and validation for pharmacokinetic and tissue distributions of ellagic acid using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), *Molecules* 19 (2014) 18923–18935.
- [25] G. Tiwari, R. Tiwari, Bioanalytical method validation: an updated review, *Pharm. Methods* 1 (2010) 25–38.
- [26] C.T. Viswanathan, S. Bansal, B. Booth, A.J. DeStefano, M.J. Rose, J. Sailstad, V.P. Shah, J.P. Skelly, P.G. Swann, R. Weiner, Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1962–1973.
- [27] European Medicines Agency Guideline on Bioanalytical Method Validation., 2011 [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf).
- [28] A. Cappiello, G. Famiglioni, P. Palma, E. Pierini, V. Termopoli, H. Trufelli, Overcoming matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9343–9348.
- [29] C. Farenc, J.R. Fabreguette, F. Bressolle, Pk-fit a pharmacokinetic/pharmacodynamic and statistical data analysis software, *Comput. Biomed. Res.* 33 (2000) 315–330.

## Résumé et conclusion

Cette publication décrit pour la première fois une méthode sensible et sélective utilisant la technologie de chromatographie liquide couplée à l'ionisation en électrospray et la spectrographie de masse en tandem pour la détermination de l'urolithine C, un métabolite de l'acide ellagique produit par la microflore intestinale dans le plasma de rat et possédant des propriétés anti-diabétiques.

La méthode a démontré d'excellentes performances, avec une large gamme de concentrations mesurables (de 4,95 à 1085 µg/L), un temps de passage relativement court (5 min) et une préparation aisée de l'échantillon.

Un exemple d'application de la méthode est illustré par une étude pharmacocinétique préliminaire chez des rats ayant reçu une dose unique d'urolithine C de 10 mg/kg par voie intrapéritonéale. Les résultats sont compatibles avec un modèle à trois compartiments. La demi-vie de la phase terminale a été de 11,3 heures et la clairance totale de 3,41 L/h/kg. Le volume de distribution initial ( $V_1/F$ ) a été de 0,831 L/kg et le volume de distribution à l'équilibre de 55,6 L/kg. Ces données suggèrent un stockage tissulaire de l'urolithine C.

Une première recherche des métabolites circulants dans les échantillons plasmatiques prélevés 30 minutes et 2 heures après administration suggère la formation de métabolites glucuronidés et sulfatés. Des études ultérieures détermineront la biodisponibilité orale absolue et le métabolisme exhaustif de l'urolithine C.

La méthode pourra facilement être adaptée à l'analyse des autres urolithines dans des matrices biologiques.

Ce travail constituait une étape essentielle à la mise au point d'une formulation permettant de maintenir des concentrations plasmatiques actives dans le pancréas endocrine.

## Chapitre 3 : Résultats complémentaires : Approche *in vivo* de la pharmacologie de l'urolithine C

---

Deux types d'études *in vivo* ont été réalisés :

- une étude chez le rat Wistar (non diabétique) des effets de l'urolithine C administrée par voie intra-péritonéale sur la glycémie et l'insulinémie déterminées dans le cadre d'une épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie intrapéritonéale (IPGTT), afin de tenter d'obtenir *in vivo* une preuve de concept de l'activité insulino-sécrétoire de l'urolithine C.

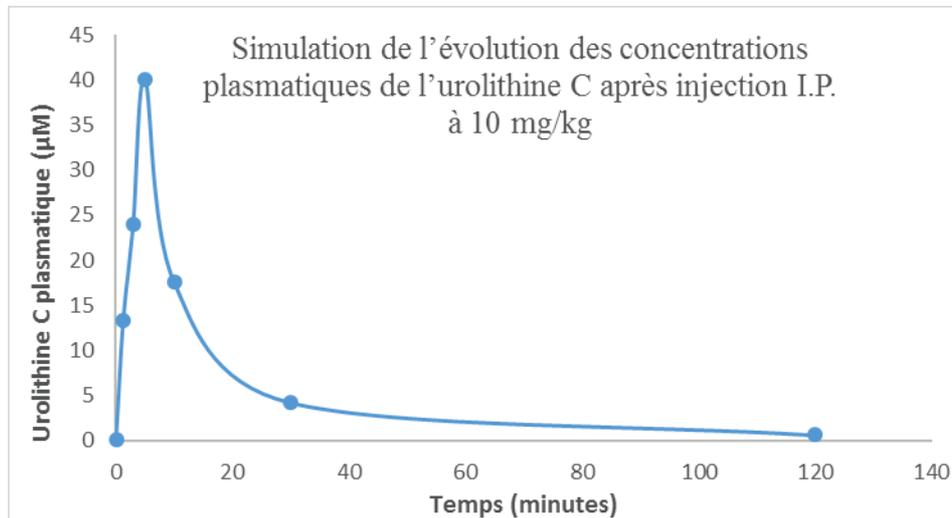
- une étude concernant la durée de vie du ver *C. elegans*, phénomène sous la dépendance, (au moins partielle) du gène de l'AMP kinase, sachant que les activateurs de l'AMP kinase, tels que la metformine ou d'autres polyphénols tels que l'acide chicorique (Schlernitzauer et al., 2013) prolongent effectivement la durée de vie.

### 3.1. Effet de l'urolithine C (10 mg/kg, voie I.P.) sur la tolérance au glucose et l'insulinémie déterminées *in vivo* chez le rat Wistar.

#### 1 - Introduction :

L'étude pharmacocinétique publiée dans l'article 2 de cette thèse intitulé « *Development and validation of a liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for the determination of urolithin C in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study* » nous a permis d'obtenir un modèle pharmacocinétique du devenir de l'urolithine C plasmatique après une injection intrapéritonéale à la dose de 10 mg/kg chez le rat wistar et de simuler les concentrations plasmatiques des deux premières heures après l'injection (**figure 4 page 160**). Cinq minutes après l'injection, l'urolithine C plasmatique est présente dans le plasma à la concentration de 40  $\mu\text{M}$ , puis sa concentration diminue rapidement : soit 18,6  $\mu\text{M}$  à 10 minutes, 4  $\mu\text{M}$  à 30 minutes et 0,7  $\mu\text{M}$  à 2h (**figure 1**). Il semblerait donc que les concentrations plasmatiques d'urolithine C susceptibles d'amplifier la sécrétion d'insuline *in vivo* (de l'ordre de 20  $\mu\text{M}$ ) soient atteintes durant les 10 premières minutes suivant l'injection d'urolithine C à 10 mg/kg par voie intrapéritonéale.

Afin de mettre en évidence une possible activité insulino-sécrétoire *in vivo*, nous avons décidé de réaliser des tests de tolérance au glucose en administrant le glucose par voie intrapéritonéale (ou IPGTT : *Intra-peritoneal glucose tolerance test*) et en dosant l'insulinémie de façon concomitante.



**Figure 1 :** Evolution simulée des concentrations plasmatiques de l'urolithine C après administration de 10 mg/kg par voie intra-péritonéale.

## 2 - Matériels et méthodes :

**a) Animaux :** Des rats wistar mâles (200-230g) ont été hébergés dans une pièce à température et humidité contrôlées et soumis à un cycle jour : nuit de 12 h.

**b) Test de tolérance au glucose (IPGTT : *Intra-peritoneal glucose tolerance test*) :** Les tests de tolérance au glucose ont été réalisés sur 6 rats mâles Wistar recevant 10 mg/kg d'urolithine C solubilisée dans le DMSO et 17 rats contrôles recevant une quantité équivalente de DMSO.

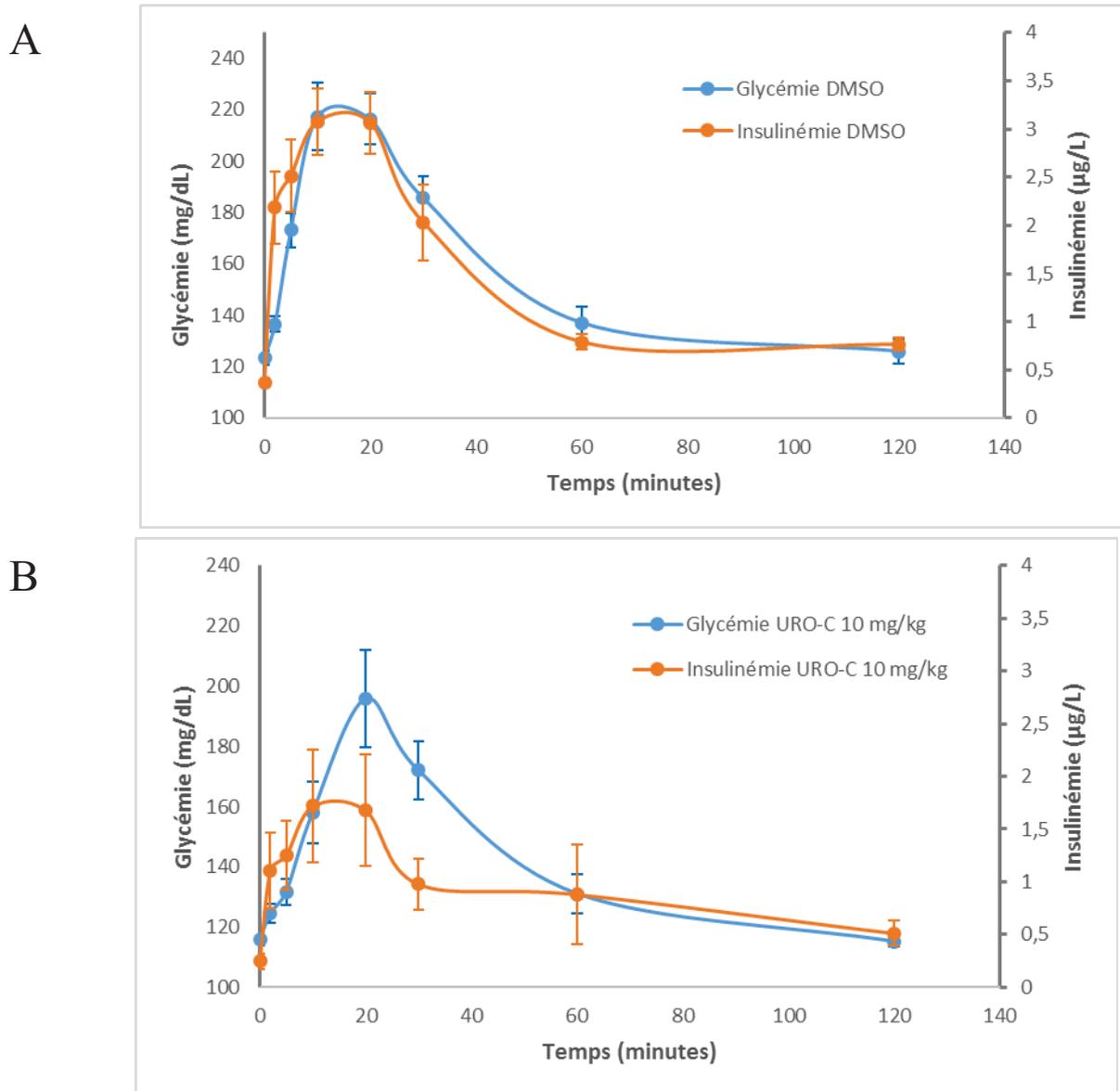
Les animaux ont été mis à jeûn 6 heures avant l'IPGTT.

La glycémie à jeun a été mesurée quelques minutes avant l'expérience à l'aide d'un glucomètre (Accu Check, Roche) à partir de sang prélevé au niveau de la queue de l'animal. L'urolithine C ou le véhicule (DMSO), ont été injectés par voie intrapéritonéale 2 minutes avant l'injection I.P. de glucose (temps 0) à la dose de 1,5 g/kg. Les mesures de la glycémie ont été réalisées par glucomètre (bandelette réactive) directement à la queue de l'animal et l'insulinémie dosée sur des échantillons de 200 µL de sang collectés dans des microtubes préalablement héparinés.

**c) Préparation des échantillons de sang et dosage de l'insulinémie :** Les échantillons de sang ont été centrifugés à 1 000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C. Les échantillons de plasma ont été stockés à -20 °C en attendant le dosage ultérieur d'insuline. L'insuline plasmatique a été déterminée en utilisant un kit ELISA (Ultrasensitive Rat Insulin ELISA, Mercodia).

### 3 - Résultats et discussion

Les résultats sont indiqués dans les figures 2A (contrôle : DMSO) et 2B (URO-C).



**Figure 2 :** Effet du DMSO (contrôle, n=17) (A) et de 10 mg/kg d'urolithine C (URO-C, n=6) (B) administrés 2 minutes avant le glucose (1,5g/kg, temps 0) sur l'évolution de la glycémie (bleue) et de l'insulinémie (orange) en fonction du temps lors d'une épreuve d'IPGTT.

Chez les animaux contrôles (« DMSO », 17 animaux), l'administration de 1,5g/kg de glucose se traduit par une élévation de la glycémie qui est maximale à la 10<sup>ème</sup> minute et retourne à une valeur proche de la valeur basale à la 60<sup>ème</sup> minute. En ce qui concerne l'insulinémie, on constate une élévation immédiate qui atteint également un maximum à la 10<sup>ème</sup> minute avec un retour à la 60<sup>ème</sup> minute.

Chez les animaux traités par l'urolithine C (6 animaux), on constate un décalage de la montée glycémique, avec un maximum atteint à la 20<sup>ème</sup> minute et des taux similaires aux contrôles à partir de la 20<sup>ème</sup> minute (temps pour lequel les taux d'urolithine C atteignent leur minimum). En ce qui concerne l'insulinémie, on constate de façon surprenante une réduction de la réponse insulinique chez les animaux traités par l'urolithine C. Les taux sont similaires aux contrôles à la 60<sup>ème</sup> minute.

Deux points sont à considérer pour tenter d'expliquer un tel phénomène :

- ***Un taux d'urolithine C plasmatique atteignant un niveau inhibiteur de la sécrétion d'insuline :***

Nous avons en effet montré (résultats non illustrés), sur la lignée cellulaire INS-1, que la relation effet-concentration de l'urolithine C était biphasique, se traduisant par une sécrétion d'insuline augmentée jusqu'à 100  $\mu$ M, puis une perte de l'effet insulino-sécrétoire à 200  $\mu$ M. Cependant, un tel effet inhibiteur semble peu probable *in vivo*, compte tenu de la valeur du pic de concentration d'urolithine C plasmatique estimé à 40  $\mu$ M (**figure 1**), et ce même s'il n'est toutefois pas exclu que la relation effet/concentration de l'urolithine C puisse être différente *in vitro* et *in vivo*. De plus, un éventuel effet de blocage de la sécrétion d'insuline aurait dû être associé à une élévation de la glycémie, telle qu'elle peut être retrouvée avec un inhibiteur de la sécrétion d'insuline comme le diazoxide.

- ***Un possible effet modulateur de la glycémie indépendant d'une stimulation de la sécrétion d'insuline :***

On peut notamment évoquer un effet de l'urolithine C sur la sensibilité à l'insuline, l'efficacité glucosée (capacité du glucose à stimuler son propre métabolisme), ou encore une diminution de la production hépatique de glucose. Il est en effet connu que des produits ayant ce type d'activité induisent indirectement une réduction de la concentration plasmatique d'insuline, qui s'adapte à une réduction de l'hyperglycémie.

- C'est pourquoi l'hypothèse d'un tel effet de l'urolithine C indépendant de la sécrétion d'insuline a été abordée par l'étude suivante utilisant le modèle *C. elegans*.

### **3.2. Effet de l'urolithine C sur la modulation de la longévité de *Caenorhabditis elegans***

#### **1 - Introduction :**

Les résultats préliminaires obtenus *in vivo* lors des tests de tolérance au glucose pourraient nous orienter vers une activité de type « insulino-sensibilisation » de l'urolithine C. Les « insulino-sensibilisants » sont une classe d'antidiabétiques comprenant la metformine, médicament largement utilisé seul ou en association dans la prise en charge thérapeutique de patients diabétiques de type 2. La metformine permet de normaliser la glycémie en améliorant la captation du glucose par les tissus et en diminuant la néoglucogenèse hépatique. Le mécanisme d'action cellulaire de la metformine correspond à une inhibition partielle du complexe I de la chaîne d'électron dans la mitochondrie conduisant à une déplétion énergétique (augmentation du ratio AMP/ATP) et une activation de l'AMPK.

Par ailleurs, certains polyphénols peuvent également présenter des activités antidiabétiques en améliorant l'utilisation du glucose au niveau des muscles et une réduction de la néoglucogenèse par un mécanisme AMPK dépendant. Le laboratoire de recherche dans lequel j'ai réalisé ma thèse a d'ailleurs publié les effets stimulant de l'AMPK de l'acide chicorique (Schlernitzauer et al., 2013).

Dans la présente étude, nous avons déterminé l'activité « metformine-like » possible de l'urolithine C. Pour cela nous avons choisi d'utiliser le modèle *Caenorhabditis elegans*, déjà utilisé par l'équipe pour démontrer *in vivo* les propriétés de l'acide chicorique.

*C. elegans* est un nématode d'une taille de 1 mm environ, transparent et non parasitaire, découvert dans les années 70 par Sydney Brenner (Brenner, 1974), dont le génome est séquencé en totalité (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). L'utilisation de ce modèle présente des avantages puisque sa méthode de culture est simple, sa durée de vie est courte et sa reproduction est principalement hermaphrodite.

La longévité de *C. elegans* peut être modulée positivement par différents traitements, notamment ceux qui, comme la metformine, sont capables d'augmenter l'activation de la voie de l'AMPK (gène *aak-2* chez *C. elegans*).

## 2 - Matériel et méthodes :

Les expériences de longévité ont été réalisées sur des nématodes *C. elegans* de la souche sauvage N2 provenant du CGC (Caenorhabditis Genetic Center). Les nématodes sont cultivés à 20°C et synchronisés au stade L4 jeunes adultes pour les expériences de longévité.

Ils ont été répartis au nombre de 5 par puits dans des plaques 96 puits, en présence de 200 µL de S-base (milieu de culture) et de Fluorodeoxyuridine (FUdr) un inhibiteur de la synthèse d'ADN permettant de bloquer la reproduction des individus (Mitchell et al., 1979).

L'urolithine C a été ajoutée à la concentration finale choisie : 10 µM, 20 µM ou 50 µM. Chaque condition a été répétée 10 fois, par conséquent 50 nématodes ont été testés pour chaque traitement.

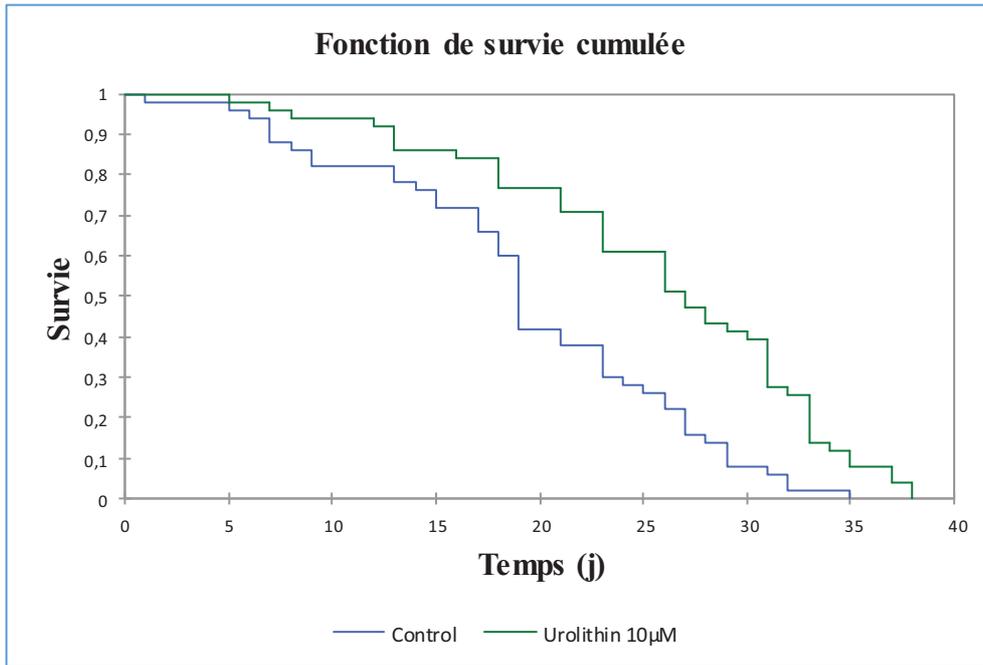
Les nématodes *C. elegans* ont été nourris avec des bactéries de la souche *E. coli* HT115(DE3) tuées par la chaleur.

Les nématodes ont été examinés chaque jour à 20°C afin de vérifier leurs mouvements et leur vitalité. Les nématodes morts ont été comptabilisés.

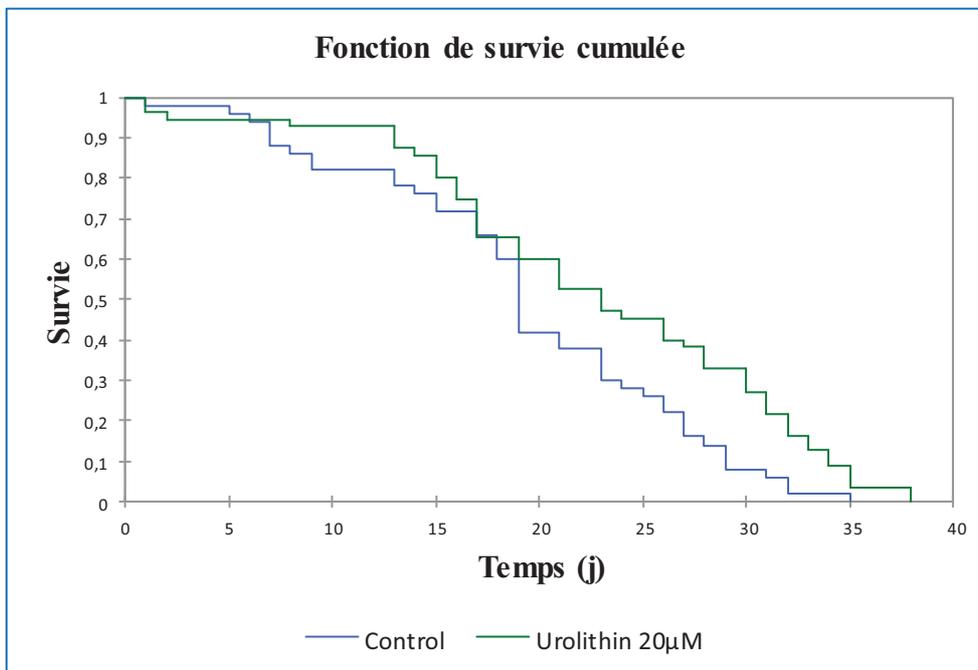
Le logiciel XLSTAT-life statistical software (Addinsoft, New York, NY, USA) a été utilisé pour réaliser les courbes de survie par la méthode Kaplan-Meier. Les différences entre les courbes de survie ont été calculées en utilisant le test LogRank (avec un intervalle de confiance de 95 %). Chaque courbe de survie a été comparée à la courbe de survie obtenue en condition contrôle (*C. elegans* en présence de milieu S-base + FUdr uniquement). Au préalable, nous avons confirmé que le véhicule (DMSO) n'affectait pas la survie de *C. elegans* (résultat non illustré).

## 3-Résultats et discussion :

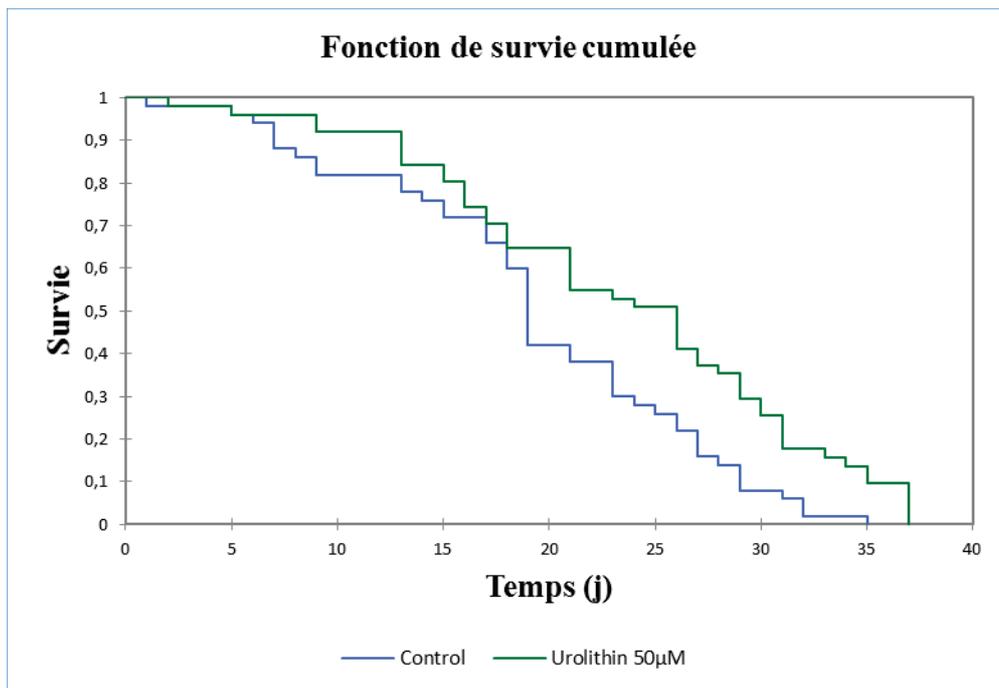
La **figure 2** illustre l'influence de différentes concentrations d'urolithine C sur la durée de vie du nématode. L'urolithine C (10 µM, **fig.2A**) impacte positivement et de façon très significative la durée de vie de la souche sauvage (N2) *C. elegans* avec un temps de survie moyen de  $19,320 \pm 1,129$  jours pour le contrôle et de  $25,608 \pm 1,183$  jours pour l'urolithine C 10 µM (LogRank  $p < 0.0001$ ). Nous avons également observé que des concentrations de 20 µM (**fig. 2B**) et 50 µM (**fig. 2C**) augmentaient la durée de vie des nématodes, bien que la significativité soit plus faible (**tableau 1**).



**Figure 2A :** Effet de l'uroolithine C (10 μM) sur la durée de vie de *C.elegans*.



**Figure 2B :** Effet de l'utolithine C (20 μM) sur la durée de vie de *C. elegans*.



**Figure 3B :** Effet de l'uroolithine C (50  $\mu$ M) sur la durée de vie de *C. elegans*.

Traitement	Médiane (jours)	Temps de survie moyen (jours)	Test LogRank
Contrôle	19	19,320 $\pm$ 1,129	
URO-C 10 $\mu$ M	27	25,608 $\pm$ 1,183	$p < 0,0001$
URO-C 20 $\mu$ M	23	22,909 $\pm$ 1,248	$p = 0,034$
URO-C 50 $\mu$ M	26	23,529 $\pm$ 1,258	$p = 0,023$

**Tableau 1 :** Données quantitatives associées aux courbes de survie obtenues pour différentes concentrations d'uroolithine C ; pour chaque concentration, le test LogRank a été appliqué en comparant la courbe de survie urolithine C par rapport à la courbe de survie contrôle (milieu S-base + FUdr).

**En résumé,** ces résultats indiquent que l'uroolithine C est susceptible, comme la metformine, d'induire une prolongation de la durée de vie du nematode *C. elegans*. L'utilisation de souches mutées pour le gène de l'AMPK (gène *aak-2* chez *C. elegans*) permettra de démontrer avec certitude un effet de l'uroolithine C sur cette voie métabolique.

### 3.3. Conclusion

Ces résultats complémentaires nous ont permis de réaliser une première approche des effets *in vivo* de l'urolithine C. Nous avons pu constater que ses effets insulino-sécrétoires, démontrés par l'utilisation du pancréas isolé perfusé, ne pouvaient être mis en évidence chez le rat « normal » par un test courant d'exploration du métabolisme glucidique tel que l'IPGTT avec détermination de l'insulinémie. Par contre, l'IPGTT nous a permis de détecter des modifications du contrôle glycémique pouvant être mis à profit dans le traitement du diabète type 2.

En effet, il apparaît que l'urolithine C pourrait également avoir un effet de type « insulino-sensibilisant » évoqué à la fois lors des IPGTT par la réduction de l'insulinémie sans augmentation de la glycémie, ainsi que par l'effet prolongateur de la durée de vie du ver *C. elegans*, suggérant un mécanisme d'action lié à la stimulation de la voie AMPK.

Des études ultérieures permettront notamment d'explorer les effets insulino-sécrétoires *in vivo* chez le rat diabétique (rat GK) et de démontrer de façon indiscutable une activité de stimulation de l'AMPK par l'utilisation de souches de *C. elegans* mutées pour cette voie de signalisation.

## **DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE**

Cette thèse abordait la pharmacologie diabétologique des urolithines, molécules issues du métabolisme bactérien colique des ellagitannins, présents notamment dans divers aliments comme les grenades et les noix.

Dans une première partie bibliographique, nous avons rappelé que la cellule  $\beta$  insulino-sécrétrice était au cœur de la physiopathologie du diabète de type 2 et que protéger et/ou améliorer sa fonctionnalité constituait un enjeu thérapeutique majeur. C'est pourquoi la recherche pharmacologique doit s'attacher à découvrir de nouvelles molécules capables de prévenir ou de corriger le processus d'altération de la sécrétion d'insuline.

Dans notre laboratoire d'accueil, cette démarche s'oriente notamment vers l'étude des molécules polyphénoliques. Une recherche très active s'efforce de mettre en évidence des propriétés biologiques *in vitro* et *in vivo* des polyphénols ainsi que des mécanismes d'action associés. Cependant, même si ces molécules sont actives *in vitro*, il est bien décrit dans la littérature qu'une fois consommés, les polyphénols subissent une métabolisation intense et que les molécules circulantes ne sont généralement pas celles qui sont ingérées. Récemment, il est apparu que le microbiote intestinal était également susceptible de créer des molécules biologiquement actives à partir de précurseurs d'origine alimentaire.

Les urolithines A, B, C et D, objets de notre travail, font partie de ces métabolites coliques susceptibles d'être absorbés au niveau intestinal. Ces molécules sont majoritairement étudiées pour leurs activités anti-inflammatoires et anti-prolifératives *in vitro*. Il n'existe toutefois qu'un nombre très limité d'études décrivant une activité biologique *in vivo* à l'exception notable de l'urolithine A, décrite en particulier pour ses propriétés anti-inflammatoires et « anti-vieillesse mitochondriale ».

A ce jour, aucune donnée n'a décrit les potentialités antidiabétiques des urolithines B, C et D et seul un brevet publié en 2012, évoque de façon très marginale le potentiel anti-diabétique de l'urolithine A.

L'objectif de ma thèse était donc de caractériser le potentiel anti-diabétique des urolithines, étudié plus particulièrement dans le domaine de la fonction insulino-sécrétoire.

Dans la partie expérimentale, les travaux présentés *dans un premier article* nous ont permis de déterminer une activité biologique sur la fonctionnalité de la cellule  $\beta$  et de montrer que, parmi les quatre urolithines, l'urolithine C apparaît comme le composé le plus prometteur d'un point de vue thérapeutique notamment grâce à :

- Sa capacité à stimuler de façon glucose-dépendante la sécrétion d'insuline, bien mise en évidence sur un modèle *ex vivo* reproduisant la situation physiologique, le pancréas isolé perfusé ;
- Sa capacité à amplifier la sécrétion d'insuline induite par un analogue GLP-1 ou une sulfonylurée, ouvrant la voie à des associations potentielles visant à optimiser l'effet thérapeutique des médicaments tout en minimisant leurs effets indésirables ;
- Sa capacité à stimuler la sécrétion d'insuline sur des cellules  $\beta$  ne répondant plus au glucose du fait d'une gluco-toxicité (phénomène secondaire à l'hyperglycémie chronique).

Nous avons également abordé le mécanisme cellulaire de l'urolithine C et déterminé que son effet insulino-sécrétoire pourrait être médié par une augmentation de l'entrée intracellulaire de calcium en rapport avec une augmentation de sensibilité des canaux calciques de type L régulés par le voltage.

Dans un objectif de développement de l'urolithine C comme médicament anti-diabétique, nous avons abordé *dans un second article* publié en 2016 la mise au point d'une méthodologie de dosage plasmatique de l'urolithine C dans le plasma de rat par chromatographie liquide / ionisation electrospray / spectrographie de masse en tandem. Cet article intègre également une première étude pharmacocinétique de l'urolithine C (10 mg/kg) après injection par voie intrapéritonéale. La modélisation des taux plasmatiques suggère un probable stockage tissulaire de la molécule. Cette étude a donc constitué une étape indispensable à la mise au point d'une forme pharmaceutique et de conditions d'administration susceptibles de permettre l'obtention de concentrations plasmatiques d'urolithine C actives *in vivo*.

Suite à cette étude, nous avons effectué une première étude des effets *in vivo* de l'urolithine C (10 mg/kg) sur la glycémie et l'insulinémie chez le rat « normal » après un test de tolérance au glucose par voie intra-péritonéale (IPGTT). De façon surprenante l'urolithine C est plutôt apparue comme susceptible d'augmenter l'utilisation périphérique du glucose ou diminuer la néoglucogénèse selon un mécanisme qui pourrait être similaire à celui de la metformine.

Cet aspect a donc été abordé sur le modèle du nématode *C. elegans*, pour lequel la metformine prolonge la durée de vie par un mécanisme d'activation de la voie métabolique de l'AMP kinase. Cette hypothèse doit toutefois être confortée par l'utilisation de nématodes mutés pour cette voie métabolique.

En résumé, notre travail ouvre des perspectives de valorisation de l'urolithine C qui devront passer par la détermination de son activité antidiabétique, notamment sur le rat GK qui

constitue le modèle le mieux adapté à la détermination de l'activité de molécules corrigeant le déficit insulino-sécrétoire.

Dans cette perspective, un partenariat industriel visant à la valorisation de l'urolithine C vient d'être mis en place avec le soutien de la Société d'Accélération du Transfert de Technologie (SATT) AxLR.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Ampudia-Blasco, F.J., Romera, I., Ariño, B., and Gomis, R. (2017). Following the results of the EMPA-REG OUTCOME trial with empagliflozin, is it possible to speak of a class effect? *Int. J. Gen. Med. Volume 10*, 23–26.
- Andreux, M., Schneider, B., Rinsch, C.,L., Sandi, C., Auwerx, J., Pirinen, E., Thomas, C., Houtkooper, R., Blanco-Bose, W., Mouchiroud, L., Genoux, D. (2012). Compositions and methods for improving mitochondrial function and treating neurodegenerative diseases and cognitive disorders. Patent WO2012/088519 A2, PTC/US2011/067229.
- Andrikopoulos, S., Rosella, G., Gaskin, E., Thorburn, A., Kaczmarczyk, S., Zajac, J.D., and Proietto, J. (1993). Impaired regulation of hepatic fructose-1,6-bisphosphatase in the New Zealand obese mouse model of NIDDM. *Diabetes* 42, 1731–1736.
- Anhê, F.F., Desjardins, Y., Pilon, G., Dudonné, S., Genovese, M.I., Lajolo, F.M., and Marette, A. (2013). Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. *PharmaNutrition* 1, 105–114.
- Anhê, F.F., Pilon, G., Roy, D., Desjardins, Y., Levy, E., and Marette, A. (2016). Triggering *Akkermansia* with dietary polyphenols: A new weapon to combat the metabolic syndrome? *Gut Microbes* 7, 146–153.
- Bachar, E., Ariav, Y., Ketzinel-Gilad, M., Cerasi, E., Kaiser, N., and Leibowitz, G. (2009). Glucose Amplifies Fatty Acid-Induced Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic  $\beta$ -Cells via Activation of mTORC1. *PLoS ONE* 4, e4954.
- Back, S.H., and Kaufman, R.J. (2012). Endoplasmic Reticulum Stress and Type 2 Diabetes. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 767–793.
- Bader, E., Migliorini, A., Gegg, M., Moruzzi, N., Gerdes, J., Roscioni, S.S., Bakhti, M., Brandl, E., Irmeler, M., Beckers, J., et al. (2016). Identification of proliferative and mature  $\beta$ -cells in the islets of Langerhans. *Nature* 535, 430–434.
- Bardy, G., Virsolvy, A., Quignard, J.F., Ravier, M.A., Bertrand, G., Dalle, S., Cros, G., Magous, R., Richard, S., and Oiry, C. (2013). Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells: Quercetin increases L-type Ca currents in beta cells. *Br. J. Pharmacol.* 169, 1102–1113.
- Bergsten, P. (2000). Pathophysiology of impaired pulsatile insulin release. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 16, 179–191.
- Bertrand, G. (2002). The Elevation of Glutamate Content and the Amplification of Insulin Secretion in Glucose-stimulated Pancreatic Islets Are Not Causally Related. *J. Biol. Chem.* 277, 32883–32891.
- den Besten, G., Bleeker, A., Gerding, A., van Eunen, K., Havinga, R., van Dijk, T.H., Oosterveer, M.H., Jonker, J.W., Groen, A.K., Reijngoud, D.-J., et al. (2015). Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPAR $\gamma$ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes* 64, 2398–2408.
- Bhatt, J.K., Thomas, S., and Nanjan, M.J. (2012). Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Res.* 32, 537–541.
- Bhattacharjee, A., Whitehurst, R.M., Zhang, M., Wang, L., and Li, M. (1997). T-type calcium channels facilitate insulin secretion by enhancing general excitability in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *Endocrinology* 138, 3735–3740.

Bialonska, D., Kasimsetty, S.G., Khan, S.I., and Ferreira, D. (2009). Urolithins, Intestinal Microbial Metabolites of Pomegranate Ellagitannins, Exhibit Potent Antioxidant Activity in a Cell-Based Assay. *J. Agric. Food Chem.* *57*, 10181–10186.

Bilous, R., Donnelly, R., (2014). *Handbook of Diabetes*, 4th Edition, Excerpt #4: Normal Physiology of Insulin Secretion and Action.

Bonner-Weir, S., and Aguayo-Mazzucato, C. (2016). Physiology: Pancreatic  $\beta$ -cell heterogeneity revisited. *Nature* *535*, 365–366.

Bordone, L., Motta, M.C., Picard, F., Robinson, A., Jhala, U.S., Apfeld, J., McDonagh, T., Lemieux, M., McBurney, M., Szilvasi, A., et al. (2005). Sirt1 Regulates Insulin Secretion by Repressing UCP2 in Pancreatic  $\beta$  Cells. *PLOS Biol.* *4*, e31.

Boulangé, C.L., Neves, A.L., Chilloux, J., Nicholson, J.K., and Dumas, M.-E. (2016). Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med.* *8*.

Braun, M., Ramracheya, R., Bengtsson, M., Zhang, Q., Karanauskaite, J., Partridge, C., Johnson, P.R., and Rorsman, P. (2008). Voltage-Gated Ion Channels in Human Pancreatic  $\beta$ -Cells: Electrophysiological Characterization and Role in Insulin Secretion. *Diabetes* *57*, 1618–1628.

Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *77*, 71–94.

Briaud, I., Lingohr, M.K., Dickson, L.M., Wrede, C.E., and Rhodes, C.J. (2003). Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70S6K by glucose in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* *52*, 974–983.

Brissova, M., Fowler, M.J., Nicholson, W.E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D.M., and Powers, A.C. (2005). Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* *53*, 1087–1097.

Brixel, L.R., Monteilh-Zoller, M.K., Ingenbrandt, C.S., Fleig, A., Penner, R., Enklaar, T., Zabel, B.U., and Prawitt, D. (2010). TRPM5 regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* *460*, 69–76.

Buraei, Z., and Yang, J. (2013). Structure and function of the  $\beta$  subunit of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1828*, 1530–1540.

Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003).  $\beta$ -cell deficit and increased  $\beta$ -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* *52*, 102–110.

C. elegans Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* *282*, 2012–2018.

Cai, E.P., and Lin, J.-K. (2009). Epigallocatechin Gallate (EGCG) and Rutin Suppress the Glucotoxicity through Activating IRS2 and AMPK Signaling in Rat Pancreatic  $\beta$  Cells. *J. Agric. Food Chem.* *57*, 9817–9827.

Canfora, E.E., Jocken, J.W., and Blaak, E.E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat. Rev. Endocrinol.* *11*, 577–591.

Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., et al. (2007a). Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* *56*, 1761–1772.

Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R.G., Tuohy, K.M., Gibson, G.R., and Delzenne, N.M. (2007b). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50, 2374–2383.

Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., and Burcelin, R. (2008). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* 57, 1470–1481.

Catterall, W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 521–555.

Catterall, W.A. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 411–425.

Cerdá, B., Llorach, R., Cerón, J.J., Espín, J.C., and Tomás-Barberán, F.A. (2003). Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur. J. Nutr.* 42, 18–28.

Cerdá, B., Espín, J.C., Parra, S., Martínez, P., and Tomás-Barberán, F.A. (2004). The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur. J. Nutr.* 43, 205–220.

Cerdá, B., Periago, P., Espín, J.C., and Tomás-Barberán, F.A. (2005a). Identification of Urolithin A as a Metabolite Produced by Human Colon Microflora from Ellagic Acid and Related Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5571–5576.

Cerdá, B., Tomás-Barberán, F.A., and Espín, J.C. (2005b). Metabolism of Antioxidant and Chemopreventive Ellagitannins from Strawberries, Raspberries, Walnuts, and Oak-Aged Wine in Humans: Identification of Biomarkers and Individual Variability. *J. Agric. Food Chem.* 53, 227–235.

Cermak, R., Landgraf, S., and Wolfram, S. (2004). Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum. *Br. J. Nutr.* 91, 849.

Chan, C.B., De Leo, D., Joseph, J.W., McQuaid, T.S., Ha, X.F., Xu, F., Tsushima, R.G., Pennefather, P.S., Salapatek, A.M., and Wheeler, M.B. (2001). Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* 50, 1302–1310.

Chan, C.B., Saleh, M.C., Koshkin, V., and Wheeler, M.B. (2004). Uncoupling protein 2 and islet function. *Diabetes* 53, S136–S142.

Chankiewitz, E., Peschke, D., Herberg, L., Bazwinsky, I., Mühlbauer, E., Brömme, H.-J., and Peschke, E. (2006). Did the gradual loss of GLUT2 cause a shift to diabetic disorders in the New Zealand obese mouse (NZO/HI)? *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* 114, 262–269.

Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., More, K.J., Breitbart, R.E., et al. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84, 491–495.

Cheng, H., Beck, A., Launay, P., Gross, S.A., Stokes, A.J., Kinet, J.-P., Fleig, A., and Penner, R. (2007). TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Cell Calcium* 41, 51–61.

- Chinopoulos, C., and Adam-Vizi, V. (2010). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> sequestration and precipitation revisited. *FEBS J.* *277*, 3637–3651.
- Chun, O.K., Chung, S.J., and Song, W.O. (2007). Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of US adults. *J. Nutr.* *137*, 1244–1252.
- Colsoul, B., Vennekens, R., and Nilius, B. (2011). Transient Receptor Potential Cation Channels in Pancreatic  $\beta$  Cells. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 161, S.G. Amara, E. Bamberg, B.K. Fleischmann, T. Gudermann, R. Jahn, W.J. Lederer, R. Lill, B. Nilius, and S. Offermanns, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 87–110.
- Control, D.I. (2014). *Handbook of Diabetes*, 4th Edition, Excerpt #4: Normal Physiology of Insulin Secretion and Action.
- Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., and Oter, S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol. Res.* *51*, 117–123.
- Côté, C.D., Rasmussen, B.A., Duca, F.A., Zadeh-Tahmasebi, M., Baur, J.A., Daljeet, M., Breen, D.M., Filippi, B.M., and Lam, T.K.T. (2015). Resveratrol activates duodenal Sirt1 to reverse insulin resistance in rats through a neuronal network. *Nat. Med.* *21*, 498–505.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., and Clifford, M.N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* *26*, 1001.
- Dadi, P.K., Vierra, N.C., Ustione, A., Piston, D.W., Colbran, R.J., and Jacobson, D.A. (2014). Inhibition of Pancreatic  $\beta$ -Cell Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Reduces Glucose-stimulated Calcium Influx and Insulin Secretion, Impairing Glucose Tolerance. *J. Biol. Chem.* *289*, 12435–12445.
- Davies, A., Hendrich, J., Van Minh, A.T., Wratten, J., Douglas, L., and Dolphin, A.C. (2007). Functional biology of the  $\alpha\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol. Sci.* *28*, 220–228.
- Day, A.J., Cañada, F.J., Díaz, J.C., Kroon, P.A., Mclauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R., and Williamson, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* *468*, 166–170.
- de la Cruz, L., Puente, E.I., Reyes-Vaca, A., Arenas, I., Garduño, J., Bravo-Martínez, J., and Garcia, D.E. (2016). PIP<sub>2</sub> in pancreatic  $\beta$ -cells regulates voltage-gated calcium channels by a voltage-independent pathway. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *311*, C630–C640.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., and Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxid. Redox Signal.* *18*, 1818–1892.
- Dellafiora, L., Mena, P., Cozzini, P., Brighenti, F., and Rio, D.D. (2013). Modelling the possible bioactivity of ellagitannin-derived metabolites. In silico tools to evaluate their potential xenoestrogenic behavior. *Food Funct.* *4*, 1442–1451.
- Delmeire, D., Flamez, D., Hinke, S.A., Cali, J.J., Pipeleers, D., and Schuit, F. (2003). Type VIII adenylyl cyclase in rat beta cells: coincidence signal detector/generator for glucose and GLP-1. *Diabetologia* *46*, 1383–1393.

DiGruccio, M.R., Mawla, A.M., Donaldson, C.J., Noguchi, G.M., Vaughan, J., Cowing-Zitron, C., van der Meulen, T., and Huising, M.O. (2016). Comprehensive alpha, beta and delta cell transcriptomes reveal that ghrelin selectively activates delta cells and promotes somatostatin release from pancreatic islets. *Mol. Metab.* 5, 449–458.

Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., and Raptis, S.A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93, S52–S59.

Ding, M., Bhupathiraju, S.N., Chen, M., van Dam, R.M., and Hu, F.B. (2014). Caffeinated and Decaffeinated Coffee Consumption and Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and a Dose-Response Meta-analysis. *Diabetes Care* 37, 569–586.

Donath, M.Y. (2014). Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 465–476.

Donelan, M.J., Morfini, G., Julyan, R., Sommers, S., Hays, L., Kajio, H., Briaud, I., Easom, R.A., Molkentin, J.D., Brady, S.T., et al. (2002). Ca<sup>2+</sup>-dependent Dephosphorylation of Kinesin Heavy Chain on  $\beta$ -Granules in Pancreatic  $\beta$ -Cells: IMPLICATIONS FOR REGULATED  $\beta$ -GRANULE TRANSPORT AND INSULIN EXOCYTOSIS. *J. Biol. Chem.* 277, 24232–24242.

Dorrell, C., Schug, J., Canaday, P.S., Russ, H.A., Tarlow, B.D., Grompe, M.T., Horton, T., Hebrok, M., Streeter, P.R., Kaestner, K.H., et al. (2016). Human islets contain four distinct subtypes of  $\beta$  cells. *Nat. Commun.* 7, 11756.

Dubois, M., Vacher, P., Roger, B., Huyghe, D., Vandewalle, B., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Moustaid-Moussa, N., and Lang, J. (2007). Glucotoxicity inhibits late steps of insulin exocytosis. *Endocrinology* 148, 1605–1614.

Dufresne, M. (2006). Cholecystokinin and Gastrin Receptors. *Physiol. Rev.* 86, 805–847.

El Azzouny, M., Longacre, M.J., Ansari, I.H., Kennedy, R.T., Burant, C.F., and MacDonald, M.J. (2016). Knockdown of ATP citrate lyase in pancreatic beta cells does not inhibit insulin secretion or glucose flux and implicates the acetoacetate pathway in insulin secretion. *Mol. Metab.* 5, 980–987.

Espín, J.C., González-Barrio, R., Cerdá, B., López-Bote, C., Rey, A.I., and Tomás-Barberán, F.A. (2007). Iberian Pig as a Model To Clarify Obscure Points in the Bioavailability and Metabolism of Ellagitannins in Humans. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10476–10485.

Espín, J.C., Larrosa, M., García-Conesa, M.T., and Tomás-Barberán, F. (2013). Biological Significance of Urolithins, the Gut Microbial Ellagic Acid-Derived Metabolites: The Evidence So Far. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013, 1–15.

Ferdaoussi, M., and MacDonald, P.E. (2017). Toward Connecting Metabolism to the Exocytotic Site. *Trends Cell Biol.* 27, 163–171.

Fève, B., and Bastard, J.-P. (2009). The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5, 305–311.

FOSKETT, J.K., WHITE, C., CHEUNG, K.-H., and MAK, D.-O.D. (2007). Inositol Trisphosphate Receptor Ca<sup>2+</sup> Release Channels. *Physiol. Rev.* 87, 593–658.

Freedland, S.J., Carducci, M., Kroeger, N., Partin, A., Rao, J. -y., Jin, Y., Kerkoutian, S., Wu, H., Li, Y., Creel, P., et al. (2013). A Double-Blind, Randomized, Neoadjuvant Study of the Tissue Effects of POMx

- Pills in Men with Prostate Cancer Before Radical Prostatectomy. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* *6*, 1120–1127.
- Fu, Z., Gilbert, E.R., and Liu, D. (2013). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* *9*, 25–53.
- Fullerton, M.D., and Steinberg, G.R. (2010). SIRT1 Takes a Backseat to AMPK in the Regulation of Insulin Sensitivity by Resveratrol. *Diabetes* *59*, 551–553.
- Funke, I., and Melzig, M.F. (2005). Effect of different phenolic compounds on alpha-amylase activity: screening by microplate-reader based kinetic assay. *Pharm.* *60*, 796–797.
- Galli, T., Martinez-Arca, S., and Paumet, F. (2002). Mécanisme de la fusion membranaire. *Médecine/Sciences* *18*, 1113–1119.
- Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Ward, R.E., Martin, R.J., Lefevre, M., Cefalu, W.T., and Ye, J. (2009). Butyrate Improves Insulin Sensitivity and Increases Energy Expenditure in Mice. *Diabetes* *58*, 1509–1517.
- García-Villalba, R., Beltrán, D., Espín, J.C., Selma, M.V., and Tomás-Barberán, F.A. (2013). Time Course Production of Urolithins from Ellagic Acid by Human Gut Microbiota. *J. Agric. Food Chem.* *61*, 8797–8806.
- Ge, H., Li, X., Weiszmann, J., Wang, P., Baribault, H., Chen, J.-L., Tian, H., and Li, Y. (2008). Activation of G Protein-Coupled Receptor 43 in Adipocytes Leads to Inhibition of Lipolysis and Suppression of Plasma Free Fatty Acids. *Endocrinology* *149*, 4519–4526.
- Ghavipour, M., Sotoudeh, G., Tavakoli, E., Mowla, K., Hasanzadeh, J., and Mazloom, Z. (2017). Pomegranate extract alleviates disease activity and some blood biomarkers of inflammation and oxidative stress in Rheumatoid Arthritis patients. *Eur. J. Clin. Nutr.* *71*, 92–96.
- Gilon, P., and Henquin, J.C. (2001). Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr. Rev.* *22*, 565–604.
- Gilon, P., Ravier, M.A., Jonas, J.-C., and Henquin, J.-C. (2002). Control Mechanisms of the Oscillations of Insulin Secretion In Vitro and In Vivo. *Diabetes* *51*, S144–S151.
- Gilon, P., Chae, H.-Y., Rutter, G.A., and Ravier, M.A. (2014). Calcium signaling in pancreatic  $\beta$ -cells in health and in Type 2 diabetes. *Cell Calcium* *56*, 340–361.
- Giménez-Bastida, J.A., Larrosa, M., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F., Espín, J.C., and García-Conesa, M.-T. (2012a). Intestinal Ellagitannin Metabolites Ameliorate Cytokine-Induced Inflammation and Associated Molecular Markers in Human Colon Fibroblasts. *J. Agric. Food Chem.* *60*, 8866–8876.
- Giménez-Bastida, J.A., González-Sarrías, A., Larrosa, M., Tomás-Barberán, F., Espín, J.C., and García-Conesa, M.-T. (2012b). Ellagitannin metabolites, urolithin A glucuronide and its aglycone urolithin A, ameliorate TNF- $\alpha$ -induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* *56*, 784–796.
- Giorgio, C., Mena, P., Del Rio, D., Brighenti, F., Barocelli, E., Hassan-Mohamed, I., Callegari, D., Lodola, A., and Tognolini, M. (2015). The ellagitannin colonic metabolite urolithin D selectively inhibits EphA2 phosphorylation in prostate cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res.* *59*, 2155–2167.

- Glass, C.K., and Olefsky, J.M. (2012). Inflammation and Lipid Signaling in the Etiology of Insulin Resistance. *Cell Metab.* *15*, 635–645.
- Gonzalez-Barrio, R., Edwards, C.A., and Crozier, A. (2011). Colonic Catabolism of Ellagitannins, Ellagic Acid, and Raspberry Anthocyanins: In Vivo and In Vitro Studies. *Drug Metab. Dispos.* *39*, 1680–1688.
- González-Sarrías, A., Espín, J.-C., Tomás-Barberán, F.A., and García-Conesa, M.-T. (2009). Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins. *Mol. Nutr. Food Res.* *53*, 686–698.
- González-Sarrías, A., Giménez-Bastida, J.A., García-Conesa, M.T., Gómez-Sánchez, M.B., García-Talavera, N.V., Gil-Izquierdo, A., Sánchez-Álvarez, C., Fontana-Compiano, L.O., Morga-Egea, J.P., Pastor-Quirante, F.A., et al. (2010a). Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites and proliferation markers expression response in the human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice. *Mol. Nutr. Food Res.* *54*, 311–322.
- González-Sarrías, A., Larrosa, M., Tomás-Barberán, F.A., Dolara, P., and Espín, J.C. (2010b). NF- $\kappa$ B-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts. *Br. J. Nutr.* *104*, 503–512.
- González-Sarrías, A., Giménez-Bastida, J.A., Núñez-Sánchez, M.Á., Larrosa, M., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F.A., and Espín, J.C. (2014). Phase-II metabolism limits the antiproliferative activity of urolithins in human colon cancer cells. *Eur. J. Nutr.* *53*, 853–864.
- González-Sarrías, A., Tomé-Carneiro, J., Bellesia, A., Tomás-Barberán, F.A., and Espín, J.C. (2015). The ellagic acid-derived gut microbiota metabolite, urolithin A, potentiates the anticancer effects of 5-fluorouracil chemotherapy on human colon cancer cells. *Food Funct.* *6*, 1460–1469.
- González-Sarrías, A., Núñez-Sánchez, M.Á., Tomé-Carneiro, J., Tomás-Barberán, F.A., García-Conesa, M.T., and Espín, J.C. (2016a). Comprehensive characterization of the effects of ellagic acid and urolithins on colorectal cancer and key-associated molecular hallmarks: MicroRNA cell specific induction of *CDKN1A* (p21) as a common mechanism involved. *Mol. Nutr. Food Res.* *60*, 701–716.
- González-Sarrías, A., García-Villalba, R., Romo-Vaquero, M., Alasalvar, C., Örem, A., Zafrilla, P., Tomás-Barberán, F.A., Selma, M.V., and Espín, J.C. (2016b). Clustering according to urolithin metabolite explains the interindividual variability in the improvement of cardiovascular risk biomarkers in overweight-obese individuals consuming pomegranate: A randomised clinical trial. *Mol. Nutr. Food Res.* n/a-n/a.
- GOTO, Y., Kakizaki, M., and Masaki, N. (1976). Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J. Exp. Med.* *119*, 85–90.
- Grankvist, K., Marklund, S.L., and Täljedal, I.B. (1981). CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem. J.* *199*, 393–398.
- Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 415–445.
- Han, Q.-A., Yan, C., Wang, L., Li, G., Xu, Y., and Xia, X. (2016). Urolithin A attenuates ox-LDL-induced endothelial dysfunction partly by modulating microRNA-27 and ERK/PPAR- $\gamma$  pathway. *Mol. Nutr. Food Res.* *60*, 1933–1943.

- Harborne, J.B., and Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.
- Harmon, J.S., Stein, R., and Robertson, R.P. (2005). Oxidative Stress-mediated, Post-translational Loss of MafA Protein as a Contributing Mechanism to Loss of Insulin Gene Expression in Glucotoxic Beta Cells. *J. Biol. Chem.* 280, 11107–11113.
- Harte, A.L., Varma, M.C., Tripathi, G., McGee, K.C., Al-Daghri, N.M., Al-Attas, O.S., Sabico, S., O’Hare, J.P., Ceriello, A., Saravanan, P., et al. (2012). High Fat Intake Leads to Acute Postprandial Exposure to Circulating Endotoxin in Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes Care* 35, 375–382.
- HAS, (2013). [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2015-02/7v\\_referentiel\\_2clics\\_diabete\\_060215.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2015-02/7v_referentiel_2clics_diabete_060215.pdf)
- Henning, S., Yang, J., Carlson, P., Finegold, S., Heber, D., and Li, Z. (2015). Formation of Urolithins in Normal Volunteers Following Pomegranate Extract Consumption for 28 Days is Associated with Differences in the Gut Microflora Population. *FASEB J.* 29, 924.30.
- Henquin, J.-C. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49, 1751–1760.
- Henquin, J.C. (2009). Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52, 739–751.
- Hidalgo, J., Flores, C., Hidalgo, M.A., Perez, M., Yañez, A., Quiñones, L., Caceres, D.D., and Burgos, R.A. (2014). Delphinol® standardized maqui berry extract reduces postprandial blood glucose increase in individuals with impaired glucose regulation by novel mechanism of sodium glucose cotransporter inhibition. *Panminerva Med* 56, 1–7.
- Holst, J.J. (2007). The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiol. Rev.* 87, 1409–1439.
- Huang, C., Lin, C., Haataja, L., Gurlo, T., Butler, A.E., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2007). High Expression Rates of Human Islet Amyloid Polypeptide Induce Endoplasmic Reticulum Stress–Mediated  $\beta$ -Cell Apoptosis, a Characteristic of Humans With Type 2 but Not Type 1 Diabetes. *Diabetes* 56, 2016–2027.
- Hughes, E., Lee, A.K., and Tse, A. (2006). Dominant Role of Sarcoendoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Pump in  $\text{Ca}^{2+}$  Homeostasis and Exocytosis in Rat Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Endocrinology* 147, 1396–1407.
- Imprialos, K., Faselis, C., Boutari, C., Stavropoulos, K., Athyros, V., Karagiannis, A., and Doumas, M. (2017). SGLT-2 inhibitors and cardiovascular risk in diabetes mellitus: A comprehensive and critical review of the literature. *Curr. Pharm. Des.*
- Ionescu-Tirgoviste, C., Gagniuc, P.A., Gubceac, E., Mardare, L., Popescu, I., Dima, S., and Militaru, M. (2015). A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Sci. Rep.* 5, 14634.
- Ishimoto, H., Shibata, M., Myojin, Y., Ito, H., Sugimoto, Y., Tai, A., and Hatano, T. (2011). In vivo anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 5901–5904.
- Ivarsson, R., Quintens, R., Dejonghe, S., Tsukamoto, K., Renström, E., Schuit, F.C., and others (2005). Redox Control of Exocytosis. *Diabetes* 54, 2132–2142.

- Janson, Juliet., Soeller, W.C., Roche, P.C., Nelson, R.T., Torchia, A.J., Kreutter, D.K., and Butler, P.C. (1996). Spontaneous diabetes mellitus in transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 7283–7288.
- Jayaprakasam, B., Vareed, S.K., Olson, L.K., and Nair, M.G. (2005). Insulin Secretion by Bioactive Anthocyanins and Anthocyanidins Present in Fruits. *J. Agric. Food Chem.* *53*, 28–31.
- Jin, J.-S., Touyama, M., Hisada, T., and Benno, Y. (2012). Effects of green tea consumption on human fecal microbiota with special reference to *Bifidobacterium* species: Effects of green tea on fecal microbiota. *Microbiol. Immunol.* *56*, 729–739.
- Jing, X., Li, D.-Q., Olofsson, C.S., Salehi, A., Surve, V.V., Caballero, J., Ivarsson, R., Lundquist, I., Pereverzev, A., Schneider, T., et al. (2005). CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *J. Clin. Invest.* *115*, 146–154.
- Johnson, A.M.F., and Olefsky, J.M. (2013). The Origins and Drivers of Insulin Resistance. *Cell* *152*, 673–684.
- Johnston, K., Sharp, P., Clifford, M., and Morgan, L. (2005). Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett.* *579*, 1653–1657.
- Johnston, N.R., Mitchell, R.K., Haythorne, E., Pessoa, M.P., Semplici, F., Ferrer, J., Piemonti, L., Marchetti, P., Bugliani, M., Bosco, D., et al. (2016). Beta Cell Hubs Dictate Pancreatic Islet Responses to Glucose. *Cell Metab.* *24*, 389–401.
- Jornayvaz, F.R., and Shulman, G.I. (2012). Diacylglycerol Activation of Protein Kinase C $\epsilon$  and Hepatic Insulin Resistance. *Cell Metab.* *15*, 574–584.
- Kang, M.-G., and Campbell, K.P. (2003). Subunit of Voltage-activated Calcium Channels. *J. Biol. Chem.* *278*, 21315–21318.
- Kang, I., Buckner, T., Shay, N.F., Gu, L., and Chung, S. (2016a). Improvements in Metabolic Health with Consumption of Ellagic Acid and Subsequent Conversion into Urolithins: Evidence and Mechanisms. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* *7*, 961–972.
- Kang, I., Kim, Y., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., and Chung, S. (2016b). Urolithin A, C, and D, but not iso-urolithin A and urolithin B, attenuate triglyceride accumulation in human cultures of adipocytes and hepatocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* *60*, 1129–1138.
- Kang, L., He, Z., Xu, P., Fan, J., Betz, A., Brose, N., and Xu, T. (2006). Munc13-1 is required for the sustained release of insulin from pancreatic  $\beta$  cells. *Cell Metab.* *3*, 463–468.
- Karaskov, E., Scott, C., Zhang, L., Teodoro, T., Ravazzola, M., and Volchuk, A. (2006). Chronic Palmitate But Not Oleate Exposure Induces Endoplasmic Reticulum Stress, Which May Contribute to INS-1 Pancreatic  $\beta$ -Cell Apoptosis. *Endocrinology* *147*, 3398–3407.
- Karlsson, F., Tremaroli, V., Nielsen, J., and Bäckhed, F. (2013). Assessing the Human Gut Microbiota in Metabolic Diseases. *Diabetes* *62*, 3341–3349.
- Kasimsetty, S.G., Bialonska, D., Reddy, M.K., Thornton, C., Willett, K.L., and Ferreira, D. (2009). Effects of Pomegranate Chemical Constituents/Intestinal Microbial Metabolites on CYP1B1 in 22Rv1 Prostate Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* *57*, 10636–10644.

- Kasimsetty, S.G., Bialonska, D., Reddy, M.K., Ma, G., Khan, S.I., and Ferreira, D. (2010). Colon Cancer Chemopreventive Activities of Pomegranate Ellagitannins and Urolithins. *J. Agric. Food Chem.* *58*, 2180–2187.
- Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., and Natori, T. (1994). OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat: a new NIDDM rat strain. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *24 Suppl*, S317-320.
- Kim, E.-K., Kwon, K.-B., Song, M.-Y., Han, M.-J., Lee, J.-H., Lee, Y.-R., Lee, J.-H., Ryu, D.-G., Park, B.-H., and Park, J.-W. (2007). Flavonoids protect against cytokine-induced pancreatic beta-cell damage through suppression of nuclear factor kappaB activation. *Pancreas* *35*, e1-9.
- Kim, J.H., Stewart, T.P., Zhang, W., Kim, H.Y., Nishina, P.M., and Naggert, J.K. (2005). Type 2 diabetes mouse model TallyHo carries an obesity gene on chromosome 6 that exaggerates dietary obesity. *Physiol. Genomics* *22*, 171–181.
- Kim, Y., Keogh, J., and Clifton, P. (2016). Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients* *8*, 17.
- King, A.J. (2012). The use of animal models in diabetes research: Animal models of diabetes. *Br. J. Pharmacol.* *166*, 877–894.
- Kitada, M., Ogura, Y., and Koya, D. (2016). Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations. *Int. J. Nephrol. Renov. Dis.* *Volume 9*, 279–290.
- Kittl, M., Beyreis, M., Tumurkhuu, M., Fürst, J., Helm, K., Pitschmann, A., Gaisberger, M., Glasl, S., Ritter, M., and Jakab, M. (2016). Quercetin Stimulates Insulin Secretion and Reduces the Viability of Rat INS-1 Beta-Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* *39*, 278–293.
- Kwon, H., and Pessin, J.E. (2013). Adipokines Mediate Inflammation and Insulin Resistance. *Front. Endocrinol.* *4*.
- Landete, J.M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Res. Int.* *44*, 1150–1160.
- Larrosa, M., González-Sarrías, A., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F.A., and Espín, J.C. (2006). Urolithins, Ellagic Acid-Derived Metabolites Produced by Human Colonic Microflora, Exhibit Estrogenic and Antiestrogenic Activities. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 1611–1620.
- Larrosa, M., González-Sarrías, A., Yáñez-Gascón, M.J., Selma, M.V., Azorín-Ortuño, M., Toti, S., Tomás-Barberán, F., Dolara, P., and Espín, J.C. (2010). Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism☆. *J. Nutr. Biochem.* *21*, 717–725.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., et al. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* *500*, 541–546.
- Lee, Y.-E., Kim, J.-W., Lee, E.-M., Ahn, Y.-B., Song, K.-H., Yoon, K.-H., Kim, H.-W., Park, C.-W., Li, G., Liu, Z., et al. (2012). Chronic Resveratrol Treatment Protects Pancreatic Islets against Oxidative Stress in db/db Mice. *PLoS ONE* *7*.
- Lefèbvre, P.J., Paolisso, G., Scheen, A.J., and Henquin, J.C. (1987). Pulsatility of insulin and glucagon release: physiological significance and pharmacological implications. *Diabetologia* *30*, 443–452.

- Li, Y.V. (2014). Zinc and insulin in pancreatic beta-cells. *Endocrine* 45, 178–189.
- Li, D., Zhang, Y., Liu, Y., Sun, R., and Xia, M. (2015a). Purified Anthocyanin Supplementation Reduces Dyslipidemia, Enhances Antioxidant Capacity, and Prevents Insulin Resistance in Diabetic Patients. *J. Nutr.* 145, 742–748.
- Li, Z., Henning, S.M., Lee, R.-P., Lu, Q.-Y., Summanen, P.H., Thames, G., Corbett, K., Downes, J., Tseng, C.-H., Finegold, S.M., et al. (2015b). Pomegranate extract induces ellagitannin metabolite formation and changes stool microbiota in healthy volunteers. *Food Funct* 6, 2487–2495.
- Liang, H., Hussey, S.E., Sanchez-Avila, A., Tantiwong, P., and Musi, N. (2013). Effect of Lipopolysaccharide on Inflammation and Insulin Action in Human Muscle. *PLoS ONE* 8, e63983.
- Liao, Y., Plummer, N.W., George, M.D., Abramowitz, J., Zhu, M.X., and Birnbaumer, L. (2009). A role for Orai in TRPC-mediated Ca<sup>2+</sup> entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3202–3206.
- Lindström, P. (2007). The Physiology of Obese-Hyperglycemic Mice [ *ob/ob* Mice]. *Sci. World J.* 7, 666–685.
- Longuet, C., Broca, C., Costes, S., Hani, E.H., Bataille, D., and Dalle, S. (2005). Extracellularly Regulated Kinases 1/2 (p44/42 Mitogen-Activated Protein Kinases) Phosphorylate Synapsin I and Regulate Insulin Secretion in the MIN6  $\beta$ -Cell Line and Islets of Langerhans. *Endocrinology* 146, 643–654.
- Lopez, J.A., Kwan, E.P., Xie, L., He, Y., James, D.E., and Gaisano, H.Y. (2008). The RalA GTPase Is a Central Regulator of Insulin Exocytosis from Pancreatic Islet Beta Cells. *J. Biol. Chem.* 283, 17939–17945.
- Ly, L.D., Xu, S., Choi, S.-K., Ha, C.-M., Thoudam, T., Cha, S.-K., Wiederkehr, A., Wollheim, C.B., Lee, I.-K., and Park, K.-S. (2017). Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes. *Exp. Mol. Med.* 49, e291.
- MacDonald, P.E. (2011). TRP-ing Down the Path to Insulin Secretion. *Diabetes* 60, 28–29.
- Maechler, P., and Wollheim, C.B. (1999). Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 402, 685–689.
- Maechler, P., Carobbio, S., and Rubi, B. (2006). In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 696–709.
- Magnan, C., and Ktorza, A. (2005). Production et sécrétion de l'insuline par la cellule  $\beta$  pancréatique. *EMC - Endocrinol.* 2, 241–264.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747.
- Mancini, A.D., and Poynter, V. (2013). The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: how much do we know? *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 398–407.
- Marabita, F., and Islam, M.S. (2017). Expression of Transient Receptor Potential Channels in the Purified Human Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Pancreas* 46, 97–101.

- Marigo, V., Courville, K., Hsu, W.H., Feng, J.M., and Cheng, H. (2009). TRPM4 impacts on Ca<sup>2+</sup> signals during agonist-induced insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* *299*, 194–203.
- Martel, J., Ojcius, D.M., Chang, C.-J., Lin, C.-S., Lu, C.-C., Ko, Y.-F., Tseng, S.-F., Lai, H.-C., and Young, J.D. (2016). Anti-obesogenic and antidiabetic effects of plants and mushrooms. *Nat. Rev. Endocrinol.*
- Mastrolia, V., Flucher, S.M., Obermair, G.J., Drach, M., Hofer, H., Renström, E., Schwartz, A., Striessnig, J., Flucher, B.E., and Tuluc, P. (2017). Loss of  $\alpha 2\delta$ -1 Calcium Channel Subunit Function Increases the Susceptibility for Diabetes. *Diabetes db151349*.
- Matschinsky, F.M. (1996). A Lesson in Metabolic Regulation Inspired by the Glucokinase Glucose Sensor Paradigm. *Diabetes* *45*, 223–241.
- Matveyenko, A.V., and Butler, P.C. (2006). Islet amyloid polypeptide (IAPP) transgenic rodents as models for type 2 diabetes. *Ilar J.* *47*, 225–233.
- Matveyenko, A.V., Gurlo, T., Daval, M., Butler, A.E., and Butler, P.C. (2009). Successful Versus Failed Adaptation to High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance: The Role of IAPP-Induced  $\beta$ -Cell Endoplasmic Reticulum Stress. *Diabetes* *58*, 906–916.
- McCulloch, L.J., van de Bunt, M., Braun, M., Frayn, K.N., Clark, A., and Gloyn, A.L. (2011). GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: Implications for understanding genetic association signals at this locus. *Mol. Genet. Metab.* *104*, 648–653.
- McDougall, G.J., and Stewart, D. (2005). The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *BioFactors Oxf. Engl.* *23*, 189–195.
- Mele, L., Mena, P., Piemontese, A., Marino, V., López-Gutiérrez, N., Bernini, F., Brighenti, F., Zanotti, I., and Del Rio, D. (2016). Antiatherogenic effects of ellagic acid and urolithins in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* *599*, 42–50.
- Mitchell, D.H., Stiles, J.W., Santelli, J., and Sanadi, D.R. (1979). Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *J. Gerontol.* *34*, 28–36.
- Movassat, J., Saulnier, C., Serradas, P., and Portha, B. (1997). Impaired development of pancreatic beta-cell mass is a primary event during the progression to diabetes in the GK rat. *Diabetologia* *40*, 916–925.
- Nagao, T., Meguro, S., Hase, T., Otsuka, K., Komikado, M., Tokimitsu, I., Yamamoto, T., and Yamamoto, K. (2009). A Catechin-rich Beverage Improves Obesity and Blood Glucose Control in Patients With Type 2 Diabetes. *Obesity* *17*, 310–317.
- Nagasumi, K., Esaki, R., Iwachidow, K., Yasuhara, Y., Ogi, K., Tanaka, H., Nakata, M., Yano, T., Shimakawa, K., Taketomi, S., et al. (2009). Overexpression of GPR40 in Pancreatic  $\beta$ -Cells Augments Glucose-Stimulated Insulin Secretion and Improves Glucose Tolerance in Normal and Diabetic Mice. *Diabetes* *58*, 1067–1076.
- Nettleton, J.A., Harnack, L.J., Scrafford, C.G., Mink, P.J., Barraj, L.M., and Jacobs, D.R. (2006). Dietary flavonoids and flavonoid-rich foods are not associated with risk of type 2 diabetes in postmenopausal women. *J. Nutr.* *136*, 3039–3045.

Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., et al. (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database J. Biol. Databases Curation* 2010.

Nevins, A.K., and Thurmond, D.C. (2005). A Direct Interaction between Cdc42 and Vesicle-associated Membrane Protein 2 Regulates SNARE-dependent Insulin Exocytosis. *J. Biol. Chem.* 280, 1944–1952.

Ning, S., Zheng, W., Su, J., Liang, N., Li, H., Zhang, D., Liu, C., Dong, J., Zhang, Z., Cui, M., et al. (2015). Different downstream signalling of CCK1 receptors regulates distinct functions of CCK in pancreatic beta cells. *Br. J. Pharmacol.* 172, 5050–5067.

Nishimura, M. (1969). Breeding of Mice Strains for Diabetes Mellitus. *Exp. Anim.* 18, 147–157.

Nitert, M.D., Nagorny, C.L.F., Wendt, A., Eliasson, L., and Mulder, H. (2008). CaV1.2 rather than CaV1.3 is coupled to glucose-stimulated insulin secretion in INS-1 832/13 cells. *J. Mol. Endocrinol.* 41, 1–11.

Nuñez-Sánchez, M.A., García-Villalba, R., Monedero-Saiz, T., García-Talavera, N.V., Gómez-Sánchez, M.B., Sánchez-Álvarez, C., García-Albert, A.M., Rodríguez-Gil, F.J., Ruiz-Marín, M., Pastor-Quirante, F.A., et al. (2014). Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 1199–1211.

Olofsson, C.S., Collins, S., Bengtsson, M., Eliasson, L., Salehi, A., Shimomura, K., Tarasov, A., Holm, C., Ashcroft, F., and Rorsman, P. (2007). Long-Term Exposure to Glucose and Lipids Inhibits Glucose-Induced Insulin Secretion Downstream of Granule Fusion With Plasma Membrane. *Diabetes* 56, 1888–1897.

O’meara, N.M., Sturis, J., Van Cauter, E., and Polonsky, K.S. (1993). Lack of control by glucose of ultradian insulin secretory oscillations in impaired glucose tolerance and in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 92, 262.

O’Rahilly, S., Turner, R.C., and Matthews, D.R. (1988). Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *N. Engl. J. Med.* 318, 1225–1230.

Ozidal, T., Sela, D.A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., and Capanoglu, E. (2016). The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. *Nutrients* 8, 78.

Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Maitra, S., Das, G., Mukhopadhyay, S., Ray, S., Majumdar, S.S., and Bhattacharya, S. (2012). Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 18, 1279–1285.

Palsamy, P., and Subramanian, S. (2008). Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 62, 598–605.

Pandey, K.B., and Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2, 270–278.

Paolisso, G., Tataranni, P.A., Foley, J.E., Bogardus, C., Howard, B.V., and Ravussin, E. (1995). A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia* 38, 1213–1217.

Paquette, M., Medina Larqué, A.S., Weisnagel, S.J., Desjardins, Y., Marois, J., Pilon, G., Dudonné, S., Marette, A., and Jacques, H. (2017). Strawberry and cranberry polyphenols improve insulin sensitivity in insulin-resistant, non-diabetic adults: a parallel, double-blind, controlled and randomised clinical trial. *Br. J. Nutr.* *117*, 519–531.

Patsouris, D., Li, P.-P., Thapar, D., Chapman, J., Olefsky, J.M., and Neels, J.G. (2008). Ablation of CD11c-Positive Cells Normalizes Insulin Sensitivity in Obese Insulin Resistant Animals. *Cell Metab.* *8*, 301–309.

Patsouris, D., Cao, J.-J., Vial, G., Bravard, A., Lefai, E., Durand, A., Durand, C., Chauvin, M.-A., Laugerette, F., Debard, C., et al. (2014). Insulin Resistance is Associated with MCP1-Mediated Macrophage Accumulation in Skeletal Muscle in Mice and Humans. *PLoS ONE* *9*.

Pedersen, S.F., Owsianik, G., and Nilius, B. (2005). TRP channels: An overview. *Cell Calcium* *38*, 233–252.

Pipeleers, D.G. (1992). Heterogeneity in Pancreatic  $\beta$ -cell Population. *Diabetes* *41*, 777–781.

Piwowarski, J., Granica, S., and Kiss, A. (2014). Influence of Gut Microbiota-Derived Ellagitannins' Metabolites Urolithins on Pro-Inflammatory Activities of Human Neutrophils. *Planta Med.* *80*, 887–895.

Piwowarski, J.P., Kiss, A.K., Granica, S., and Moeslinger, T. (2015). Urolithins, gut microbiota-derived metabolites of ellagitannins, inhibit LPS-induced inflammation in RAW 264.7 murine macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* *59*, 2168–2177.

Poitout, V., and Robertson, R.P. (2008). Glucolipotoxicity: Fuel Excess and  $\beta$ -Cell Dysfunction. *Endocr. Rev.* *29*, 351–366.

Poitout, V., Hagman, D., Stein, R., Artner, I., Robertson, R.P., and Harmon, J.S. (2006). Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J. Nutr.* *136*, 873–876.

Poitout, V., Amyot, J., Semache, M., Zarrouki, B., Hagman, D., and Fontés, G. (2010). Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1801*, 289–298.

Porta, M., Curletto, G., Cipullo, D., Rigault de la Longrais, R., Trento, M., Passera, P., Taulaigo, A.V., Di Miceli, S., Cenci, A., Dalmaso, P., et al. (2014). Estimating the Delay Between Onset and Diagnosis of Type 2 Diabetes From the Time Course of Retinopathy Prevalence. *Diabetes Care* *37*, 1668–1674.

Prawitt, D., Monteilh-Zoller, M.K., Brixel, L., Spangenberg, C., Zabel, B., Fleig, A., and Penner, R. (2003). TRPM5 is a transient  $\text{Ca}^{2+}$ -activated cation channel responding to rapid changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15166–15171.

Psichas, A., Sleeth, M.L., Murphy, K.G., Brooks, L., Bewick, G.A., Hanyaloglu, A.C., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., and Frost, G. (2015). The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. *Int. J. Obes.* *2005* *39*, 424–429.

Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., et al. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* *490*, 55–60.

Quesada, I., Todorova, M.G., and Soria, B. (2006). Different Metabolic Responses in  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\delta$ -Cells of the Islet of Langerhans Monitored by Redox Confocal Microscopy. *Biophys. J.* *90*, 2641–2650.

Reinbothe, T.M., Ivarsson, R., Li, D.-Q., Niazi, O., Jing, X., Zhang, E., Stenson, L., Bryborn, U., and Renström, E. (2009). Glutaredoxin-1 Mediates NADPH-Dependent Stimulation of Calcium-Dependent Insulin Secretion. *Mol. Endocrinol.* *23*, 893–900.

Reinbothe, T.M., Alkayyali, S., Ahlqvist, E., Tuomi, T., Isomaa, B., Lyssenko, V., and Renström, E. (2013). The human L-type calcium channel Cav1.3 regulates insulin release and polymorphisms in CACNA1D associate with type 2 diabetes. *Diabetologia* *56*, 340–349.

Rhee, J.S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoqueaux, F., Augustin, I., Hesse, D., Südhof, T.C., Takahashi, M., Rosenmund, C., et al. (2002). Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell* *108*, 121–133.

Rodríguez, J.M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R.P., Kober, O.I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M.C., et al. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb. Ecol. Health Dis.* *26*.

Romo-Vaquero, M., García-Villalba, R., González-Sarriás, A., Beltrán, D., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., and Selma, M.V. (2015). Interindividual variability in the human metabolism of ellagic acid: Contribution of *Gordonibacter* to urolithin production. *J. Funct. Foods* *17*, 785–791.

Roopchand, D.E., Carmody, R.N., Kuhn, P., Moskal, K., Rojas-Silva, P., Turnbaugh, P.J., and Raskin, I. (2015). Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium *Akkermansia muciniphila* and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome. *Diabetes* *64*, 2847–2858.

Rorsman, P., and Renström, E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* *46*, 1029–1045.

Rorsman, P., Braun, M., and Zhang, Q. (2012). Regulation of calcium in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in health and disease. *Cell Calcium* *51*, 300–308.

Rouse, M., Younès, A., and Egan, J.M. (2014). Resveratrol and curcumin enhance pancreatic  $\beta$ -cell function by inhibiting phosphodiesterase activity. *J. Endocrinol.* *223*, 107–117.

Ryu, D., Mouchiroud, L., Andreux, P.A., Katsyuba, E., Moullan, N., Nicolet-dit-Félix, A.A., Williams, E.G., Jha, P., Lo Sasso, G., Huzard, D., et al. (2016). Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nat. Med.* *22*, 879–888.

Sabourin, J., and Allagnat, F. (2016). Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry: a key component of the insulin secretion machinery. *J. Mol. Endocrinol.* *57*, F35–F39.

Sabourin, J., Le Gal, L., Saurwein, L., Haefliger, J.-A., Raddatz, E., and Allagnat, F. (2015). Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry Mediated by Orai1 and TRPC1 participates to Insulin Secretion in Rat Beta-cells. *J. Biol. Chem.* jbc.M115.682583.

Sahebkar, A., Ferri, C., Giorgini, P., Bo, S., Nachtigal, P., and Grassi, D. (2017). Effects of pomegranate juice on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol. Res.* *115*, 149–161.

Sánchez-González, C., Ciudad, C.J., Izquierdo-Pulido, M., and Noé, V. (2016). Urolithin A causes p21 up-regulation in prostate cancer cells. *Eur. J. Nutr.* *55*, 1099–1112.

Santos, G.J. dos, Ferreira, S.M., Ortis, F., Rezende, L.F., Li, C., Najji, A., Carneiro, E.M., Kaestner, K.H., and Boschero, A.C. (2014). Metabolic memory of  $\beta$ -cells controls insulin secretion and is mediated by CaMKII. *Mol. Metab.* *3*, 484–489.

Schlernitzauer, A., Oiry, C., Hamad, R., Galas, S., Cortade, F., Chabi, B., Casas, F., Pessemesse, L., Fouret, G., Feillet-Coudray, C., et al. (2013). Chicoric Acid Is an Antioxidant Molecule That Stimulates AMP Kinase Pathway in L6 Myotubes and Extends Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* *8*.

Schuit, F.C., In't Veld, P.A., and Pipeleers, D.G. (1988). Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependent recruitment of pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 3865–3869.

Seeram, N.P., Henning, S.M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., and Heber, D. (2006). Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *J. Nutr.* *136*, 2481–2485.

Seeram, N.P., Zhang, Y., Sartipipour, M., Henning, S.M., Lee, R.-P., Harris, D.M., Moro, A., and Heber, D. (2007). Pharmacokinetics and tissue disposition of urolithin A, an ellagitannin-derived metabolite, in mice. *FASEB J.* *21*, A1081–A1081.

Selma, M.V., Espín, J.C., and Tomás-Barberán, F.A. (2009). Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health. *J. Agric. Food Chem.* *57*, 6485–6501.

Selma, M.V., Beltrán, D., García-Villalba, R., Espín, J.C., and Tomás-Barberán, F.A. (2014a). Description of urolithin production capacity from ellagic acid of two human intestinal *Gordonibacter* species. *Food Funct.* *5*, 1779.

Selma, M.V., Tomas-Barberan, F.A., Beltran, D., Garcia-Villalba, R., and Espin, J.C. (2014b). *Gordonibacter urolithinifaciens* sp. nov., a urolithin-producing bacterium isolated from the human gut. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *64*, 2346–2352.

Selma, M.V., Romo-Vaquero, M., García-Villalba, R., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F.A., and Espín, J.C. (2016). The human gut microbial ecology associated with overweight and obesity determines ellagic acid metabolism. *Food Funct* *7*, 1769–1774.

Selma, M.V., González-Sarrías, A., Salas-Salvadó, J., Andrés-Lacueva, C., Alasalvar, C., Örem, A., Tomás-Barberán, F.A., and Espín, J.C. (2017). The gut microbiota metabolism of pomegranate or walnut ellagitannins yields two urolithin-metabotypes that correlate with cardiometabolic risk biomarkers: Comparison between normoweight, overweight-obesity and metabolic syndrome. *Clin. Nutr.*

Sener, A., and Malaisse, W.J. (1980). L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* *288*, 187–189.

Shah, A.D., Langenberg, C., Rapsomaniki, E., Denaxas, S., Pujades-Rodriguez, M., Gale, C.P., Deanfield, J., Smeeth, L., Timmis, A., and Hemingway, H. (2015). Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1·9 million people. *Lancet Diabetes Endocrinol.* *3*, 105–113.

Sharma, M., Li, L., Celver, J., Killian, C., Koor, A., and Seeram, N.P. (2010). Effects of Fruit Ellagitannin Extracts, Ellagic Acid, and Their Colonic Metabolite, Urolithin A, on Wnt Signaling<sup>†</sup>. *J. Agric. Food Chem.* *58*, 3965–3969.

Shigeto, M., Cha, C.Y., Rorsman, P., and Kaku, K. (2017). A role of PLC/PKC-dependent pathway in GLP-1-stimulated insulin secretion. *J. Mol. Med.*

- Skrzypski, M., Kakkassery, M., Mergler, S., Grötzinger, C., Khajavi, N., Sassek, M., Szczepankiewicz, D., Wiedenmann, B., Nowak, K.W., and Strowski, M.Z. (2013). Activation of TRPV4 channel in pancreatic INS-1E beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion via calcium-dependent mechanisms. *FEBS Lett.* 587, 3281–3287.
- Smith, P.A., Sakura, H., Coles, B., Gummerson, N., Proks, P., and Ashcroft, F.M. (1997). Electrogenic arginine transport mediates stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *J. Physiol.* 499, 625–635.
- Solayman, M., Ali, Y., Alam, F., Islam, A., Alam, N., Ibrahim Khalil, M., Hua Gan, S., and others (2016). Polyphenols: potential future arsenals in the treatment of diabetes. *Curr. Pharm. Des.* 22, 549–565.
- Song, Y., Manson, J.E., Buring, J.E., Sesso, H.D., and Liu, S. (2005). Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *J. Am. Coll. Nutr.* 24, 376–384.
- Souza, S.C., de Vargas, L.M., Yamamoto, M.T., Lien, P., Franciosa, M.D., Moss, L.G., and Greenberg, A.S. (1998). Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor  $\alpha$  to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 24665–24669.
- Spigoni, V., Mena, P., Cito, M., Fantuzzi, F., Bonadonna, R., Brighenti, F., Dei Cas, A., and Del Rio, D. (2016). Effects on Nitric Oxide Production of Urolithins, Gut-Derived Ellagitannin Metabolites, in Human Aortic Endothelial Cells. *Molecules* 21, 1009.
- Srinivasan, K., and Ramarao, P. (2007). Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J. Med. Res.* 125, 451–472.
- Steiner, D.J., Kim, A., Miller, K., and Hara, M. (2010). Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets* 2, 135–145.
- Tabák, A.G., Herder, C., Rathmann, W., Brunner, E.J., and Kivimäki, M. (2012). Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *The Lancet* 379, 2279–2290.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., and Matsuoka, T. (2006). Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 52, 149–153.
- Taguchi, C., Fukushima, Y., Kishimoto, Y., Suzuki-Sugihara, N., Saita, E., Takahashi, Y., and Kondo, K. (2015). Estimated Dietary Polyphenol Intake and Major Food and Beverage Sources among Elderly Japanese. *Nutrients* 7, 10269–10281.
- Tam, C.S., Sparks, L.M., Johannsen, D.L., Covington, J.D., Church, T.S., and Ravussin, E. (2012). Low macrophage accumulation in skeletal muscle of obese type 2 diabetics and elderly subjects. *Obes. Silver Spring Md* 20, 1530–1533.
- Tanaka, Y., Gleason, C.E., Tran, P.O.T., Harmon, J.S., and Robertson, R.P. (1999). Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 10857–10862.
- Taylor, J.T. (2005). Role of high-voltage-activated calcium channels in glucose-regulated  $\beta$ -cell calcium homeostasis and insulin release. *AJP Endocrinol. Metab.* 289, E900–E908.

- TEMPLE, R.C., CLARK, P., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., and HALES, C.N. (1990). RADIOIMMUNOASSAY MAY OVERESTIMATE INSULIN IN NON-INSULIN-DEPENDENT DIABETICS. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *32*, 689–693.
- Thiel, G., Muller, I., and Rossler, O.G. (2013). Signal transduction via TRPM3 channels in pancreatic - cells. *J. Mol. Endocrinol.* *50*, R75–R83.
- Thurmond, D.C., Gonelle-Gispert, C., Furukawa, M., Halban, P.A., and Pessin, J.E. (2003). Glucose-Stimulated Insulin Secretion Is Coupled to the Interaction of Actin with the t-SNARE (Target Membrane Soluble N -Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor Protein) Complex. *Mol. Endocrinol.* *17*, 732–742.
- Tokuyama, Y., Sturis, J., DePaoli, A.M., Takeda, J., Stoffel, M., Tang, J., Sun, X., Polonsky, K.S., and Bell, G.I. (1995). Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* *44*, 1447–1457.
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y.S., Parker, H.E., Habib, A.M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2012). Short-Chain Fatty Acids Stimulate Glucagon-Like Peptide-1 Secretion via the G-Protein–Coupled Receptor FFAR2. *Diabetes* *61*, 364–371.
- Tomás-Barberán, F.A., García-Villalba, R., González-Sarrías, A., Selma, M.V., and Espín, J.C. (2014). Ellagic Acid Metabolism by Human Gut Microbiota: Consistent Observation of Three Urolithin Phenotypes in Intervention Trials, Independent of Food Source, Age, and Health Status. *J. Agric. Food Chem.* *62*, 6535–6538.
- Topping, D.L., and Clifton, P.M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.* *81*, 1031–1064.
- Uchida, K., Dezaki, K., Damdindorj, B., Inada, H., Shiuchi, T., Mori, Y., Yada, T., Minokoshi, Y., and Tominaga, M. (2011). Lack of TRPM2 Impaired Insulin Secretion and Glucose Metabolisms in Mice. *Diabetes* *60*, 119–126.
- van der Meulen, T., Donaldson, C.J., Cáceres, E., Hunter, A.E., Cowing-Zitron, C., Pound, L.D., Adams, M.W., Zembrzycki, A., Grove, K.L., and Huising, M.O. (2015). Urocortin3 mediates somatostatin-dependent negative feedback control of insulin secretion. *Nat. Med.* *21*, 769–776.
- van Dieren, S., Uiterwaal, C.S.P.M., van der Schouw, Y.T., van der A, D.L., Boer, J.M.A., Spijkerman, A., Grobbee, D.E., and Beulens, J.W.J. (2009). Coffee and tea consumption and risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* *52*, 2561–2569.
- VáRadi, A., Molnár, E., öStenson, C.-G., and Ashcroft, S.J.H. (1996). Isoforms of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase are differentially expressed in normal and diabetic islets of Langerhans. *Biochem. J.* *319*, 521–527.
- Velasco, M., Diaz-Garcia, C.M., Larque, C., and Hiriart, M. (2016). Modulation of Ionic Channels and Insulin Secretion by Drugs and Hormones in Pancreatic Beta Cells. *Mol. Pharmacol.* *90*, 341–357.
- Vendrame, S., Guglielmetti, S., Riso, P., Arioli, S., Klimis-Zacas, D., and Porrini, M. (2011). Six-Week Consumption of a Wild Blueberry Powder Drink Increases Bifidobacteria in the Human Gut. *J. Agric. Food Chem.* *59*, 12815–12820.

Verzelloni, E., Pellacani, C., Tagliazucchi, D., Tagliaferri, S., Calani, L., Costa, L.G., Brighenti, F., Borges, G., Crozier, A., Conte, A., et al. (2011). Antiglycative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites. *Mol. Nutr. Food Res.* *55*, S35–S43.

Vessal, M., Hemmati, M., and Vasei, M. (2003). Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. C* *135C*, 357–364.

Vetterli, L., Brun, T., Giovannoni, L., Bosco, D., and Maechler, P. (2011). Resveratrol Potentiates Glucose-stimulated Insulin Secretion in INS-1E Cells and Human Islets through a SIRT1-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* *286*, 6049–6060.

Wagner, T.F.J., Loch, S., Lambert, S., Straub, I., Mannebach, S., Mathar, I., Düfer, M., Lis, A., Flockerzi, V., Philipp, S.E., et al. (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic  $\beta$  cells. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1421–1430.

Wali, J., Masters, S., and Thomas, H. (2013). Linking Metabolic Abnormalities to Apoptotic Pathways in Beta Cells in Type 2 Diabetes. *Cells* *2*, 266–283.

Walle, T., Browning, A.M., Steed, L.L., Reed, S.G., and Walle, U.K. (2005). Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J. Nutr.* *135*, 48–52.

Wan, Q.-F., Dong, Y., Yang, H., Lou, X., Ding, J., and Xu, T. (2004). Protein Kinase Activation Increases Insulin Secretion by Sensitizing the Secretory Machinery to  $Ca^{2+}$ . *J. Gen. Physiol.* *124*, 653–662.

Wang, H. (2005). ER stress and SREBP-1 activation are implicated in  $\beta$ -cell glucolipotoxicity. *J. Cell Sci.* *118*, 3905–3915.

Wang, Z., and Thurmond, D.C. (2009a). Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J. Cell Sci.* *122*, 893–903.

Wang, Z., and Thurmond, D.C. (2009b). Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J. Cell Sci.* *122*, 893–903.

Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* *112*, 1796–1808.

Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H., and Sundler, F. (2002). The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul. Pept.* *107*, 63–69.

Wolever, T.M., Brighenti, F., Royall, D., Jenkins, A.L., and Jenkins, D.J. (1989). Effect of rectal infusion of short chain fatty acids in human subjects. *Am. J. Gastroenterol.* *84*, 1027–1033.

Wolever, T.M., Spadafora, P., and Eshuis, H. (1991). Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* *53*, 681–687.

World Health Organization (2016). Global report on diabetes.  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf)

Yamada, H., Yoshida, M., Ito, K., Dezaki, K., Yada, T., Ishikawa, S., and Kakei, M. (2016a). Potentiation of Glucose-stimulated Insulin Secretion by the GPR40–PLC–TRPC Pathway in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Sci. Rep.* *6*.

- Yamashita, H., Maruta, H., Jozuka, M., Kimura, R., Iwabuchi, H., Yamato, M., Saito, T., Fujisawa, K., Takahashi, Y., Kimoto, M., et al. (2009). Effects of acetate on lipid metabolism in muscles and adipose tissues of type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *73*, 570–576.
- Yang, S.-N., and Berggren, P.-O. (2006). The Role of Voltage-Gated Calcium Channels in Pancreatic  $\beta$ -Cell Physiology and Pathophysiology. *Endocr. Rev.* *27*, 621–676.
- Yang, S.-N., Larsson, O., Bränström, R., Bertorello, A.M., Leibiger, B., Leibiger, I.B., Moede, T., Köhler, M., Meister, B., and Berggren, P.-O. (1999). Syntaxin 1 interacts with the LD subtype of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in pancreatic  $\beta$  cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 10164–10169.
- Yang, W.-S., Wang, W.-Y., Fan, W.-Y., Deng, Q., and Wang, X. (2014). Tea consumption and risk of type 2 diabetes: a dose–response meta-analysis of cohort studies. *Br. J. Nutr.* *111*, 1329–1339.
- Youl, E., Bardy, G., Magous, R., Cros, G., Sejalon, F., Virsolvy, A., Richard, S., Quignard, J., Gross, R., Petit, P., et al. (2010). Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway: Quercetin effects on pancreatic  $\beta$ -cells. *Br. J. Pharmacol.* *161*, 799–814.
- Yuan, T., Ma, H., Liu, W., Niesen, D.B., Shah, N., Crews, R., Rose, K.N., Vatter, D.A., and Seeram, N.P. (2016). Pomegranate's Neuroprotective Effects against Alzheimer's Disease Are Mediated by Urolithins, Its Ellagitannin-Gut Microbial Derived Metabolites. *ACS Chem. Neurosci.* *7*, 26–33.
- Zawalich, W.S., and Zawalich, K.C. (1996). Regulation of insulin secretion by phospholipase C. *Am. J. Physiol.* *271*, E409-416.
- Zeeshan, H.M.A., Lee, G.H., Kim, H.-R., and Chae, H.-J. (2016). Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Zhang, Z.F., Li, Q., Liang, J., Dai, X.Q., Ding, Y., Wang, J.B., and Li, Y. (2010). Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) protects the insulin sensitivity in rat L6 muscle cells exposed to dexamethasone condition. *Phytomedicine* *17*, 14–18.
- Zou, W., Ni, L., Lu, Q., Zou, C., Zhao, M., Xu, X., Chen, H., and Zheng, Z. (2016). Diabetes Onset at 31–45 Years of Age is Associated with an Increased Risk of Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes. *Sci. Rep.* *6*, 38113.

## Résumé

Notre travail de thèse avait pour objet l'étude du potentiel anti-diabétique des urolithines A, B, C et D, métabolites de polyphénols formés par le microbiote colique à partir des tanins de l'acide ellagique (présents notamment dans la grenade et les noix).

Notre travail a permis de décrire les effets des urolithines sur différents modèles expérimentaux :

Sur un modèle de cellules  $\beta$  insulino-sécrétrices (lignée INS-1), les urolithines induisent une amplification concentration-dépendante de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Elles amplifient l'effet d'autres sécrétagogues comme un analogue du GLP-1 ou une sulfonurée (médicaments utilisés dans le diabète). Les urolithines sont également capables de stimuler la sécrétion d'insuline sur des cellules  $\beta$  ne répondant plus au glucose du fait d'une gluco-toxicité.

L'effet insulino-sécrétoire des urolithines a été confirmé sur îlots de Langerhans isolés.

L'urolithine C étant apparue comme le composé le plus prometteur, nous avons poursuivi la caractérisation de son activité sur un modèle *ex vivo* mimant la situation physiologique, le pancréas isolé perfusé. Alors que l'effet sécrétoire de l'urolithine C n'apparaît pas en présence de 5 mM de glucose, l'urolithine C (20  $\mu$ M) amplifie la sécrétion d'insuline dans des conditions de stimulation modérée de la sécrétion d'insuline par le glucose (8,3 mM). Cet effet est strictement dépendant du glucose, la sécrétion d'insuline retournant immédiatement à son niveau basal lors du passage de 8,3 à 5mM de glucose en présence d'urolithine C.

D'un point de vue mécanistique, il semblerait que l'effet insulino-sécrétoire de l'urolithine C soit médié par une augmentation de la sensibilité et de l'ouverture des canaux calciques de type L.

Des études de pharmacocinétique ont permis de mettre au point une méthodologie de dosage plasmatique de l'urolithine C dans le plasma de rat par chromatographie liquide / ionisation electrospray /spectrographie de masse en tandem. Cette méthodologie a été appliquée à une première étude pharmacocinétique chez le rat après injection de 10 mg/kg d'urolithine C par voie intra-péritonéale. Cette étude montre notamment que le profil pharmacocinétique suit un modèle à 3 compartiments et suggère un stockage tissulaire du composé.

Notre première approche pharmacologique *in vivo* suggère que l'urolithine C pourrait avoir un effet de type « insulino-sensibilisant » évoqué à la fois lors des IPGTT par la réduction de l'insulinémie sans augmentation de la glycémie, ainsi que par l'effet prolongateur de la durée de vie du ver *C. elegans*, suggérant un mécanisme d'action lié à la stimulation de la voie AMPK.

Des études plus approfondies seront nécessaires pour conforter cette hypothèse.

**Mots clés :** diabète, métabolites de polyphénols, urolithines, cellule  $\beta$ .