



"Biodisponibilité de l'acide abscissique (ABA) et de métabolites des polyphénols chez des sujets humains résistants à l'insuline consommant un breuvage à base d'extraits de fraises et de canneberges"

Mémoire

Ana Sofía Medina Larqué

Maîtrise en nutrition
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Ana Sofía Medina Larqué, 2017

**"Biodisponibilité de l'acide abscissique (ABA) et de
métabolites des polyphénols chez des sujets humains
résistants à l'insuline consommant un breuvage à base
d'extraits de fraises et de canneberges"**

Mémoire

Ana Sofía Medina Larqué

Sous la direction de :

Hélène Jacques, directrice de recherche
Yves Desjardins, codirecteur de recherche

Résumé

L'objectif du présent projet de recherche était de déterminer la biodisponibilité de métabolites de polyphénols (PP) et de l'acide abscissique (ABA) suite à la consommation d'un breuvage à base d'extraits de fraises et de canneberge (fournissant 333mg de polyphénols et 200µg d'ABA) chez 17 sujets (hommes et femmes) en surpoids et résistants à l'insuline. Pour atteindre cet objectif, une analyse de corrélation a été réalisée entre les concentrations sanguines de divers métabolites de PP et d'ABA et différents paramètres du métabolisme du glucose chez ladite cohorte.

Les paramètres concernant le métabolisme du glucose ont été mesurés par un clamp hyperinsulinémique-euglycémique et par un test oral de tolérance au glucose (OGTT) dans le cadre d'une étude plus large réalisée dans notre laboratoire. Dans le contexte de mon projet de maîtrise, des mesures de biodisponibilité ont été réalisées grâce à l'extraction, l'identification et la quantification de métabolites de polyphénols et d'ABA dans les échantillons du breuvage ainsi que dans les échantillons du plasma des participants après la consommation du breuvage. Par la suite, l'analyse de corrélation entre les métabolites plasmatiques mesurés et le métabolisme du glucose a été réalisée par régression linéaire multiple robuste.

Les résultats ont montré que les concentrations plasmatiques de certaines molécules sont significativement supérieures dans le groupe traité par rapport au groupe contrôle, notamment la concentration plasmatique d'acide *p*-coumarique, d'acide *m*-coumarique, d'acide férulique, d'acide hydroxyhippurique, de *cis*-ABA, d'acide dihydroxyphaséique et d'ABA glucuronide. Seule la teneur en acide *p*-coumarique a été associée avec la prévention de l'hyperinsulinémie compensatoire lors de la première phase de sécrétion d'insuline, suggérant que cet acide organique serait impliqué dans le métabolisme du glucose chez des sujets résistants à l'insuline.

Table des matières

Résumé	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	x
Liste des abréviations et des sigles	xii
Remerciements	xv
Avant-propos	xvii
Chapitre 1 : Introduction générale	1
Chapitre 2 : Revue de la littérature	3
2.1. Métabolisme du glucose chez une personne en santé	3
2.1.1. Métabolisme du glucose	3
2.1.2. Digestion et absorption du glucose	3
2.1.3. Régulation hormonale de la glycémie	5
2.1.4. C-peptide	6
2.1.5. Taux de captation de glucose	7
2.2. Métabolisme de l'insuline	7
2.2.1. Sensibilité à l'insuline	7
2.2.2. Sensibilité à l'insuline – Indice <i>M/I</i>	9
2.2.3. Tolérance/intolérance au glucose	9
2.3. Méthodes d'évaluation du métabolisme du glucose <i>in vivo</i>	10
2.3.1. Clamp hyperinsulinémique-euglycémique	10
2.3.2. Test oral de la tolérance au glucose	11
2.4. Les fruits : sources alimentaires de polyphénols et d'acide abscissique	12
2.4.1. Les baies	12
2.4.2. Les fraises	14
2.4.3. Les canneberges	15
2.4.4. Les autres fruits	16
2.5. Composés phénoliques	17
2.5.1. Description générale	17
2.5.2. Modes d'extraction	18
2.5.3. Classification	18
2.5.4. Biodisponibilité	20
2.5.4.1. Acides phénoliques	20
2.5.4.2. Flavonoïdes	21
2.5.4.3. Procyanidines	21
2.5.4.4. Ellagitanins	22
2.5.5. Relation avec le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline	22
2.6. Acide abscissique	25
2.6.1. Description générale et fonctions physiologiques de l'ABA chez les organismes végétaux	25
2.6.2. Modes d'extraction (ABA)	26

2.6.3. Fonctions physiologiques de l'ABA chez les mammifères	27
2.6.4. Biodisponibilité (ABA).....	28
2.6.5. Relation de l'ABA avec le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline	29
Chapitre 3 : Hypothèses et objectifs	33
Hypothèses :	33
Objectif général :	33
Objectifs spécifiques :.....	33
Chapitre 4: Strawberry and Cranberry Polyphenols Increase Insulin Sensitivity in Insulin-Resistant, Non-Diabetic Adults: A parallel, double-blind, controlled and randomized clinical trial.....	35
4.1. Résumé	36
4.2. Abstract	37
4.3. Introduction.....	38
4.4. Methods.....	39
4.4.1. Study design.....	39
4.4.2. Subjects.....	40
4.4.3. Experimental groups.	40
4.4.4. Study timeline.....	41
4.4.5. Anthropometric and Blood Pressure Measurements.....	41
4.4.6. Food Records and Questionnaires	42
4.4.7. Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamp	42
4.4.8. Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)	42
4.4.9. Blood collection and storage	42
4.4.10. Glucose, insulin and C-peptide.....	43
4.4.11. Lipids	43
4.4.12. Inflammatory, thrombogenic and oxidative markers.....	43
4.4.13. Bioavailability study	43
4.4.14. Statistical Analyses.....	44
4.5. Results	45
4.5.1. Subject Baseline Characteristics	45
4.5.2. Food Intake and physical activity.	45
4.5.3. Anthropometric Measurements and Blood Pressure	46
4.5.4. Insulin Sensitivity and other parameters of glucose homeostasis	46
4.5.5. Lipid profile	46
4.5.6. Inflammatory, thrombogenic and oxidative markers.....	46
4.5.7. Phenolic composition and bioavailability of experimental beverages	47
4.6. Discussion	47
4.7. Acknowledgements	51
4.8. References chapter 4	53
Chapitre 5 : Étude biodisponibilité - Matériel et méthodes.....	72
5.1. Étude biodisponibilité - Sujets et breuvages.....	72
5.2. Étude de biodisponibilité – Dispositif et mesures des paramètres glucidiques.....	73
5.3. Étude de biodisponibilité - Méthodes d'extraction et de mesure des métabolites des polyphénols et de l'ABA plasmatiques.....	75

5.3.1. Méthodes d'extraction et de mesure des métabolites des polyphénols plasmatiques	75
5.4. Étude de biodisponibilité - Validation du procédé d'extraction d'ABA plasmatique	76
5.5. Étude de biodisponibilité - Aires sous la courbe (AUC) et Statistiques.....	78
5.5.1. Corrélations de teneurs plasmatiques en métabolites des PP et d'ABA avec différents paramètres du métabolisme du glucose	79
Chapitre 6 : Résultats	80
6.1. Mise au point du procédé d'extraction d'ABA.....	80
6.2. Composition phénolique des breuvages expérimentaux	82
6.3. Composition en ABA des breuvages expérimentaux	82
6.4. Caractéristiques de base des participants.....	83
6.5. Composition phénolique plasmatique.....	84
6.5.1. Évolution de la concentration plasmatique des acides <i>p</i> -coumarique, <i>m</i> -coumarique, férulique et hydroxyhippurique après l'ingestion du breuvage PFC.....	86
6.6. Composition en ABA plasmatique	87
6.6.1. Évolution des concentrations plasmatiques de <i>cis</i> -ABA, de DPA et d'ABA glucuronide après ingestion du breuvage PFC.....	87
6.7. Variation de la sensibilité à l'insuline (<i>M/I</i>).....	88
6.8. Variation des paramètres inflammatoires et des lipides sanguins.....	89
6.9. Paramètres du métabolisme du glucose mesurés lors de l'OGTT	90
6.9.1. IAUC de la glycémie 0 à 30min	91
6.9.2. IAUC de la glycémie 0 à 120min	91
6.9.3. IAUC de l'insulinémie 0 à 30min	92
6.9.4. IAUC de l'insulinémie de 0 à 120 min	93
6.9.5. IAUC du C-peptide de 0 à 30min	93
6.9.6. IAUC du C-peptide 0 à 120min	95
6.10. Relation de la teneur en PP et en ABA avec des paramètres du métabolisme du glucose et de lipides plasmatiques	95
Chapitre 7 : Discussion	98
7.1. Premier objectif spécifique	99
7.2. Deuxième objectif spécifique.....	100
7.3. Troisième objectif spécifique	102
7.3.1. Métabolites de PP	102
7.3.1.1. Acide <i>p</i> -coumarique	103
7.3.1.2. Acide <i>m</i> -coumarique	104
7.3.1.3. Acide férulique.....	105
7.3.1.4. Acide hydroxyhippurique.....	106
7.3.2. Métabolites d'ABA.....	108
7.3.2.1. <i>cis</i> -ABA	108
7.3.2.2. Acide phaséique.....	109
7.3.2.3. Acide dihydroxyphaséique	109
7.3.2.4. Autres métabolites de l'ABA.....	110
7.4. Quatrième objectif spécifique	110
Chapitre 8 : Conclusion générale.....	114
8.1. Forces et limites de l'étude.....	114

8.1.1. Forces de l'étude.....	114
8.1.2. Limites de l'étude	115
8.1.3. Perspectives.....	116
Références des chapitres 1, 2, 3, 5, 6, 7 et 8	118

Liste des tableaux

Chapitre 2 : Revue de la littérature

Tableau 2. 1. Valeurs de référence pour le diagnostic de différentes catégories d'hyperglycémie et du diabète de type 2	10
Tableau 2. 2. Composés phénoliques présents dans les baies	13
Tableau 2. 3. Composés phénoliques contenus dans les fraises	14
Tableau 2. 4. Principaux acides phénoliques selon leur structure de carbone	19
Tableau 2. 5. Différentes classes de flavonoïdes	20

Chapitre 4 : Strawberry and Cranberry Polyphenols Increase Insulin Sensitivity in Insulin-Resistant, Non-Diabetic Adults: A parallel, double-blind, controlled and randomized clinical trial

Table 4. 1. Phenolic composition of experimental beverages*	59
Table 4. 2. Baseline characteristics of the study participants*	60
Table 4. 3. IAUC and time point values over time during OGTT for glucose and insulin before and after 6-week consumption of SCP or Control in insulin-resistant human subjects	61
Table 4. 4. Lipid profile, inflammatory and thrombogenic markers, and oxidative status before and after 6-week consumption of SCP or Control in insulin-resistant human subjects	62
Supplemental Table 4. 1. Dietary energy and macronutrient intake assessed by FFQ before and during 6-week consumption of SCP or Control in insulin-resistant human subjects*	68
Supplemental Table 4. 2. Anthropometric measures and blood pressure before and after 6-week consumption of SCP or Control in insulin-resistant human subjects*	69

Chapitre 6 : Résultats

Tableau 6. 1. Comparaison des pourcentages de récupération de deux différentes doses d'ABA à partir de trois méthodes d'extraction différentes.....	80
Tableau 6. 2. Comparaison des pourcentages de suppression des standards d'ABA à partir de trois méthodes d'extraction différentes	81
Tableau 6. 3. Comparaison des concentrations d'ABA et ses composés ¹ chez un rat gavé et un rat non-gavé à l'ABA	81
Tableau 6. 4. Composition d'ABA des breuvages expérimentaux	83
Tableau 6. 5. Caractéristiques de base des participants	84
Tableau 6. 6. Composition phénolique plasmatique	86
Tableau 6. 7. Composition en ABA plasmatique.....	87
Tableau 6. 8. M/I en pré et post intervention.....	89
Tableau 6. 9. Paramètres inflammatoires et lipides sanguins en pré et post intervention	90
Tableau 6. 10. IAUC pré-intervention (0 à 30 minutes et 0 à 120 minutes)	90
Tableau 6. 11. Résultats de la régression linéaire multiple robuste de la concentration plasmatique de métabolites de PP avec la sensibilité à l'insuline, les lipides et les marqueurs inflammatoires sanguins	96
Tableau 6. 12. Résultats de la régression linéaire multiple robuste de la concentration plasmatique de métabolites d'ABA avec la sensibilité à l'insuline, les lipides et les marqueurs inflammatoires sanguins	96

Tableau 6. 13. Résultats de la régression linéaire multiple robuste de la concentration plasmatique de métabolites de PP avec les pourcentages de changements des IAUC de la glycémie, de l'insulinémie et du C-peptide au cours de l'OGTT	97
Tableau 6. 14. Résultats de la régression linéaire multiple robuste de la concentration plasmatique de métabolites d'ABA avec les pourcentages de changements des IAUC de la glycémie, de l'insulinémie et du C-peptide au cours de l'OGTT	97

Liste des figures

Chapitre 2 : Revue de la littérature

Figure 2. 1. Courbe dose-réponse à l'insuline et caractérisation du EC_{50} et V_{max}	8
Figure 2. 2. Courbe dose-réponse à l'insuline et résistance à l'insuline	8

Chapitre 4 : Strawberry and Cranberry Polyphenols Increase Insulin Sensitivity in Insulin-Resistant, Non-Diabetic Adults: A parallel, double-blind, controlled and randomized clinical trial

Fig 4. 1. Insulin sensitivity (M/I) before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of strawberry and cranberry polyphenols (SCP) or Control in insulin-resistant human subjects	64
Fig 4. 2. Responses of plasma C-peptide at -15, 0, 15, 30, 60 and 120 min during the OGTT before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of (a) strawberry and cranberry polyphenols (SCP) or (b) Control, in insulin-resistant human subjects. (c) Changes from baseline (Post vs Pre) in plasma C-peptide at -15, 0, 15, 30, 60 and 120 min during the OGTT before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of SCP or Control in insulin-resistant human subjects	65
Fig 4. 3. Positive incremental area under the curve (IAUC) up to 120 minutes of the OGTT for C-peptide concentrations before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of strawberry and cranberry polyphenols (SCP) or Control in insulin-resistant human subjects	66
Fig 4. 4. Positive incremental area under the curve (IAUC) up to 30 minutes of the OGTT for C-peptide concentrations before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of strawberry and cranberry polyphenols (SCP) or Control in insulin-resistant human subjects	66
Fig 4. 5. Evolution of post-ingestion plasma concentrations of phenolic metabolites. (a) <i>p</i> -coumaric acid, (b) <i>m</i> -coumaric acid, (c) ferulic acid, (d) hydroxyhippuric acid	67
Supplemental Fig. 4. 1. Participant Flow Diagram	70
Supplemental Fig. 4. 2. Responses of serum FFA at 0, 30, 60, 90 and 120 min during the hyperinsulinemic-euglycemic clamp before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of (a) strawberry and cranberry polyphenols (SCP) or (b) Control, in insulin-resistant human subjects. (c) Changes from baseline (Post vs Pre) in serum FFA at 0, 30, 60, 90 and 120 min during the hyperinsulinemic-euglycemic clamp before (Pre) and after (Post) 6 week consumption of SCP or Control. Repeated measures ANOVA showed no significant difference in the changes from baseline (Post vs Pre) between the 2 groups. Values are means with their standard errors represented by vertical bars, <i>n</i> 39	71

Chapitre 5 : Matériel et méthodes

Figure 5. 1. Dispositif expérimental de l'étude de biodisponibilité	73
Figure 5. 2. Méthode d'extraction en plaque des métabolites des polyphénols plasmatiques	76
Figure 5. 3. Méthodes testées pour faire l'extraction de l'ABA	77

Chapitre 6 : Résultats

Figure 6. 1. Cinétiques plasmatiques de <i>cis</i> -ABA, de DPA et d'ABA glucuronide	88
Figure 6. 2. IAUC glycémie de 0 à 30 minutes	91
Figure 6. 3. IAUC glycémie de 0 à 120 minutes	92

Figure 6. 4. IAUC insuline de 0 à 30 minutes.....	92
Figure 6. 5. IAUC insuline de 0 à 120 minutes.....	93
Figure 6. 6. IAUC C-peptide de 0 à 30 minutes	94
Figure 6. 7. 0-30 minutes IAUC individuelles C-peptide en pré et post intervention chez le groupe contrôle (a) et le groupe expérimental (PFC) (b). n= 9 (contrôle) et n=8 (PFC)	94
Figure 6. 8. IAUC C-peptide de 0 à 120 minutes	95

Liste des abréviations et des sigles

3-CQA	Acide 3-O-caféoylquinique
4-CQA	Acide 4-O-caféoylquinique
5-CQA	Acide 5-O-caféoylquinique
ABA	Acide abscissique (<i>abscisic acid</i>)
ABA-GE	Ester de glucose de l'acide abscissique
ABA-Glucu	Acide abscissique glucuronidé
ABA-Me	Acide abscissique méthylé
ACN	Acétonitrile
AcOH	Acide acétique
ADA	Association américaine du diabète (<i>American Diabetes Association</i>)
AF	Acide férulique
AICR	critère d'Akaike (<i>Akaike criterion</i>)
Akt	Protéine kinase B (<i>protein kinase B</i>)
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	Protéine kinase activée par l'AMP (<i>AMP-activated protein kinase</i>)
ANCOVA	Analyse de la covariance (<i>ANalysis of COVariance</i>)
ANOVA	Analyse de la variance (<i>ANalysis Of VAriance</i>)
AUC	Aire sous la courbe (<i>area under the curve</i>)
BMI	Indice de masse corporelle (<i>Body mass index</i>)
Chol	Cholestérol
CHU	Centre hospitalier universitaire (<i>University Health Center</i>)
cm	Centimètre (<i>centimeter</i>)
CRIBIQ	Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec
CRP	Protéine-C réactive (<i>C-reactive protein</i>)
CSM	Cellules souches mésenchymateuses humaines
CV	Coefficient de variation (<i>coefficient of variation</i>)
CVD	Maladie cardiovasculaire (<i>cardiovascular disease</i>)
DG	Diabète gestationnel
dl	Décilitre
DT2	Diabète mellitus type 2
DPA	Dihydroxyphaséique
EC50	Concentration à la moitié de la réponse biologique maximale
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ELISA	Essai d'immunoabsorption enzymatique
FFA	Acides gras libres (<i>free fatty acids</i>)
FFQ	Questionnaire sur la fréquence de consommation des aliments (<i>food frequency questionnaire</i>)
FRAP	Capacité antioxydante totale (<i>total antioxidant capacity</i>)
g	Gramme (<i>gram</i>)
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
GDR	Taux de captation de glucose (<i>glucose disposal rate</i>)
GIP	Peptide insulinothrompe dépendant du glucose (<i>gastric inhibitory polypeptide</i>)

GIR	Taux d'infusion du glucose (<i>glucose infusion rate</i>)
GLP-1	Peptide-1 de type glucagon (<i>glucagon-like peptide-1</i>)
GLUT2	Transporteur de glucose 2 (<i>glucose transporter 2</i>)
GMP	Bonnes pratiques de fabrication (<i>good manufacturing practices</i>)
h/hrs	Heure(s) (<i>hour(s)</i>)
H ₂ O	Eau
HDL	Lipoprotéines de haute densité (<i>high density lipoprotein</i>)
HMW	Poids moléculaire élevé (<i>high molecular weight</i>)
HOMA-IR	Évaluation du modèle d'homéostasie de la résistance à l'insuline (<i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i>)
hsCRP	protéine C-réactive d'haute sensibilité (<i>high-sensitivity C-reactive protein</i>)
IAUC	Aire positive incrémentale sous la courbe (<i>positive incremental area under the curve</i>)
IFG	Anomalie de la glycémie à jeun (<i>impaired fasting glycemia</i>)
IGT	Intolérance au glucose (<i>impaired glucose tolerance</i>)
IL-6	Interleukine-6 (<i>Interleukin-6</i>)
IL-8	Interleukine-8 (<i>Interleukin-8</i>)
INAF	Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels (<i>Institute of Nutrition and Functional Foods</i>)
IVGTT	Test de tolérance au glucose par voie intraveineuse (<i>intravenous glucose tolerance test</i>)
j	Jour
kg	Kilogramme (<i>kilogram</i>)
L	Litre (<i>liter</i>)
LDL	Lipoprotéines de faible densité
m	Mètre (<i>meter</i>)
M/I	Sensibilité à l'insuline (<i>insulin sensitivity</i>)
m ²	Mètre carré (<i>square meter</i>)
MeOH	Méthanol
MetS	Syndrome métabolique (<i>metabolic syndrome</i>)
mg	Milligramme (<i>milligram</i>)
min	Minutes
mmol	Millimoles
n	Nombre de sujets
ND	non-déecté
Neo-PA	Acide néo-phaséique (<i>neo-phaseic acid</i>)
NGT	Tolérance normale au glucose
nM	Nanomole (<i>nanomole</i>)
nmol	Nanomole (<i>nanomole</i>)
OGIS	Indice de sensibilité à l'insuline calculé à partir d'un test oral de tolérance au glucose (<i>oral glucose insulin sensitivity</i>)
OGTT	Test oral de tolérance au glucose (<i>oral glucose tolerance test</i>)
OH-ABA	Acide hydroxy-abcissique
OMS	Organisation mondiale de la santé

PACs	Proanthocyanidines
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PFC	Polyphénols de fraises et canneberges
pg	Picogramme
pH	Potentiel hydrogène
pmol	Picomole
PP	Polyphénols
PPAR γ	Récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes gamma
Qc	Québec
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
rpm	Rotations par minute
SCP	Strawberry and cranberry polyphenols
SD	Écart-type (<i>Standard deviation</i>)
SEM	Erreur type de la moyenne (<i>standard error of the mean</i>)
SGLT 1	Cotransporteurs glucose sodium dépendant 1 (<i>sodium-glucose linked transporter 1</i>)
SPE	Extraction en phase solide (<i>solid-phase extraction</i>)
STZ	Streptozotocine (<i>streptozotocin</i>)
TG	Triglycérides
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
UHPLC-MS	Chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse (<i>Ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
USD	Dollar américain (<i>United States Dollar</i>)
USDA	Département américain de l'agriculture (<i>United States Department of Agriculture</i>)
V _{max}	Vitesse maximale (<i>maximum speed</i>)
WHO	Organisation mondiale de la santé (<i>World Health Organisation</i>)
μ g	microgramme
μ L	microlitre

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice et mon codirecteur de maîtrise de me faire découvrir un thème de recherche qui m'a beaucoup surprise et enthousiasmée. Le sujet "*Biodisponibilité de l'acide abscissique et de métabolites des polyphénols chez des sujets humains résistants à l'insuline consommant un breuvage à base d'extraits de fraises et de canneberges*" m'a permis de découvrir de nouvelles connaissances scientifiques. Ces travaux m'ont aussi permis de me rendre compte que la science n'est pas définitive, qu'il faut persévérer pour réussir à mieux comprendre le fonctionnement du corps humain. Je considère que mes directeurs forment un excellent duo, en effet chacun a apporté ses qualités particulières pour me guider tout au long du parcours de ma maîtrise. J'aimerais mettre en valeur le lien construit pendant ces deux années entre mes directeurs et moi. Je considère qu'on a un lien qui est fondé sur le respect et la confiance, à partir duquel ils m'ont transmis leur passion pour la recherche.

Je voudrais remercier Dre Hélène Jacques pour sa patience, tolérance et gentillesse, j'admire beaucoup sa façon de me faire progresser et de me convaincre d'avoir un esprit persévérant pour relever les défis de chaque étape de la maîtrise sans arrêter de me faire confiance. Elle m'a toujours guidée avec détermination, car elle était toujours au courant de mes activités. Je tiens à souligner qu'elle est une directrice de recherche qui s'intéresse vraiment aux étudiants et qui est prête à donner le temps nécessaire avec chacun de nous.

Je remercie également Dr Yves Desjardins de m'avoir aidé à faire la démarche pour pouvoir venir étudier à l'Université Laval. Sans son aide, je n'aurais pu vivre cette expérience enrichissante au niveau académique et personnel. Je lui suis reconnaissante d'avoir accepté ma candidature et de m'avoir permis d'intégrer son équipe de recherche et aussi pour toutes les connaissances que j'ai pu acquérir grâce à chaque membre de l'équipe. Je lui suis très reconnaissante pour l'enthousiasme qu'il m'a transmis envers mon sujet de recherche, notamment le volet correspondant à l'acide abscissique qui a été ma partie préférée.

Je désire exprimer ma reconnaissance et mon admiration à Stéphanie Dudonné, son grand professionnalisme et sa passion pour la recherche m'ont toujours inspiré à ne pas lâcher mon objectif d'apprendre et de découvrir pendant la maîtrise. J'aimerais également remercier la professeure Hélène Crépeau pour la connaissance partagée en statistique, ainsi qu'à chacun des membres des équipes de recherche qui ont participé à la réalisation de cette maîtrise. Du côté de l'équipe de la Dre Jacques : Julie Marois, Nadine Leblanc, Pauline Navarro, Jean Mboma, Junio Dort et un grand merci à Martine Paquette pour son inestimable appui en tant que chercheuse qui était en charge du projet précédant au mien. Elle a répondu à toutes mes questions d'une façon gentille, efficace et rapide. Du côté de l'équipe de Dr Desjardins : Perrine Feutry, Minty Thomas, Carolina Rodríguez, Elena Pulido, Maëlle Derrien, Ashraf Fawky El-Hefny Badr, Marcela Roquim, Lemia

Boutegrabet, Rafik Missaoui, Dre Mercedes López et spécialement Véronique Richard et Pascal Dubé pour leur grande collaboration avec les manipulations au laboratoire.

À Camille Dugas, Maude Bradette-Laplante, Marie Verheyde et Roxane Mercier qui m'ont aidée à réviser la syntaxe et le style de la langue française, sans votre appui, ce mémoire n'aurait jamais été terminé à temps. Je vous remercie du fond de mon cœur!

La communauté hispanophone de l'INAF, Annalisse, Carolina, Véro, Elena, José Luis, Emperador, Ernesto et Juan, a été une oasis au milieu de la francophonie pour partager des idées en espagnol et aussi pour m'encourager d'une façon « latino ». Je tiens à remercier les collègues québécoises de l'INAF, elles m'ont fait découvrir et aimer le milieu québécois ainsi que la culture, sans oublier de me faire profiter de l'hiver. À ceux qui m'ont offert leur support aux niveaux académique, de la langue et même en termes de ma vie personnelle, un grand merci!

Je voudrais remercier spécialement ma famille d'adoption à Québec, plus spécifiquement Leninka, Gabie, Ana María, Nicole, Dre Mercedes, José, Omar et Rafael. Ils sont ceux qui m'ont appris entre autres, la valeur de la solidarité. Je remercie également mes amis à l'extérieur de l'INAF, surtout Lupita, Arturo, Aidé, Claudia, Sanah et Flynn, ainsi que « La troupe de danse Mexico », notamment à Dalila qui a fait de mon rêve de performer la danse folklorique mexicaine à Québec une réalité.

Je tiens à remercier tous les membres de ma famille, qui sont mes êtres les plus chers; ils ont été toujours présents pour m'encourager. Mes amis au Mexique qui m'ont également toujours soutenue: Merci à Yiomara, Gina, Alfonso, Atenea, Militza, Mariana, Berenice, Fidel, Juan Carlos, Darling et spécialement à Lenin. Je n'exagère pas si je dis que Lenin était chaque jour présent pour me donner de l'espoir.

J'aimerais faire quelques remerciements spéciaux aux personnes clés dans ce parcours. En premier lieu à ma personne préférée Bertha Larqué, ainsi qu'à Alfonso Larqué, à Mario Larqué, à Leonardo Guerra, à Erick Bojorges et à Juan de Toro. Chacun d'entre eux connaît très bien la raison pour laquelle ils sont inclus dans cette liste spéciale.

Le remerciement plus spécial, je le fais à Québec. Ici, j'ai vécu les défis les plus importants de ma vie, mais aussi j'ai connu la joie de la pleine solitude! Merci, Belle Ville, d'avoir partagé avec moi la plus profonde découverte de moi-même, un beau processus qui ne finit jamais!

Avant-propos

Dans le cadre de ma maîtrise, j'ai contribué à titre de deuxième auteure à la rédaction d'un article scientifique. L'article dont je réfère est présenté au chapitre 4 de ce mémoire et a été accepté pour publication par le journal *British Journal of Nutrition* le 31 janvier 2017. Mon rôle dans la préparation de l'article a été centré sur l'analyse statistique ainsi que l'interprétation et la rédaction de la discussion des résultats concernant la biodisponibilité des polyphénols. Dr Yves Desjardins et Dre Hélène Jacques sont les investigateurs principaux du projet de recherche présenté dans cet article, tandis que Martine Paquette est la première auteure.

La conception de l'étude a été réalisée par Yves Desjardins, André Marette, S. John Weisnagel et Hélène Jacques. La planification de l'étude s'est faite par Hélène Jacques et Julie Marois. Cette dernière a de plus conduit l'essai clinique en collaboration avec Martine Paquette. Stéphanie Dudonné a effectué les déterminations des polyphénols. Après la saisie des données, Martine Paquette et moi-même avons effectué l'analyse statistique de celles-ci. Pour la rédaction du manuscrit, tous les coauteurs y ont participé activement, dont Martine Paquette, S. John Weisnagel, Yves Desjardins, André Marette, Hélène Jacques et moi-même. Tous les coauteurs mentionnés précédemment, en plus de Geneviève Pilon, ont contribué à la discussion et à l'interprétation des données. Pour terminer, le contenu final est sous la responsabilité d'Hélène Jacques.

Concernant le reste des activités du projet de maîtrise, j'ai participé à la mise au point de la méthode d'extraction d'ABA à partir de plasma, ainsi qu'à l'extraction d'ABA de tous les échantillons employés pour l'étude de la biodisponibilité. Ce travail s'est effectué sous la supervision d'Yves Desjardins et avec l'aide de Stéphanie Dudonné, Véronique Richard et Pascal Dubé. Finalement, j'ai effectué certaines analyses statistiques présentées dans l'article et la totalité de celles présentées dans le mémoire avec l'aide de la statisticienne Hélène Crépeau.

Chapitre 1 : Introduction générale

La forte prévalence du diabète de type 2 est actuellement un fardeau pour les systèmes de santé partout dans le monde. Le dernier rapport mondial sur le diabète de l'Organisation mondiale de la santé a indiqué qu'environ 422 millions d'adultes souffrent du diabète (Mukhtar et al., 2005; World Health Organisation, 2016). Ce type de diabète est devenu l'un des principaux problèmes de santé publique puisqu'au niveau mondial, il y a un grand nombre de décès précoces imputables à cette maladie et à ses complications. En effet, en 2013, environ 5,1 millions de personnes âgées de 20 à 79 ans sont décédées à cause du diabète, ce qui correspond à un décès toutes les six secondes. En plus, le nombre de personnes atteintes de diabète de type 2 ne cesse d'augmenter dans tous les pays (Fédération Internationale du Diabète, 2013).

En ce qui concerne la situation du diabète en Amérique du Nord, la prévalence de cette maladie est particulièrement importante compte tenu de l'épidémie d'obésité qui y sévit (44,3 millions de personnes atteintes du diabète en 2015). Effectivement, elle est la deuxième région du monde qui abrite le plus grand nombre de personnes obèses et atteintes de diabète. Bien plus, cette région affiche la prévalence comparative la plus élevée d'intolérance au glucose. Quant aux dépenses de santé liées au diabète, l'Amérique du Nord a dépensé plus de 263 milliards USD en 2013, soit 48% des dépenses de santé mondiales (Fédération Internationale du Diabète, 2013).

C'est pourquoi l'intérêt d'étudier le rôle des aliments fonctionnels sur la prévention et le traitement du diabète s'est accru au cours des dernières années. Actuellement de plus en plus d'informations sont disponibles à propos des bénéfices de la consommation de ces aliments, notamment des fruits et des légumes, sur la santé (World Health Organisation, 2002). Par exemple, au sujet des fruits, plusieurs études ont montré que les petits fruits, tels les fraises, canneberges, bleuets et autres, ont une forte teneur en polyphénols (Paredes-López et al., 2010). En effet, ils sont riches en acides phénoliques, flavonoïdes (anthocyanes, flavanols, flavonols), stilbènes, lignanes et tanins (proanthocyanes, ellagitanins et gallotanins) (Seeram, 2008). Les polyphénols montrent entre autres plusieurs propriétés antidiabétiques (Anhê et al., 2013; Giampieri et al., 2015). Il suffit de prendre comme exemple l'action bénéfique des polyphénols sur les caractéristiques anthropométriques des sujets ainsi que sur la modulation du métabolisme lipidique, de la pression sanguine et de la glycémie (Amiot et al., 2016); telle l'action réductrice des anthocyanes sur la réduction des niveaux sanguins de glucose après la consommation d'un repas riche en amidon (Han et al., 2007; McDougall et al., 2005).

Afin de comprendre les mécanismes d'action des polyphénols et de l'ABA alimentaires sur la santé, il est important d'étudier leur biodisponibilité, qui réfère à leurs concentrations et à celles de leurs métabolites en

circulation. Pour tester la biodisponibilité de ces composés, il est nécessaire de les caractériser dans le plasma, à l'aide de méthodes analytiques très sensibles comme l'UHPLC-MS (Dudonné et al., 2014).

Dans le contexte d'une étude réalisée dans notre laboratoire sur les effets d'un extrait de fraises et de canneberges sur la sensibilité à l'insuline (Chapitre 4), nous avons donc mesuré la biodisponibilité des polyphénols et de l'acide abscissique (ABA) pour établir un lien entre leur biodisponibilité et des marqueurs de risque du diabète de type 2.

Le présent mémoire est divisé en 8 chapitres. Tout d'abord, le chapitre 2 constitue une revue de littérature sur le métabolisme du glucose chez une personne en santé, sur les méthodes d'évaluation du métabolisme du glucose chez l'humain, sur les polyphénols et l'acide abscissique, notamment sur les fruits qui en contiennent, ainsi que sur les modes d'extraction des polyphénols et de l'ABA, leur classification, leur biodisponibilité et leur relation avec le métabolisme du glucose. Ensuite, le chapitre 3 énonce les objectifs et les hypothèses de recherche du présent projet. Le chapitre 4 détaille l'étude sur les effets d'un extrait de fraises et de canneberges sur la sensibilité à l'insuline sous forme d'un manuscrit soumis à la revue scientifique *British Journal of Nutrition*, dans lequel je figure comme deuxième auteure. Cet article détaille l'intervention nutritionnelle chez des sujets humains résistants à l'insuline et rapporte quelques données sur la biodisponibilité des polyphénols fournis par l'extrait de fraises et de canneberges. Les chapitres 5 et 6 détaillent la méthodologie et les résultats de la recherche sur la biodisponibilité des polyphénols et de l'ABA en lien avec divers paramètres du métabolisme glucidique mesurés chez un sous-groupe de sujets de l'étude de Paquette et al. (2014) (Chapitre 4), et finalement les chapitres 7 et 8 présentent une discussion sur ces résultats ainsi qu'une conclusion qui inclut les forces et les limites de l'étude, de même que des perspectives pour l'avenir concernant le thème de recherche du présent mémoire.

Chapitre 2 : Revue de la littérature

2.1. Métabolisme du glucose chez une personne en santé

2.1.1. Métabolisme du glucose

L'étude du métabolisme du glucose permet de définir certains concepts de base utiles à la compréhension de la grande problématique de la résistance à l'insuline. Tout d'abord, il faut reconnaître l'importance de métaboliser le glucose et les mécanismes qui le rendent utilisable aux cellules. Le métabolisme du glucose réfère aux processus qui le transforme en eau, énergie et dioxyde de carbone (Thompson et al., 2008). Il permet une importante production d'énergie (Stettner et Segrè, 2013) qui constitue la source principale d'énergie métabolique pour presque toutes les cellules du corps (Shepherd et Kahn, 1999; Thorens, 2015), notamment pour le cerveau. En effet, en état basal, le cerveau dépend totalement de l'oxydation du glucose pour fonctionner (Zieler, 1999).

Le glucose, qui est digéré et absorbé dans l'intestin, passe au foie par la veine porte (Chen et al., 2016). À partir du foie, plusieurs voies peuvent être empruntées:

- a) Le glucose peut être phosphorylé et métabolisé dans le foie pour produire de l'énergie (Aronoff et al., 2004; Shepherd et Kahn, 1999; Thorens; 2015).
- b) Le glucose peut être libéré dans la circulation pour devenir une source d'énergie pour les cellules non-hépatiques (Aronoff et al., 2004).
- c) Quand la consommation du glucose dépasse les besoins énergétiques, le glucose peut être phosphorylé et entreposé au foie (Aronoff et al., 2004; Derks et van Rijn, 2015) ou aux muscles (Shepherd et Kahn, 1999) sous forme de glycogène.
- d) Il peut également être transformé en acides gras (Chen et al., 2016). Ces acides sont stockés comme triglycérides, notamment dans les tissus adipeux (Thompson et al., 2008).

2.1.2. Digestion et absorption du glucose

Le glucose est un glucide simple (monosaccharide) d'absorption rapide qui provient de la digestion des glucides plus complexes (polysaccharides) (Cheng et al., 2016) ou de la production endogène (glycogénolyse et gluconéogenèse) (Aronoff et al., 2004). En tant que monosaccharide, le glucose est directement absorbé par

les cellules de la muqueuse intestinale (Cheng et al., 2016), principalement au niveau du jéjunum et de l'iléon (Cheng et al., 2016; Zierler, 1999).

Les molécules de glucides complexes, notamment les molécules d'amidon, sont des sources exogènes du glucose (Lee et al., 2012). Cependant, ces molécules doivent être dégradées pour les rendre absorbables. Sa digestion commence dans la bouche par l'action de l'enzyme α -amylase salivaire qui dégrade les polysaccharides en oligosaccharides et en disaccharides. Ensuite, quand l'aliment arrive à l'estomac, l'enzyme est inactivée à cause du pH (Lee et al., 2012). Finalement, dans l'intestin plusieurs enzymes participent encore à la digestion. En effet, l' α -amylase pancréatique, la maltase, la saccharase et la lactase favorisent l'hydrolyse des polysaccharides et disaccharides en monosaccharides absorbables (Kellet et al., 2001).

Les molécules de glucose sont fortement polaires, alors que la bicouche lipidique de la membrane cellulaire est relativement imperméable aux molécules polaires (Bermúdez et al., 2007; Shepherd et Kahn, 1999). Ainsi, le glucose qui résulte de la digestion ne peut traverser la membrane cellulaire par diffusion simple. Il est plutôt absorbé par les entérocytes par transport actif grâce à l'action d'un symport responsable du transport actif du glucose et du sodium au pôle apical de la cellule (protéine porteuse SGLT1) (Gorboulev et al., 2012; Gropper et Smith, 2013; Kellet et al., 2001; Wright et al., 2011; Zierler, 1999).

Le glucose peut traverser les membranes grâce à une famille de protéines appelées « transporteurs de glucose » (GLUT) (Wright et al., 2011). Cette famille est composée de 14 protéines, dont les GLUT 1, 2, 3, 4 et 5 jouent les rôles les plus importants (Gropper et Smith, 2013; Bermúdez et al., 2007). La protéine de transport GLUT2 est responsable du processus de diffusion facilitée du glucose au pôle basolatéral de l'entérocyte (transport passif) (Chen et al., 2016; Röder et al., 2014). Le GLUT4 occupe une place de choix, car il est un transporteur insulino-dépendant qui favorise la captation du glucose par l'insuline dans les tissus musculaires, le cœur et les adipocytes (Shepherd et al., 1999; Vijayakumar et al., 2012). En effet, pour réguler la captation cellulaire du glucose, l'action des transporteurs de glucose est coordonnée avec celle des hormones (endocrines et paracrines), des récepteurs et des messagers secondaires (Bermúdez et al., 2007; Chen et al., 2016; Kellett, 2001).

Les autres monosaccharides, fructose et galactose, sont également absorbés. Le premier par diffusion facilitée (GLUT-5) et le second par transport actif (SGLT1) (Bermúdez et al., 2007). Finalement, tous les monosaccharides entrent dans le flux sanguin de la veine porte et sont transportés au foie (Zierler, 1999). Le glucose est stocké dans le foie, alors que le fructose et le galactose sont transformés en glucose aussi pour être stockés au foie et aux muscles sous forme de glycogène (Shepherd et al., 1999; Thompson et al., 2008). Autant l'absorption que le stockage permettent l'approvisionnement de glucose au plasma sanguin (glycémie) (Aronoff et al., 2004). En effet, le glucose qui entre dans la circulation provient de différentes sources. Si la personne est

à jeun, le glucose est d'origine hépatique libéré suite à la glycogénolyse et à la gluconéogenèse. À l'état postprandial, le glucose provient de l'absorption intestinale (Aronoff et al., 2004; Chen et al., 2016; Rizkalla et al., 2004) et le taux de vidange gastrique est le déterminant majeur de l'apparition de glucose dans la circulation (Aronoff et al., 2004; Zierler, 1999).

2.1.3. Régulation hormonale de la glycémie

Plusieurs hormones régulent la glycémie pour qu'elle demeure constante. Parmi celles-ci, l'insuline et le glucagon maintiennent le niveau d'équilibre entre l'apparition et la disparition du glucose de la circulation (Aronoff et al., 2004).

En tant qu'hormone anabolique, l'insuline occupe une place de choix dans le contrôle de la glycémie postprandiale. Les principaux mécanismes d'action de l'insuline incluent la sensibilité des tissus périphériques à la captation du glucose, la promotion de la glycogénèse, la suppression de la production de glucose par le foie et l'inhibition de la production du glucagon (Kruger et al., 2006). Mais aussi, elle présente d'autres effets physiologiques importants, telle que la promotion de la synthèse de tissu adipeux et des protéines au niveau du muscle et du foie. Elle est sécrétée en réponse à une hausse des niveaux plasmatiques du glucose ou des acides aminés (Aronoff et al., 2004).

Le glucagon régule la production endogène du glucose, à partir de la glycogénolyse au niveau hépatique. Ainsi le glucagon maintient le taux basal du glucose à un niveau normal pendant le temps de jeûne (Aronoff et al., 2004).

Bien que l'insuline et le glucagon soient les hormones les plus étudiées pour atteindre l'homéostasie du glucose, il y a d'autres hormones qui participent aussi au contrôle de la glycémie. Parmi celles-ci, nous retrouvons l'amyline et les incrétines, notamment le GLP-1 (glucagon-like peptide-1) et le GIP (peptide insulino-trope dépendant du glucose) (Aronoff et al., 2004). D'une part, l'amyline est une hormone neuroendocrine exprimée et sécrétée avec l'insuline lors d'un stimulus par les cellules bêta du pancréas (Kruger et al., 2006). L'amyline participe donc dans la régulation du taux du glucose, en supprimant la sécrétion du glucagon et aussi, en retardant la vidange gastrique (Aronoff et al., 2004). D'autre part, lesdites incrétines (GLP-1 et GIP) sont sécrétées par l'intestin et participent à la régulation de la baisse du glucose plasmatique (Baggio et al., 2007). Bien que les deux hormones soient sécrétées dans l'intestin et présentent des effets hypoglycémiantes, chacune présente des particularités. (Aronoff et al., 2014; Peters, 2010).

L'hormone dérivée du glucagon, le GLP-1, est sécrétée en plus grande quantité et a une action déterminante sur la physiologie humaine. En effet, l'ingestion d'un repas stimule la sécrétion de grandes quantités de GLP-1 par les cellules L intestinales trouvés dans l'iléon. Cette hormone stimule la sécrétion d'insuline, promeut le bon fonctionnement des cellules bêta du pancréas, augmente la satiété, ralentit la vidange gastrique et surtout, inhibe la sécrétion du glucagon (Aronoff et al., 2004).

De son côté, la sécrétion hormonale du GIP possède un effet stimulant concomitant de production d'insuline mais en plus, la GIP participe au métabolisme des lipides, car elle stimule la lipogenèse (Aronoff et al., 2004; Peters, 2010). Quant à la sécrétion, le GIP est sécrété par les cellules K intestinales qui se trouvent au niveau du duodénum et de l'iléon (Peters, 2010). Concernant la sécrétion des incrétines, des études récentes ont démontré que le SGLT1 participerait comme senseur à la sécrétion de ces hormones (Röder et al., 2014).

2.1.4. C-peptide

Tout comme l'insuline, le C-peptide est produit dans le pancréas. Ces deux molécules sont créées simultanément, en même temps et en même quantité, à partir de la dissociation de la proinsuline. Une fois la proinsuline scindée, l'insuline et le C-peptide sont stockés dans les granules sécréteurs des cellules bêta du pancréas. Par la suite, elles sont libérées dans la circulation au besoin, à des concentrations équimolaires (Sima, 2012).

Malgré la production identique à celle de l'insuline, le C-peptide ne montre pas d'effets sur la captation du glucose sanguin par les cellules de l'organisme (Sima, 2012). En réalité, le C-peptide était considéré comme une molécule inactive pendant plusieurs années. Maintenant, des études récentes montrent que ce peptide peut exercer des effets bénéfiques, notamment dans la prévention des complications du diabète de type 1 à différents niveaux. Le C-peptide aide à prévenir l'hyperfiltration glomérulaire dans les reins, l'inflammation des vaisseaux endothéliaux au niveau microvasculaire et la démyélinisation neuronale (Shpakov et Granstrem, 2013; Usarek et Bryla, 2012; Hills et Brunskill, 2008).

Grâce à la sécrétion équivalente du C-peptide et de l'insuline, une technique de mesure radioimmunologique a été développée. Puisque le C-peptide demeure plus longtemps dans le sang que l'insuline (20-30 minutes vs 3-5 minutes), la concentration plasmatique de ce peptide peut être mesurée de façon précise (Polonsky et al., 1986; Licinio-Paixao et al., 1986). Cette technique sert à mesurer la production et la sécrétion d'insuline, elle représente une méthode très sensible et cliniquement validée pour mesurer la fonction des cellules bêta du pancréas *in vivo*. L'intervalle de référence du niveau normal de la concentration de C-peptide dans le test à jeun est autour de 0,8-3,1 ng/mL ou 0,26-1,03 nmol/L (Palmer et al., 2004).

2.1.5. Taux de captation de glucose

La captation du glucose plasmatique se fait par les tissus périphériques, notamment par le muscle squelettique, les adipocytes et le foie (Thompson et al., 2008). Cette captation de glucose par les cellules peut être mesurée avec le taux de captation de glucose (Glucose Disposal Rate, GDR - $\text{mg glucose} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) ou quantité de glucose métabolisable (Tam et al., 2012). Le taux de captation de glucose, en tant qu'indicateur mesuré et obtenu à partir du clamp euglycémique-hyperinsulinémique, contribue à révéler l'état de résistance à l'insuline. En effet, une fois que le glucose hépatique arrête sa production et que la valeur sanguine se stabilise, le taux de glucose infusé équivaut au taux de captation de glucose, notamment la quantité de glucose nécessaire pour compenser l'hyperinsulinémie causée au clamp (Tam et al., 2012).

Le GDR est exprimé comme une fonction du métabolisme selon la taille corporelle, donc la valeur du GDR est généralement normalisée selon le poids corporel ou la masse maigre, à partir duquel une estimation du niveau de sensibilité à l'insuline est possible (Muniyappa et al., 2008).

2.2. Métabolisme de l'insuline

2.2.1. Sensibilité à l'insuline

L'utilisation du glucose par les tissus est fortement déterminée par la sensibilité à l'insuline, notamment celui des tissus insulino-sensibles à l'état post-absorptif (Disse et al., 2013). En plus, l'insuline a une fonction spécifique selon les tissus ciblés : la suppression de la production hépatique de glucose (foie), l'utilisation musculaire du glucose (muscles) et l'inhibition de la lipolyse (tissu adipeux). L'ensemble de ces actions rend l'insuline indispensable pour promouvoir l'utilisation efficace du glucose ainsi que son homéostasie, tant à jeun qu'après un repas (Disse et al., 2013; Muniyappa et al., 2008; Roden, 2007).

Bien qu'imprécis, les concepts de sensibilité à l'insuline, de réactivité de l'insuline et de résistance à l'insuline sont fréquemment utilisés sans distinction pour désigner l'action de l'insuline sur le métabolisme du glucose en général (Roden, 2007). Cependant, l'action de l'insuline en termes de dose-réponse est caractérisée par deux paramètres à ne pas confondre (figure 2.1). D'un côté, la sensibilité à l'insuline représente la concentration d'insuline à la moitié de la réponse biologique maximale (EC50) tandis que la réactivité de l'insuline (V_{max}) est définie comme l'effet maximal de l'insuline (réponse maximale comparable) (Muniyappa et al., 2008; Roden, 2007).

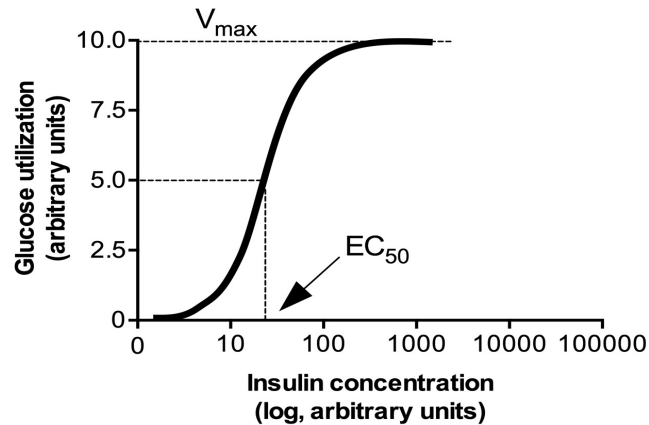


Figure 2. 1.

Courbe dose-réponse à l'insuline et caractérisation du EC_{50} et V_{max}
(Adapté de Roden, 2007)

C'est ainsi que la diminution de la sensibilité à l'insuline/ l'augmentation de la résistance à l'insuline est définie comme un décalage à droite de la courbe dose-réponse avec une augmentation conséquente de la valeur EC_{50} . Cela signifie qu'une plus grande quantité d'insuline est nécessaire (l'axe x) pour atteindre un même niveau d'utilisation du glucose (l'axe y). D'un autre côté, la réduction de la réactivité à l'insuline est caractérisée graphiquement par la diminution de la hauteur de la courbe, ce qui indique une réponse à l'insuline réduite (utilisation du glucose diminuée) (figure 2.2) (Roden, 2007). Dans ces deux cas, le fait le plus important à noter est que l'action de cette hormone est diminuée, ce qui entraîne une rupture de l'homéostasie du glucose (Roden, 2007). Il en résulte que la résistance à l'insuline chez l'humain est une condition qui précède le diabète de type 2 et elle est caractérisée par une augmentation de l'activité du pancréas pour accroître la sécrétion d'insuline. Cette condition est aussi caractérisée par une augmentation de l'inflammation de bas niveau et par la présence de dyslipidémie (hypertriglycéridémie, faible concentration plasmatique de HDL), de dysfonction endothéliale et d'hypertension (Reaven, 2005).

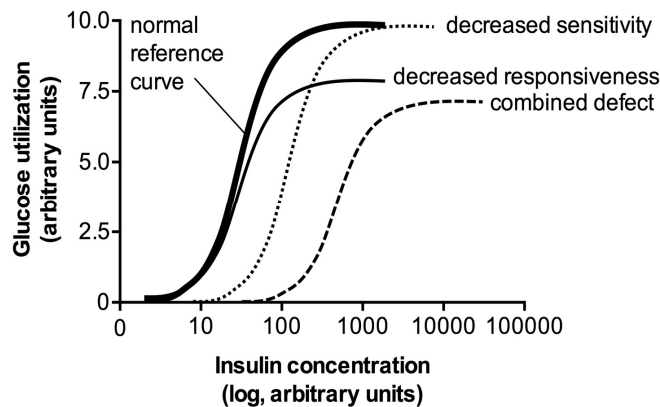


Figure 2. 2. Courbe dose-réponse à l'insuline et résistance à l'insuline
(Adapté de Roden, 2007)

2.2.2. Sensibilité à l'insuline – Indice M/I

Le ratio M/I montre le niveau de sensibilité à l'insuline des tissus, car il exprime la quantité du glucose métabolisé par chaque unité d'insuline pendant la période de stabilité (Antuna-Puente et al., 2011; DeFonzo et al., 1979; Disse et al., 2013).

La valeur M reportée dans le clamp euglycémique-hyperinsulinémique représente la valeur moyenne du glucose infusé pendant les dernières 30 minutes du clamp, une fois que le plateau a été atteint (Antuna-Puente et al., 2011; Sebán et Abregate, 2012). Pour obtenir la valeur de M , il suffit de diviser le taux d'infusion du glucose au plateau par le poids corporel (kg) du sujet (Piché et al., 2005). Finalement le calcul du M/I se fait en divisant la valeur de M par la concentration moyenne d'insulinémie pendant les mêmes 30 dernières minutes du clamp hyperinsulinémique-euglycémique (Disse et al., 2011).

2.2.3. Tolérance et intolérance au glucose

L'état d'intolérance au glucose (impaired glucose tolerance - IGT) est une condition importante à étudier, car il constitue une perturbation du métabolisme glucidique et l'une des étapes précédant le développement du diabète de type 2 (Unwin et al., 2002; Andersson et al., 2013; Shobha et al., 2004). En présence d'une anomalie de la fonction de l'insuline, un état d'hyperinsulinémie compensatoire doit s'installer pour garder les niveaux normaux de glycémie. Le travail excessif du pancréas entraîne un épuisement progressif des cellules- β pancréatiques. Alors, le déficit en insuline qui en résulte est associé à une augmentation rapide de la concentration du glucose et à l'établissement de l'intolérance au glucose (Bergman, 2013; Shobha et al., 2004).

Dans les derniers rapports de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et de l'Association américaine du diabète (ADA), deux nouveaux concepts référant aux valeurs de glycémie à jeun altérées (impaired fasting glycaemia - IFG) ont été développés (Unwin et al., 2002). Il s'agit des concepts de troubles spécifiques de la glycémie à jeun (IGF) et de l'intolérance au glucose (IGT) qui sont des problèmes métaboliquement différents. Même si les deux concepts font référence à la résistance à l'insuline, la différence majeure entre eux est déterminée selon les tissus affectés. Ainsi, l'IGF présente une importante altération au niveau de tissus hépatiques alors que l'IGT correspond à une diminution de la sensibilité à l'insuline aux tissus musculaires accompagnée d'une diminution légère de la sensibilité aux tissus hépatiques. Outre cette importante différence, l'IGF et l'IGT présentent des altérations dans le profil de sécrétion d'insuline. D'une part, l'IGF modifie seulement la sécrétion d'insuline pendant la première phase de sécrétion (30 premières minutes de l'OGTT) et d'une autre part, l'IGT montre des altérations dans l'ensemble de la réponse au glucose oral (OGTT complet) (Nathan et al.,

2007). À noter également, leur prévalence est différente, ayant plus de cas d'IGT par rapport aux cas d'IFG (Andersson et al., 2013; Unwin et al., 2002).

Ces deux conditions représentent des états métaboliques intermédiaires entre l'homéostasie normale du glucose et l'hyperglycémie diabétique. Aucun de ces deux états ne constitue un état pathologique, mais ils constituent quand même un facteur de risque pour le développement du diabète et de la maladie cardiovasculaire (Andersson et al., 2013; Uwin et al., 2002).

Les valeurs de référence pour déterminer les états de glycémies altérées sont présentées au tableau 2.1. Ces valeurs varient selon la catégorie d'hyperglycémie, le type d'échantillon (plasma ou sang) et le moment de l'échantillonnage, soit à jeun ou bien deux heures après une charge de glucose (Unwin et al., 2002).

Tableau 2.1. Valeurs de référence pour le diagnostic de différentes catégories d'hyperglycémie et du diabète de type 2

	Concentration de glucose (mg/dl)		
	Plasma	Sang entier	
	Veineux	Veineux	Capillaire
Diabète de type 2			
À jeun	≥ 126	≥ 110	≥ 110
2-heures après une charge de glucose.	≥ 200	≥ 180	≥ 200
Intolérance au glucose			
2-heures après une charge de glucose.	140–199	120–179	140–199
Dysglycémie à jeun			
À jeun	110–125	100–109	100–109

Modifié à partir de WHO, 1999

2.3. Méthodes d'évaluation du métabolisme du glucose *in vivo*

2.3.1. Clamp hyperinsulinémique-euglycémique

La méthode de choix pour mesurer la sensibilité à l'insuline, notamment dans les études cliniques, est le clamp hyperinsulinémique-euglycémique (Antuna-Puente et al., 2011; Conn, 2013; Matsuda et al., 1999). Cette technique a été développée en 1979 par DeFronzo et ses collaborateurs (DeFronzo et al., 1979) et est basée sur le principe selon lequel, suite à l'infusion de grandes doses d'insuline, nous conservons le glucose plasmatique stable (euglycémie) à l'aide d'une infusion constante de glucose.

Les caractéristiques du test incluent une période à jeun de 12 heures avant le début de l'expérience. Puis il requiert la collocation de deux cathéters intraveineux, car l'infusion d'insuline et de glucose (dextrose à 20 %) se fait par la veine antécubitale, à chaque solution correspond l'un des deux bras du patient. La surveillance de la concentration plasmatique du glucose se fait avec des prises de sang toutes les 5 minutes par un cathéter dans une artère brachiale. L'infusion d'insuline commence au temps zéro, alors que, celle du glucose débute quatre minutes après (DeFronzo et al., 1979; Disse et al., 2013).

Pendant le clamp hyperinsulinémique-euglycémique, il faut contrôler l'administration d'insuline et de glucose pour atteindre un état d'hyperinsulinémie et d'euglycémie. En effet, le processus comprend l'administration intraveineuse de doses physiologiquement élevées d'insuline pour forcer un état d'hyperinsulinémie constant en même temps que faire une infusion variée du glucose permettant d'atteindre l'état euglycémique (Antuna-Puente et al., 2011; Dods R, 2013). La quantité d'insuline à diffuser se calcule selon la superficie corporelle du patient (DeFronzo et al., 1979), la quantité de glucose est toujours variable et doit être ajustée pour maintenir un niveau constant de glucose de 90 mg/dl (CV <5 %) (Matsuda et al., 1999).

En effet, cette technique assure l'inhibition de la production de glucose par le foie et d'insuline par le pancréas (état de stabilité) comme résultat de l'infusion constante de grandes doses d'insuline, supérieures à $40\text{mU/m}^2 \times \text{min}$ (dose par aire corporelle par minute) (état d'hyperinsulinémie) (Disse et al., 2013; Muniyappa et al., 2008; Piché et al., 2005). À ce stade, le taux d'infusion de glucose nécessaire pour maintenir l'euglycémie est égale au taux de captation de glucose par les tissus périphériques, notamment les muscles et les adipocytes (tissus insulino-dépendants) (Tam et al., 2012; Antuna-Puente et al., 2011; Disse et al., 2013). Bref, le taux d'infusion du glucose (glucose infusion rate, GIR) indique le niveau de sensibilité à l'insuline, car plus les cellules de l'organisme captent le glucose, meilleure est la sensibilité à l'insuline (Conn, 2013).

Outre sa qualité de test de référence, le clamp hyperinsulinémique-euglycémique présente des avantages à souligner. Notamment, il permet la mesure réelle de l'utilisation du glucose dans une quantité d'insuline bien définie (état stable) (Groop et al., 1993; Muniyappa et al., 2008). En plus, les caractéristiques du test permettent d'avoir un bon niveau de reproductibilité (CV < 0,10) et de bien distinguer les résultats individuels (Mather et al., 2001; Muniyappa, 2008).

2.3.2. Test oral de la tolérance au glucose

Outre, le clamp hyperinsulinémique-euglycémique, le test oral de la tolérance au glucose (Oral glucose tolerance test, OGTT) est aussi un outil très important, notamment en termes de fréquence d'utilisation. En effet, l'OGTT

est la méthode la plus fréquemment utilisée, mais aussi la méthode qui imite le mieux la dynamique du glucose et de l'insuline en conditions physiologiques (Muniyappa et al., 2008).

L'OGTT reflète l'efficacité avec laquelle l'organisme utilise le glucose fourni par voie orale (Antuna-Puente et al., 2011; Matsuda et al., 1999). Il représente un outil servant à identifier et à diagnostiquer l'intolérance de l'organisme au glucose. De plus, ces valeurs peuvent être incluses dans le calcul de certains indices qui permettent d'estimer le niveau de sensibilité à l'insuline (Abdul-Ghani et al., 2006), par exemple l'indice de Matsuda (Matsuda et DeFronzo, 1999), l'HOMA-IR (Matthews et al., 1985) et l'OGIS (Oral Glucose Insulin Sensitivity) (Mari et al., 2001).

La procédure à suivre pour effectuer le test de tolérance au glucose est simple : une fois que les sujets sont demeurés à jeun 12 heures au cours de la nuit précédente, il suffit de prendre des échantillons de sang à -30, -15, 0, 30, 60 et 120 minutes après l'administration par voie orale d'une charge de glucose de 75 g. Le prélèvement des échantillons rend possible la détermination de la concentration de glucose et d'insuline (Abdul-Ghani et al., 2006; Matsuda et al., 1999; Muniyappa et al., 2008).

2.4. Les fruits : sources alimentaires de polyphénols et d'acide abscissique

De plus en plus d'études suggèrent que les fruits représentent un groupe alimentaire qui favorise la prévention du développement des maladies chroniques (Liu, 2013). Ces aliments fournissent différents nutriments (par exemple des vitamines, minéraux, fibres alimentaires) et composés bioactifs, incluant des composés phytochimiques, tels que les acides phénoliques, flavonoïdes et l'acide abscissique. Les fruits qui contiennent le plus de composés phénoliques sont la grenade et les baies, notamment les myrtilles, les mûres, les canneberges, les bleuets, les framboises et les fraises (Liu, 2013; Magnone et al., 2015; Halvorsen et al., 2006). Quant au contenu en acide abscissique dans les fruits, il n'a pas fait l'objet de plusieurs études (voir section 2.4.4 Autres fruits ci-dessous).

2.4.1. Les baies

Les baies forment un groupe particulier des petits fruits, ce groupe est composé de différentes familles, dont les *Rosaceae* (fraises, mûres, et framboises) et les *Ericaceae* (canneberges et bleuets). Nous retrouvons une grande variété des composés phénoliques, à différentes concentrations, selon ces petits fruits (Del Rio et al., 2010). Il est à noter que plusieurs facteurs influent la concentration des composés phénoliques, comme les

conditions environnementales, la génétique, le terrain de culture, le degré de maturité, le cultivar, le processus de conservation des aliments, de même que la quantité d'acide abscissique présente dans la plante (Buran et al., 2012; Sandhu et al., 2010).

Tableau 2.2. Composés phénoliques présents dans les baies

Composés phénoliques	Métabolites (Sources)
Anthocyanes	<i>Cyanidine-3-O-glucoside (mûrs, fraises et sureaux)</i> <i>Pelargonidine-3-O-glucoside (fraises)</i> <i>Petunidine-3-O-glucoside (bleuet)</i> <i>Cyanidine-3-O-galactoside (canneberge)</i> <i>Dephinidine-3-O-galactoside (bleuets)</i> <i>Cyanidine-3-O-arabinoside (canneberge)</i> <i>Cyanidine-3-O-rutinoside (cassis ou groseillier)</i> <i>Delphinidine-3-O-rutinoside (cassis)</i> <i>Cyanidine-3-O-(2''-O-xylosyl) rutinoside (groseillier à grappes)</i> <i>Cyanidine-3-O-sophoroside (framboises)</i> <i>Cyanidine-3-O-sambubioside (sureaux)</i> <i>Malvidine-3-O-arabinoside</i> <i>Malvidine-3-O-galactosides (bleuets)</i>
Ellagitanins	<i>Acide gallique</i> <i>Acide ellagique</i> <i>Sanguinine H6 (framboises)</i> <i>Lambertianine C (framboises)</i> <i>Punicalagine (framboises, fraises, mûres)</i>
Flavonols	<i>Quercetin-3-O-glucoside</i> <i>Quercetin-3-O-galactoside</i> <i>Quercetin-3-O-(2''-O-xylosyl) glucuronide</i> <i>Quercetin-3-O-rutinoside</i> <i>Myricetin-3-O-glucoside</i> <i>Myricetin-3-O-galactoside</i> <i>Myricetin-3-O-rutinoside</i>
Procyanidines	<i>Proanthocyanidin B2 dimer</i> <i>Proanthocyanidin B5 dimer</i> <i>Proanthocyanidin A2 dimer</i>
Flavan-3-ols	<i>(-)-Epicatechine</i> <i>(+)-Catéchine</i>

Modifié à partir de Del Rio et al., 2010; Del Rio et al., 2013

En revanche, la teneur en acides phénoliques dans les baies est un sujet très étudié, ainsi que leurs bénéfices sur la santé (Borges et al., 2010; Mäattä et al., 2003; Hager et al., 2008). Parmi tous les composés phénoliques

contenus dans les petits fruits, les anthocyanes occupent la première place en termes de quantité, suivis par les ellagitanins, les flavan-3-ols, les procyanidines et les flavonols (voir tableau 2.2). Outre, leur concentration élevée, l'importance des anthocyanes réside aussi dans la coloration intense qu'ils fournissent aux baies (Del Rio et al., 2010).

2.4.2. Les fraises

La fraise appartient à la famille des *Rosaceae* et constitue l'un des plus importants petits fruits cultivés au monde. Les fraises sont reconnues comme une bonne source de vitamine C, potassium, folate, caroténoïdes, fibres et aussi de composés phénoliques (Aaby et al., 2007; USDA, 2015), notamment de flavanols, de flavonols et d'anthocyanidines. À noter, les anthocyanidines figurent parmi les molécules les plus bioactives des fraises, dont le pelargonidine est l'anthocyanidine la plus abondante (voir tableau 2.3) (Basu et al., 2014; Karlund et al., 2015).

Tableau 2.3. Composés phénoliques contenus dans les fraises

Values/100g	Fraises fraîches
Anthocyanidines (mg)	
Cyanidines	1,96
Delphinidine	0,32
Malvidine	-
Pelargonidine	31,27
Peonidine	-
Petunidine	0,08
Flavonols (mg)	
Kaempférole	0,46
Myricétine	-
Quercétine	1,14
Flavan-3-ols (mg)	
(-)- Épicatéchine	0,12
(-)- Épicatéchine 3-gallate	0,15
(-)- Épigallocatechine	0,78
(-)- Épigallocatechine 3-gallate	0,11
(+)- Catéchine	3,32
(+)- Gallocatechine	0,03

Modifié à partir de Basu et al., 2014.

Les effets bénéfiques des fraises sur la santé sont nombreux. Selon la recension des écrits de Giampieri et al. (2015), des études cliniques et épidémiologiques ont montré que ce fruit possède une activité antioxydante, anti-inflammatoire et un effet hypotenseur. Parmi ceux-ci, les fraises permettent de diminuer la concentration de

divers marqueurs de réponse inflammatoire et de stress oxydatif à l'état postprandial. L'étude d'Edirisinghe et al. (2011) montre que les valeurs de protéine-C réactive (CRP) et d'IL-6 sont moins élevées ($p < 0,05$) chez des sujets en surpoids recevant un traitement à base de jus de fraises par rapport aux sujets recevant uniquement un placebo (Edirisinghe et al., 2011). En outre, Burton-Freeman et al. (2010) rapporte aussi une diminution des triglycérides ($p = 0,005$) et des LDL oxydées ($p = 0,01$) chez des sujets hyperlipidémiques recevant un breuvage de fraises comparés aux sujets recevant un breuvage placebo (Burton-Freeman et al., 2010).

Des effets bénéfiques obtenus par la consommation de fraises sur le métabolisme du glucose ont été également observés. Par exemple, la prise d'un breuvage de fraises réduirait la sécrétion d'insuline postprandiale ($p < 0,05$) et ce, après la consommation d'un repas riche en glucides et modéré en matières grasses (Edirisinghe et al., 2011). De plus, la réponse glycémique postprandiale serait moins importante ($p < 0,05$) après la prise d'une confiture de fraises par rapport à une charge de glucose (50g) (Kurotobi et al., 2010).

2.4.3. Les canneberges

Les canneberges appartiennent à la famille des *Ericaceae*, comme les bleuets. Cependant, les canneberges contiennent plutôt des composés de cyanidine et péonidine, alors que les bleuets contiennent surtout de la delphinidine et de la malvidine (Del Rio et al., 2010).

En revanche, les canneberges représentent une source importante de proanthocyanidines (PACs) (en moyenne 4188mg/kg) comparé aux bleuets (1798 mg/kg), groseilliers noirs (1478 mg/kg), fraises (1450 mg/kg), framboises (302 mg/kg) et mûres (270 mg/kg). Il est à souligner que la plupart des PACs retrouvés dans les baies se retrouvent sous forme de polymères ($\pm 74\%$) et la minorité sous formes de monomères, dimères et trimères (Gu et al., 2004).

Parmi les effets des canneberges sur la santé, on relève leur potentiel à réduire le risque cardiovasculaire. En effet chez l'humain, la consommation d'un jus de canneberges à faible teneur en calories peut diminuer les niveaux plasmatiques de triglycérides et de protéine C réactive et la tension artérielle diastolique (Novotny et al., 2015). Chez la souris, la consommation d'un extrait des canneberges contribue aussi à diminuer les niveaux des triglycérides plasmatiques et l'obésité viscérale, en plus d'aider à réduire l'inflammation intestinale et le stress oxydatif (Anhê et al., 2015).

2.4.4. Les autres fruits

Les composés phénoliques des agrumes appartiennent au groupe des flavanones, dont l'hespérintine et la naringénine en sont les plus abondantes. Leurs métabolites tissulaires se trouvent principalement sous formes glucuronidés, diglucuronidés et sulfatés (Del Rio et al., 2013; Mullen et al., 2008). Par ailleurs, les flavones des agrumes sont présentés plutôt en forme polyméthoxylée : nobilétine et tangerétine (Del Rio et al., 2013).

Les composés phénoliques de la pomme se trouvent en grande partie sous forme de flavanols, principalement d'(-)-épichatéchine et de procyanidines, d'acide hydroxycinnamique (acide 5-caféoylquinique et acide 4-*p*-coumaroylquinique), de dihydrochalcones, de phloridzine (phlorétine glucoside), de phlorétine xyloglucoside et de flavonols. Nous retrouvons aussi de bonnes quantités d'anthocyanes dans la peau de quelques variétés de pommes (Manzano et Williamson, 2010).

Pour ce qui est de la grenade, elle montre des quantités importantes d'ellagitanins, notamment de punicaline et de punicalagines. Il est intéressant de souligner que l'acide ellagique est transformé en urolithine par l'action du microbiote intestinal (Adams et al., 2010).

Quant aux prunes, le contenu total en composés phénoliques correspond à environ 1595-1922 mg/kg. L'étude de Donovan et collaborateurs (1998) montre que les prunes séchées et dénoyautées contiennent plus de composés phénoliques que celles avec noyaux ou que le jus de prune (Donovan et al., 1998). L'étude réalisée par Nakatani en 2000 a identifié plusieurs isomères d'acide chlorogénique dans les prunes (Nakatani et al., 2000), notamment l'acide 3-*O*-caféoylquinique (3-CQA) (1228-1372 mg/kg), suivi en concentration par l'acide 4-*O*-caféoylquinique (4-CQA), l'acide 5-*O*-caféoylquinique (5-CQA), l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et la rutine (Nakatani et al., 2000). Il faut noter que les acides caféoylquiniques sont les composantes possédant la plus importante capacité antioxydante parmi celles retrouvées dans les prunes (Kikuzaki et al., 2004).

En ce qui concerne l'information disponible sur la concentration d'acide abscissique (ABA) dans les fruits, celle-ci est limitée. Néanmoins, quelques indications portant sur l'identification d'ABA et de ses composés dérivés sont disponibles. Par exemple, l'étude de Kikuzaki et al. en 2004 a mis en évidence la présence de sept composés d'acide abscissique dans les prunes séchées (Kikuzaki et al., 2004).

Plus tard, en 2015, Magnone et ses collègues ont déterminé le contenu de 6-*cis*-(S)-ABA dans certains fruits qui étaient considérés comme fréquemment consommés dans la diète occidentale. En effet, ils ont analysé la figue, l'abricot, la banane, la myrtille et la pomme. Les résultats de ces analyses montrent que la figue possède la plus grande quantité d'ABA parmi les fruits analysés (2812 pmol/g masse fraîche). En second lieu se retrouve la myrtille (1444 pmol/g masse fraîche), suivi par l'abricot (1220 pmol/g masse fraîche), la banane (835 pmol/g masse fraîche) et les pommes (90 pmol/g masse fraîche).

L'ensemble des molécules contenues dans les différents fruits peut ainsi leur conférer des propriétés bénéfiques pour la santé. Par exemple, l'inclusion d'un extrait d'abricots dans l'alimentation peut diminuer la glycémie et l'insulinémie chez des sujets humains en santé (Magnone et al., 2015). De plus, la consommation des polyphénols de raisins peut favoriser la prévention du stress oxydatif et de la résistance à l'insuline (Hokayem et al., 2013). Tout comme pour les raisins, la consommation de polyphénols de bleuets favorise une amélioration de la sensibilité à l'insuline (mesuré par clamp hyperinsulinémique-euglycémique) chez des sujets humaines, obèses, non-diabétiques et résistants à l'insuline (Stull et al., 2010). Plusieurs études *in vitro*, chez l'animal et chez l'humain ont montré des effets bénéfiques des polyphénols de raisins dans la diminution du processus d'athérosclérose par l'inhibition de l'oxydation des LDL et de l'agrégation plaquettaire, ainsi que l'amélioration de la fonction endothéliale, la diminution de la pression sanguine et la réduction de l'inflammation (Dohadwala et Vita, 2009).

2.5. Composés phénoliques

2.5.1. Description générale

Les végétaux contiennent de nombreux composés chimiques dont certains sont des molécules bioactives (Hokayem et al., 2013). Nous observons en effet plus de 8000 composés d'origine naturelle qui appartiennent au groupe de composés phénoliques (Stalikas, 2007). Afin de mieux connaître leurs modes d'action, il importe d'identifier leurs voies de synthèse et leurs profils pharmacocinétiques (Hanhineva et al., 2010).

Les composés phénoliques, tout comme l'acide abscissique, jouent un rôle dans les plantes comme mécanismes de défense contre les stress biotique et abiotique. Par exemple, les épicatechines, flavonoïdes, anthocyanes et les acides chlorogéniques sont produits en réponse au stress de sécheresse, alors que les anthocyanes et les flavonoïdes sont produits en réponse au stress salin (Akula et al., 2011). Finalement, les phénols sont sécrétés pour se défendre contre les infections, les blessures (Stalikas, 2007), la croissance bactérienne et fongique (fonction de phytoalexines) (Corcoran et al., 2012; Gimeno, 2004).

Structurellement, les polyphénols peuvent être des molécules simples comme les acides phénoliques ou des molécules très complexes telles que les procyanidines (Sandhu et al., 2012). L'importance des composés phénoliques comprend autant leur capacité antioxydante (*in vitro*) et anti-inflammatoire que leur rôle colorant et la saveur qu'ils confèrent aux aliments (Gimeno, 2004; Lacampagne et al., 2010). En outre, l'importance de polyphénols se trouve aussi dans leur activité prébiotique (régulation du microbiote intestinal), un thème très étudié actuellement (Anhê et al., 2013; Cardona et al., 2013).

2.5.2. Modes d'extraction

Le processus d'extraction de ces molécules représente le point de départ avant l'isolation, l'identification et l'utilisation des composés phénoliques. De façon générale, les méthodes d'extraction commencent avec le séchage de la matière végétale, la mouture ou la lyophilisation. Cependant, dans le cas des plantes fraîches, il est possible de démarrer l'extraction uniquement en les immergeant dans l'eau. Par la suite, une extraction par solvant devient nécessaire pour séparer les composés phénoliques. L'extraction par solvant peut se faire soit par extraction liquide-liquide ou bien par extraction solide-liquide. Des méthodes de purification sont aussi nécessaires puisque ces méthodes impliquent une co-extraction des substances non phénoliques, telles que les sucres, acides organiques et protéines (Ignat et al., 2011).

L'extraction liquide-liquide est une méthode très répandue qui permet de séparer un soluté spécifique contenu dans une solution liquide. Ce type d'extraction permet de séparer un soluté entre deux solvants selon son affinité pour l'une ou l'autre des phases non miscibles. En effet, l'extraction liquide-liquide est fréquemment utilisée pour séparer les polyphénols provenant de breuvages. Ainsi, le résultat de la séparation donne un extrait riche en polyphénols et un raffinat contenant peu de polyphénols. De son côté, l'extraction solide-liquide correspond à une migration de solides contenus dans une matrice solide vers un solvant liquide qui est en contact la matrice nommée. Cette méthode est largement utilisée, notamment pour récupérer certains composants alimentaires importants (polyphénols) à partir d'aliments solides (Ignat et al., 2011).

Les agents d'extraction (solvants) déterminent l'efficacité de l'extraction, car ils présentent différentes polarités selon leur capacité à former des ponts hydrogène. Les solvants plus utilisés sont le méthanol acidifié et l'éthanol, et parmi ceux-ci, le méthanol acidifié est le plus efficace (Galaction et al., 2011). Pour les polyphénols, on utilise le méthanol. De plus, en matière d'efficacité de méthodes, le processus ultrasonique représente le plus performant. En effet, il permet un bon contact entre la matrice de l'échantillon et l'agent d'extraction, c'est pourquoi il est utilisé aussi pour améliorer l'extraction des lipides, des protéines, et des composés phénoliques (Ignat et al., 2011).

2.5.3. Classification

Les composés phénoliques se divisent en deux grands groupes, en effet, selon leur structure chimique, ils appartiennent aux groupes des flavonoïdes et des non-flavonoïdes. Cette classification se fait en fonction de la quantité d'anneaux phénoliques et des éléments structuraux qui les lient entre eux (Del Rio et al., 2013; Manach et al., 2004).

Du côté des flavonoïdes, il y a une subdivision en plusieurs sous-groupes. Ces sous-groupes sont les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanones, les flavan-3-ols et les anthocyanidines alors qu'à l'intérieur du groupe des non-flavonoïdes ne se trouvent que deux sous-groupes, l'un constitué par les phénols non-carboxyliques, et l'autre constitué par les acides phénoliques (Del Rio et al., 2013; Gimeno, 2004).

En tant que métabolites des plantes, les acides phénoliques se réfèrent à un groupe d'acides organiques aromatiques classifiés selon la structure qu'ils présentent. Ainsi, ces acides présentent deux structures de carbone différentes bien spécifiques, soit une structure d'acide benzoïque (C6 — C1) ou d'acide cinnamique (C6 — C3). Avec une même structure de base (benzoïque ou cinnamique), il est possible de rencontrer une variété d'acides selon le numéro et la position des groupes hydroxyle autour du noyau aromatique (voir tableau 2.4) (Del Rio et al., 2013; Stalikas, 2007).

Tableau 2.2. Principaux acides phénoliques selon leur structure de carbone

ACIDES HYDROXYBENZOÏQUES	ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES
Acide benzoïque	Acide cinnamique
Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	Acide <i>o</i> -coumarique
Acide vanillique	Acide <i>m</i> -coumarique
Acide gallique	Acide <i>p</i> -coumarique
Acide protocatéchique	Acide férulique
Acide syringique	Acide sinapique
Acide gentisique	Acide caféique
Acide vératricque	
Acide salicylique	

Modifié à partir de Stalikas, 2007

Les flavonoïdes se caractérisent par la présence de quinze atomes de carbone formant trois anneaux et de deux noyaux aromatiques connectés par un pont de trois atomes de carbone. La plupart des flavonoïdes dans les plantes se retrouvent surtout sous forme de glycosides plutôt qu'aglycones (Anhê et al., 2013; Del Rio et al., 2013). Il existe de nombreuses classes de flavonoïdes avec différentes molécules selon les différents groupes (voir tableau 2.5).

Tableau 2.3. Différentes classes de flavonoïdes

Flavones	Flavonols	Flavan-3-ols	Flavanones	Isoflavones	Anthocyanidines
Apigénine	Quercétine	(+)-Catéchine	Naringinine	Génistéine	Cyanidine
Lutéoline	Kaempférol	(-)-Epicatéchine	Naringine	Génistine	Cyanine
Chryisine	Galangine	(-)-Epigallocatechine	Hespéritine	Daidzéine	Péonidine
	Fisetine		Hespéridine	Daidzine	Delphinidine
	Myricétine			Ononin	Pélargonidine
					Malvidine

Modifié à partir de Stalikas, 2007

2.5.4. Biodisponibilité

Pour que polyphénols entraînent des bénéfices santé, il faut considérer la quantité consommée et leur biodisponibilité. En effet le niveau de biodisponibilité varie selon l'acide phénolique consommé (Manach et al., 2004).

2.5.4.1. Acides phénoliques

L'absorption intestinale de l'acide *p*-coumarique et de l'acide férulique, deux acides phénoliques, a été testée chez les rats. Les résultats *in vivo* ont démontré que l'absorption de ces acides se fait par un transporteur d'acide monocarboxylique. En plus, l'acide *p*-coumarique est absorbé rapidement et il reste intact (pic 10 minutes après le dosage). Les auteurs ont jugé la biodisponibilité de l'acide *p*-coumarique comme étant élevée en comparaison avec celle de l'acide gallique (70% de plus) (Konishi et al., 2004).

Cependant, Zhao et Moghadasian (2010) dans leur recension de la littérature ont conclu qu'il y a un manque d'études portant sur la biodisponibilité relative des acides hydroxycinnamiques. De son côté, Marín et al. (2015) affirment que l'information concernant la biodisponibilité de l'acide chlorogénique est insuffisante et contradictoire (Marín et al., 2015).

Malgré le manque d'information, Zhao et Moghadasian (2010) ont fait une comparaison des aires sous la courbe (AUC) des acides hydroxycinnamiques. Les auteurs proposent un ordre de biodisponibilité selon le taux d'absorption suivant : acide chlorogénique < acide rosmarinique < acide caféique < acide férulique < acide *p*-coumarique (Zhao et Moghadasian, 2010).

2.5.4.2. Flavonoïdes

La biodisponibilité des flavonoïdes est faible (1%-10%). En effet dans le sang et les tissus, les flavonoïdes et leurs métabolites se trouvent en concentrations nanomolaires. Ainsi, les anthocyanes et les flavan-3-ols présentent la plus faible biodisponibilité, tandis que les isoflavones ont une biodisponibilité plus élevée. Il est opportun d'ajouter que plusieurs aspects influencent la biodisponibilité, notamment le microbiote, ainsi que la présence de protéines, de fibres, de macronutriments et de micronutriments, de même que le temps du transit gastro-intestinal (Corcoran et al., 2012).

Les aglycones de flavonoïdes subissent d'importantes conjugaisons par des enzymes de phases II pendant et après l'absorption intestinale. Les résultats de ces conjugaisons avec les enzymes sont des composés méthoxylés, glucuronidés et sulfatés. Nonobstant la conjugaison, ce sont les métabolites des flavonoïdes qui montrent des effets santé plutôt que les composés conjugués et les formes libres de ses composés (Corcoran et al., 2012).

Le microbiote du côlon effectue une biotransformation intense et certains métabolites pourraient avoir une activité importante. Cela implique des processus de déshydroxylation, de dégradation, de déméthylation, ainsi que la rupture de l'anneau C. Les composés bioactifs qui en résultent se trouvent dans l'intestin et le sang. Finalement, l'élimination des flavonoïdes absorbés et de ses métabolites se fait par l'urine et la bile. Cependant, ils peuvent être réabsorbés par la voie biliaire dans le duodénum ou par le cycle entéro-hépatique (Corcoran et al., 2012).

2.5.4.3. Procyanidines

Les procyanidines se retrouvent en quantité élevée dans les aliments végétaux consommés par les humains. Grâce à leur présence très répandue dans le règne végétal, les procyanidines représentent plus de 50 % de la consommation quotidienne des composés phénoliques (Gu et al., 2004). Cependant, leur biodisponibilité est faible et varie selon plusieurs facteurs. En effet, la structure chimique du composé influence l'absorption, notamment le degré de polymérisation et la présence de groupements fonctionnels galliques (Serra et al., 2010).

Dans ces circonstances, des études faites chez l'animal, chez l'humain et par digestion *in vitro* rapportent que la biodisponibilité des procyanidines est faible (Serra et al., 2010). Effectivement, la plupart des procyanidines consommées passent par l'estomac et l'intestin grêle sans être modifiées (Ríos et al., 2002; Serra et al., 2010). Lorsqu'elles arrivent au côlon, le microbiote les dégrade en composés plus simples, notamment en acides phénoliques et en valérolactones (Appeldoorn et al., 2009; Stoupi et al., 2010).

En tant que polymères, les procyanidines doivent être divisées en monomères et dimères pour devenir absorbables (Serra et al., 2010). Une fois absorbées, les procyanidines se conjuguent avec différents groupes, tels que glucuronides, sulfates et méthyles pour accéder par la suite à la circulation (Appeldoorn et al., 2009; Serra et al., 2010). Tout comme dans le cas de la plupart des composés polyphénoliques, les dimères de procyanidines qui arrivent au côlon ont la possibilité d'être métabolisés et donc d'être transformés en acides phénoliques (Stoupi et al., 2010; Tzounis et al., 2008).

2.5.4.4. Ellagitanins

Dans la recension de la littérature publiée par Del Río et al. (2013), il est indiqué que la plupart des études concernant la biodisponibilité des ellagitanins ont été réalisées avec la grenade. Cependant, leur biodisponibilité a été aussi étudiée à partir de framboises (González-Barrio et al., 2010), de fraises, des noix, ainsi que de vins vieillies. La sélection des aliments a été faite sur deux principes, par leur contenu en ellagitanins et par leur fréquence de consommation dans l'alimentation occidentale (Cerdá et al., 2005).

L'un des résultats de la consommation de grenade révèle qu'à partir des ellagitanins consommés, une certaine quantité d'acide ellagique est libérée grâce à l'hydrolyse acide. Ainsi, les composés phénoliques contenus dans le jus de grenade sont facilement absorbés au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle proximal. Ensuite, le reste des ellagitanins, de même que quelques molécules d'acide ellagique encore circulantes, continuent leur parcours jusqu'au côlon (Seeram et al., 2006).

2.5.5. Relation avec le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline.

L'intérêt croissant pour les composés phénoliques s'explique par la publication de plus en plus d'évidences scientifiques montrant leurs effets protecteurs sur la santé. En effet, les polyphénols en tant que métabolites secondaires des plantes préviennent plusieurs maladies chroniques (Rodríguez-Mateos et al., 2014). Le groupe des composés phénoliques possède des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, chimio-préventives et neuro-protectrices uniques. De plus, il a été démontré que la consommation de ces composés influence le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline (Hanhineva et al., 2010).

Le rapport entre la consommation des polyphénols et l'amélioration du métabolisme du glucose est une relation difficile à établir à cause de la grande hétérogénéité des flavonoïdes (structure, biodisponibilité, absorption et métabolisme). Néanmoins plusieurs études réalisées chez l'humain se sont déjà concentrées sur ce thème (Wedick et al., 2012; Zamora Ros et al., 2014).

Bien que les résultats ne soient pas concluants, certaines études ont rapporté des résultats prometteurs (Brasnyó et al., 2011; Crandall et al., 2012; Törrönen et al., 2009; Wilson et al., 2008). En effet, Wedick et ses collaborateurs (2012) ont montré à partir de données de la *Nurses' Health Study* qu'une diminution du risque de diabète de type 2 (DT2) était reliée à un apport élevé en anthocyanes en comparant le quintile supérieur au quintile inférieur de consommation. À titre d'exemple, les chercheurs ont observé une différence entre ces deux quintiles de consommation dans l'ingestion de bleuets qui était de l'ordre de ≥ 2 portions/jour (quintile supérieur) contre < 1 portion/mois (quintile inférieur). Le rapport des risques (hasard ratio) était de 0,85 en faveur du quintile supérieur (95 % CI : 0,80-0,90; $p < 0,001$) (Wedick et al., 2012).

Une analyse individuelle des anthocyanes a de plus montré que la cyanidine avait la plus forte corrélation avec la diminution du risque de diabète de type 2 (HR : 0,79; 95 % CI : 0,72, 0,85), tandis que la pelargonidine ne montrait aucun effet positif significatif (HR : 0,97; 95 % CI : 0,92, 1,03; $p = 0,79$). Les pommes, les poires, les fraises et les bleuets sont parmi les sources alimentaires qui montrent des effets positifs (risque diminué du DT2) et significatifs les plus intéressants ($p < 0,01$ dans tous les cas) (Wedick et al., 2012).

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés dans une étude réalisée dans la population finlandaise. Selon la diète de cette région, les sources alimentaires de polyphénols qui ont mieux corrélé avec la diminution de diabète de type 2 étaient les pommes ($p = 0,003$) et les baies ($p = 0,03$). Les auteurs ont trouvé une tendance ($p = 0,07$) entre la diminution du risque du diabète de type 2 et la consommation de quercétine et myricétine (flavonols) (Knekt et al., 2002).

Une étude réalisée par Zamora-Ros et collaborateurs en 2014 a confirmé la tendance inverse entre le risque de développer le diabète de type 2 et l'apport en flavonoïdes, plus spécifiquement en monomères de flavan-3-ols (épigallocatechine 3-gallate, épicatechine 3-gallate, épigallocatechine, épicatechine, catéchine, catéchine 3-gallate, galocatechine) ($p < 0,05$), en dimères ($p = 0,003$) et en trimères de proanthocyanidines ($p = 0,07$) et aussi avec la myricétine ($p = 0,001$) (flavonol) (Zamora-Ros et al., 2014).

Concernant les effets positifs de la prise de resvératrol (polyphénol de la famille de stilbènes) sur le métabolisme du glucose, Crandall et al. (2012) ont trouvé que l'impact d'une consommation de 1 à 2 g resvératrol/j sur 4 semaines permettait d'améliorer la sensibilité de l'organisme à l'insuline de 23%, mais aussi de diminuer le pic du glucose postprandial (Crandall et al., 2012). Brasnyó et al. (2011) ont montré que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline était expliquée par l'activation de la voie de signalisation de l'Akt (Brasnyó et al., 2011).

Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer les effets bénéfiques de la consommation des polyphénols. Par exemple, la consommation de flavonoïdes permet la diminution de la résistance à l'insuline en réponse à l'amélioration de la fonction endothéliale (Wedick et al., 2012). En effet, l'étude de Schroeter et

collaborateurs en 2006 a démontré une amélioration de la dilatation du flux sanguin avec une diminution de la pression sanguine en présence des flavan-3-ols, notamment l'épicatéchine (Schroeter et al., 2006).

D'autres effets proposés sont l'inhibition de la digestion des glucides et de l'absorption du glucose dans l'intestin, la protection des cellules bêta du pancréas contre la glucotoxicité, la suppression de la libération de glucose du foie et l'amélioration de la captation du glucose par les tissus périphériques, ainsi qu'une production réduite de radicaux libres grâce au maintien des hauts niveaux de substrats pour l'oxydation (Hanhineva et al., 2010; Hokayem et al., 2013).

Au niveau de la digestion intestinale, l'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase sont les enzymes clés pour l'hydrolyse des glucides en glucose. Les composés phénoliques inhibent l'action de ces enzymes et diminuent ainsi le taux d'absorption et de libération intestinale du glucose. L'ensemble de ces actions permet d'atténuer l'hyperglycémie postprandiale et par la suite, de favoriser l'homéostasie du glucose. Du côté de l'absorption, les composés phénoliques exercent une action bénéfique grâce à l'inhibition des transporteurs du glucose SGLT1 et GLUT2 (Hanhineva et al., 2010).

Chez des modèles animaux, une amélioration du métabolisme du glucose, de la sensibilité à l'insuline et des dysfonctionnements des cellules bêta du pancréas a été observée grâce à la régulation du GLUT4 (Wedick et al., 2012). Ces effets ont été atteints par l'action de sous-classes d'anthocyanes, notamment de cyanidine-3-glucoside, delphinidine-3-glucoside et petunidine-3-glucoside (contenus dans les graines de soja noires) (Nizamutdinova et al., 2009).

Par ailleurs, les analyses des composés phénoliques ont montré que très peu d'entre eux exercent à eux seuls un effet bénéfique sur la prévention du diabète de type 2 (Hanhineva et al., 2010). L'acide férulique (AF) est l'un des composés phénoliques ayant montré des effets bénéfiques à lui seul ainsi qu'une meilleure absorption par rapport aux autres composés phénoliques (Senaphan et al., 2015). En 2003, une étude chez le rat a montré qu'une faible dose d'AF (10 mg/kg) permet d'obtenir les mêmes bénéfices que la prise d'un médicament antidiabétique (0.6 mg/kg glibenclamide). En effet, le traitement avec AF a provoqué chez le groupe expérimental une réduction des niveaux de la glycémie, des acides gras libres, des triglycérides, du cholestérol et des phospholipides lorsque comparé au groupe contrôle ($p < 0,001$) (Balasubashini et al., 2003). En 2007, une étude chez les souris a montré que la consommation d'AF favorisait la diminution de la glycémie, du cholestérol total et des lipoprotéines de basse densité (LDL), ainsi que l'élévation des niveaux d'insuline. Les mécanismes qui semblent associés à ces résultats sont l'élévation de la synthèse du glycogène hépatique et de l'activité de la glucokinase (Jung et al., 2007).

De plus, une dose de 30-60 mg/kg d'AF administrée par voie orale serait suffisante pour obtenir une amélioration significative de la sensibilité à l'insuline et du profil lipidique, ainsi qu'une réduction de la tension artérielle ($p < 0,05$) chez le rat (Senaphan et al., 2015). Donc, l'acide férulique (AF) posséderait des propriétés antidiabétiques qui peuvent se comparer aux propriétés de la metformine (Narasimhan et al., 2015) et de la glibenclamide (Balasubashini et al., 2003). Les mécanismes qui semblent responsables de l'action antidiabétique sont ceux liés à l'homéostasie de la glycémie (Narasimhan et al., 2015) comme l'élévation de la synthèse du glycogène hépatique, l'activité de la glucokinase ainsi que la glycogène synthase (chargée de la glycogénogenèse) (Jung et al., 2007; Narasimhan et al., 2015). De plus, il y a aussi une réduction bénéfique de l'activité de la glycogène phosphorylase et des enzymes de la gluconéogenèse (phosphoenolpyruvate carboxykinase « PEPCCK ») et glucose-6-phosphatase (« G6Pase ») (Narasimhan et al., 2015).

Il apparaît que plusieurs effets bénéfiques ont été identifiés dans les différents groupes de polyphénols, cependant les quelques études réalisées chez l'humain ont été réalisées à petite échelle. Il faudrait donc, promouvoir une recherche des mécanismes d'action, en particulier la compréhension de la biodisponibilité des polyphénols (Del Rio et al., 2013).

2.6. Acide abscissique

2.6.1. Description générale et fonctions physiologiques de l'ABA chez les organismes végétaux

L'acide abscissique (ABA) n'appartient pas au groupe des composés phénoliques, mais plutôt au groupe des sesquiterpénoïdes (Buran et al., 2012; Trapp et al., 2014). Il s'agit d'une des cinq classes d'hormones les plus importantes au niveau végétal (Bassaganya-Riera et al., 2010; Li et al., 2011; Sheth Devang, 2012). En tant que phytohormone, l'ABA permet non seulement de réguler la croissance et le bon développement des plantes, mais aussi de les protéger contre le stress environnemental (López-Carbonell et Jáuregui, 2005; Sandhu et al., 2011), notamment contre la sécheresse (Bassaganya-Riera et al., 2010; Bertoneclj et al., 2011). De plus, l'application d'ABA exogène aux cultures semble avoir le potentiel d'améliorer la capacité antioxydante et le contenu des composés phénoliques présents dans certains fruits et légumes (Lacampagne et al., 2010; Li et al., 2010; Sandhu et al., 2011). Malheureusement, l'utilisation d'ABA peut entraîner une diminution du rendement de certaines cultures (Buran et al., 2012; Li et al., 2010; Sandhu et al., 2011).

Bien que l'ABA soit un sesquiterpénoïde (Dudonné et al., 2015; López-Carbonell et Jáuregui, 2005), sa voie de biosynthèse ne suit pas celle correspondant à cette classe de terpénoïdes (Bassaganya-Riera et al., 2010). En

effet, sa voie de biosynthèse devrait être celle du farnésyl-pyrophosphate, mais l'ABA est plutôt formé à partir de la scission d'un précurseur C₄₀-caroténoïde (Bassaganya-Riera et al., 2010; Nambara et al., 2005).

2.6.2. Modes d'extraction (ABA)

Antérieurement, les procédés d'extraction de l'ABA étaient plutôt laborieux (Le Page-Degivry et al., 1986; Lopez-Carbonelle et Jáuregui, 2005; Zeevaert et Creelman, 1988). Cependant, de nos jours, les méthodes utilisées sont simples et rapides. En effet, il suffit de sécher l'échantillon, de le reconstituer et finalement de l'analyser par chromatographie liquide à ultra-haute ou haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS/UHPLC-MS) (Bodrato et al., 2009; Dudonné et al., 2015; Trapp et al., 2014; Zhou et al., 2003; Zocchi et al., 2001) ou par essai d'immunoabsorption enzymatique (ELISA) (Ameri et al., 2015; Bruzzone et al., 2012a,b,c; Zocchi et al., 2001). Il est à noter que la préparation de l'échantillon détermine l'exactitude de la mesure d'ABA et de ses métabolites. Cette préparation inclut à la fois l'extraction et la purification partielle de l'échantillon (Lopez-Carbonelle et Jáuregui, 2005; Owen et Abrams, 2009; Zhou et al., 2003).

Récemment certaines études nécessitaient la réalisation de l'extraction et la détermination d'ABA plasmatique, donc de nouvelles méthodes d'extraction d'ABA effectuées à partir du plasma humain ont été également développées (Ameri et al., 2015; Bruzzone et al., 2015; Bruzzone et al., 2012a,b,c; Magnone et al., 2015; Sheth Devang, 2012). Ainsi, les nouvelles techniques d'extraction d'ABA du plasma sont basées sur les méthodes utilisées antérieurement chez les plantes et les tissus des mammifères (Bruzzone et al., 2011; Bruzzone et al., 2012a; Lacampagne et al., 2010; Magnone et al., 2015; Zocchi et al., 2001). Tel est notamment le cas de la méthode d'Owen et Abrams (2009) qui a été adaptée à partir de la méthode développée par Chiwocha et al. (2003). Cette méthode d'extraction est considérée précise grâce à l'utilisation d'analogues de deutérium pour chaque composé comme standard, mais aussi grâce à l'emploi d'une méthode de quantification par technique de spectrométrie de masse hautement spécifique et sensible (*Multiple Reaction Monitoring*). Cette méthode a été utilisée pour effectuer nos analyses des échantillons du plasma et du jus de fraises et canneberges.

Pour ce qui est de l'extraction de l'ABA à partir de sources végétales, d'autres auteurs ont aussi proposé une extraction fournissant des résultats avec de bonnes limites de détection, de répétabilité et de linéarité (Lopez-Carbonell et Jáuregui, 2005). Certes, lors des extractions faites dans tissus végétaux, l'ABA est facilement soluble dans plusieurs solvants, notamment l'acétone (70-100%) (Lopez-Carbonelle et Jáuregui, 2005; Zhou et al., 2003), le méthanol aqueux (80-90%) (Trapp et al., 2014; Lopez-Carbonelle et Jáuregui, 2005) et l'acide acétique (0,5-2%) (Dudonné et al., 2015; Lopez-Carbonelle et Jáuregui, 2005; Zhou et al., 2003).

Il faut souligner à cet égard que l'extraction faite avec un mélange de méthanol/d'eau/d'acide acétique, de même qu'un mélange d'acétone/d'eau/d'acide acétique (80:19:1, v/v) donne des résultats reproductibles et évite la formation d'acide abscessique méthylé (ABA-Me) (Lopez-Carbonelle et Jáuregui, 2005). Effectivement, il faut éviter la formation de ce métabolite ce qui permet une meilleure récupération de l'ABA à état libre. Donc, ces auteurs ont privilégié la dernière méthode d'extraction pour garantir une récupération efficace de l'ABA.

L'extraction d'ABA des échantillons du plasma est faite également à l'aide d'un solvant organique, notamment du méthanol (Bruzzone et al., 2012a,b,c; Bruzzone et al., 2015; Ameri et al., 2015, Magnone et al., 2015). En fait, tous ces auteurs ont adopté la méthode d'extraction d'ABA de granulocytes et de kératinocytes que l'équipe de Bruzzone a utilisée en 2012 (Bruzzone et al., 2012b). Cette méthode commence par l'homogénéisation des échantillons sur une solution méthanol/eau (80:20 v/v), suivie par l'évaporation du méthanol, l'acidification de l'extrait aqueux avec acide trifluoroacétique et une dernière extraction avec éther diéthylique (Zocchi et al., 2001). En bref, les méthodes d'extraction de l'ABA de différentes matrices d'échantillons montrent plusieurs similarités.

2.6.3. Fonctions physiologiques de l'ABA chez les mammifères

Plusieurs fonctions physiologiques de l'ABA ont été décrites après sa détection dans les tissus de mammifères en 1986 (Le Page-Degivry et al., 1986). Les premiers travaux ont été réalisés sur des cellules *in vitro* et sur des modèles animaux. Au cours des années, on a montré que l'ABA avait une action sur le métabolisme humain et particulièrement au niveau du métabolisme du glucose (Ameri et al., 2015; Bruzzone et al., 2008). En effet, il semble que les cellules bêta pancréatiques peuvent sécréter de l'ABA, particulièrement en présence d'une concentration élevée de glucose (Bruzzone et al., 2012a). Par ailleurs, l'ABA agirait aussi sur d'autres tissus. Par exemple, les cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) libèrent de l'ABA en réponse aux signaux de stress, telles que la présence de TNF- α , d'IL-8 et de RANTES (chimiokines). De plus, l'ABA stimule la libération des cytokines pour la stimulation de l'hématopoïèse et cela, sans affecter la différenciation cellulaire. Cette libération de cytokines immunomodulatrices favorise une réduction de l'effet négatif des lymphocytes sur l'hématopoïèse (Scarfì et al., 2008). L'ABA stimule aussi la mobilisation des CSM aux tissus endommagés et permet leur récupération (Fox et al., 2007). D'autres cellules sont capables de produire et de sécréter l'ABA. Par exemple les granulocytes (Bruzzone et al., 2007; Bruzzone et al., 2012b; Bruzzone et al., 2015), les monocytes (Magnone et al., 2009), les kératinocytes (Bruzzone et al., 2010; Bruzzone et al., 2012b) et les fibroblastes (Bruzzone et al., 2012c). Les différents travaux de recherche de l'équipe de Bruzzone révèlent que tous ces types cellulaires sécrètent l'ABA en présence d'un stimulus pro-inflammatoire (réponse autocrine pro-inflammatoire) (Bruzzone et al., 2010; Bruzzone et al., 2015; Tossi et al., 2012).

Des modèles animaux ont permis de déterminer les fonctions d'ABA liées à certaines maladies. Par exemple, l'équipe de Guri (2010a) a identifié que l'ABA améliorait l'inflammation du côlon chez les souris présentant une colite ou une maladie inflammatoire chronique de l'intestin. Ces auteurs ont observé que la consommation aiguë de 100 mg/kg d'ABA favorisait la réduction de l'expression des molécules d'adhésion et des cytokines pro-inflammatoires dans la muqueuse colique (Guri et al., 2010a). Ils ont également noté que l'ABA produisait des effets bénéfiques sur l'athérosclérose chez les souris, et ont particulièrement observé une réduction de l'expression des gènes inflammatoires dans l'aorte et une réduction des lésions athérosclérotiques (effet local anti-athérogène). Enfin, ils ont observé une réduction de la pression artérielle systolique (Guri et al., 2010b).

2.6.4. Biodisponibilité (ABA)

Malgré la grande quantité d'information disponible concernant les effets bénéfiques de l'ABA endogène (Ameri et al., 2015; Bassaganya-Riera et al., 2010; Hai-Hang et al., 2011), il existe beaucoup moins d'information sur les effets bénéfiques que peut entraîner l'ABA de sources exogènes (Bruzzzone et al., 2015; Guri et al., 2007; Guri et al., 2010b). En fait, l'étude des effets bénéfiques obtenus par la supplémentation en ABA exogène est limitée aux résultats du gavage chez l'animal. L'analyse des effets et de la biodisponibilité de l'ABA provenant de sources alimentaires reste alors un sujet qui attire de plus en plus l'attention des chercheurs, car il représente un domaine d'étude émergent (Magnone et al., 2015).

La biodisponibilité réfère à la quantité réelle d'une substance présente dans l'organisme par rapport à la quantité consommée (Versantvoort et al., 2005; Ming et Xiaoling, 2011). Il existe peu d'information sur la biodisponibilité de l'ABA contenu dans les aliments. Magnone et ses collaborateurs ont planifié des expériences pour mesurer la quantité d'ABA contenu dans le plasma après la consommation d'aliments, notamment de certains fruits (Magnone et al., 2015). Leurs analyses démontrent que pendant un OGTT standard, la consommation des abricots (135 g fruit frais) provoque une hausse d'ABA plasmatique plus élevée que celle obtenue après une surcharge de glucose (150 ml solution de glucose sans fruit) ($p=0,001$). Dans l'expérience de l'équipe de Magnone (2015), nous pouvons observer que les pics d'ABA plasmatique se présentent 30 ou 60 minutes après la prise de fruits, et en termes de quantité, les pics se trouvent à une concentration d'entre 5 à 16 nM.

Il semble que la biodisponibilité d'ABA varie en fonction de la quantité d'aliments accompagnant le repas car lorsque la source d'ABA est consommée avec un déjeuner et un souper riches en glucides, les pics d'ABA plasmatique se retrouvent à 120 et 240 minutes. Ces pics retardés par rapport aux pics observés pendant l'OGTT (30 et 60 minutes) suggèrent une absorption différente. Tout cela suggère une biodisponibilité élevée et une longue durée de vie de la molécule dans le plasma (Magnone et al., 2015).

2.6.5. Relation de l'ABA avec le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline

Il existe une relation étroite entre le métabolisme du glucose et la présence de la molécule d'acide abscissique. En effet, certains auteurs parlent d'un rôle de l'ABA comme hormone endogène (Bruzzone et al., 2008; Bruzzone et al., 2015; Magnone et al., 2015). Des évidences scientifiques montrent qu'une surcharge orale de glucose entraîne une sécrétion fortement augmentée d'ABA par les cellules bêta pancréatiques chez des sujets humains en santé (Ameri et al., 2015; Bruzzone et al., 2012a). Par exemple, l'équipe de Bruzzone a observé en 2012 que la prise de 150 ml d'une solution de glucose à 50 % (OGTT) provoque une augmentation de la sécrétion d'ABA (en moyenne 5,2 fois plus que la sécrétion basale) (Bruzzone et al., 2012a). De son côté, l'équipe d'Ameri (2015) a observé et interprété des données obtenues aussi lors des tests d'OGTT. Ils ont noté une corrélation positive entre l'aire sous la courbe (AUC) d'ABA et celle de la glycémie ($r=0,74$, $p=0,020$). Cette observation confirme l'implication de l'hyperglycémie comme principal facteur déclencheur de la sécrétion d'ABA chez des sujets en santé.

Ces résultats suggèrent un rôle central des cellules bêta pancréatiques pour la sécrétion d'ABA. Pour évaluer ce rôle, l'équipe de Bruzzone (2012a) a comparé les concentrations basales d'ABA des sujets atteints de diabète de type 1 par rapport aux concentrations d'ABA de sujets en santé. La destruction auto-immune des cellules bêta semble entraîner des valeurs basales plus basses par rapport aux sujets en santé ($p<0,0001$) (Bruzzone et al., 2012a). Cependant, trois ans plus tard, Ameri et ses collaborateurs (2015) ont obtenu des résultats différents chez des sujets atteints de diabète de type 2. En effet, ils ont trouvé des niveaux plasmatiques d'ABA à jeun plus élevés en comparaison avec ceux des sujets en santé ($p=0,045$) (Ameri et al., 2015). L'équipe d'Ameri a aussi mesuré les concentrations d'ABA à différents moments pendant un test d'OGTT (15, 30, 60, 90 et 120 minutes) chez des sujets diabétiques de type 2. Ils ont observé une détérioration de la sécrétion totale d'ABA (aire sous la courbe d'ABA) chez les sujets diabétiques par rapport aux sujets en santé ($p=0,019$) (Ameri et al., 2015).

Une détérioration semblable de la sécrétion d'ABA a été observée lors d'une analyse chez des femmes atteintes de diabète gestationnel (DG). En effet, le groupe de femmes DG a montré une sécrétion d'ABA diminuée de moitié pendant la grossesse par rapport à leurs homologues sans DG ($p=0,04$). Cependant, 8-12 semaines après l'accouchement, une amélioration de la sécrétion d'ABA a été observée chez ces femmes. En effet, les niveaux de sécrétion des femmes DG se sont rétablis et se sont uniformisés avec ceux de femmes en santé ($p=0,71$). En comparant les résultats obtenus des différentes expériences, les auteurs ont fait une remarque importante. Les niveaux basaux de sécrétion d'ABA des femmes postpartum avec DG ($2,39 \text{ nM} \pm 0,98 \text{ nM}$) ont

dépassé les niveaux basaux des sujets en santé ($0,74 \text{ nM} \pm 0,45 \text{ nM}$). En outre, une certaine concentration d'ABA a été identifiée dans le lait maternel, ceci a amené les auteurs à suggérer une hausse physiologique d'ABA plasmatique pendant la lactation (Ameri et al., 2015).

Une autre condition qui permet d'obtenir des concentrations plasmatiques plus élevées d'ABA est la dérivation biliopancréatique. L'évidence montre que les valeurs d'ABA plasmatique augmentent un mois après l'intervention chirurgicale autant chez les sujets obèses avec diabète ($p=0,04$) que chez les sujets obèses sans diabète ($p=0,03$). Il faut remarquer que chez les sujets non diabétiques, la hausse d'ABA plasmatique ($0,21 \pm 0,11 \text{ nmol/L}$ à $0,87 \pm 0,60 \text{ nmol/L}$ $p=0,03$) se fait en parallèle avec une tendance à la baisse des niveaux de glucose plasmatique à jeun ($91,8 \pm 3,6 \text{ mg/dL}$ à $84,6 \pm 5,4 \text{ mg/dL}$ $p=0,064$). Cette amélioration est atteinte sans changement des valeurs d'insuline ($p=0,269$) et de l'index HOMA-IR ($p=0,150$). Selon les auteurs, l'ensemble de ces résultats suggère que l'ABA peut favoriser le métabolisme du glucose, et cela grâce à une hausse de l'utilisation périphérique de glucose (Ameri et al., 2015).

D'un autre côté, il est à noter que la quantité d'ABA sécrétée lors d'un OGTT est supérieure quand il est réalisé par voie orale par rapport à la voie intraveineuse (IVGTT), suggérant un effet promoteur des incrétines sur la sécrétion d'ABA, notamment du peptide-1 de type glucagon (GLP-1) (Bruzzone et al., 2007; Bruzzone et al., 2008; Bruzzone et al., 2012a; Guri et al., 2007). Une étude récente chez le rat a également démontré que la présence d'ABA favorise une sécrétion accrue de GLP-1 par les cellules L intestinales. Il est bien établi que le GLP-1 contribue à la régulation de la glycémie, car il inhibe la sécrétion de glucagon et stimule la sécrétion d'insuline (Sandoval et D'Alessio, 2015). Cela suggère un mécanisme de rétroaction entre l'ABA et le GLP-1 pour régler l'homéostasie du glucose. (Bruzzone et al., 2015).

Des études *in vitro* avec cellules pancréatiques humaines ont montré que l'ABA sécrétée en réponse à une hausse de la glycémie participerait aussi à la sécrétion d'insuline. Le rôle de l'ABA serait de potentialiser la sécrétion d'insuline en réponse à une hausse de glucose, ou bien de stimuler la sécrétion d'insuline même en absence du glucose (Bruzzone et al., 2008). De plus, il a été démontré que l'ABA stimule l'action du GLUT-4 cellulaire, notamment au niveau des adipocytes et des myoblastes (Bruzzone et al., 2012a; Magnone et al., 2015).

Tous ces effets ont été étudiés en considérant l'action d'ABA endogène, cependant les effets de l'ABA exogène (provenant de la diète) restent encore moins compris. À cet égard, Guri et collaborateurs ont démontré que la consommation de 100 mg/kg d'ABA alimentaire favorise une amélioration de la tolérance au glucose et de l'inflammation induite par l'obésité chez les souris. Les mécanismes d'action déclenchés par la présence d'ABA incluent l'augmentation de l'expression des gènes codant pour le récepteur activé par les proliférateurs des

peroxysomes (PPAR γ) au tissu adipeux blanc, ainsi que l'atténuation de l'hypertrophie des adipocytes et de l'expression du facteur de nécrose des TNF - α (Guri et al, 2007).

De son côté, l'équipe de Magnone a récemment étudié des effets de l'ABA alimentaire chez un groupe réduit de quatorze sujets en santé. Les résultats de ses expériences montrent que le contenu d'ABA dans quelques fruits contribue à améliorer la tolérance au glucose et à réduire l'insulinémie, même si l'apport se fait en microquantités (microgrammes) (Magnone et al., 2015). Pour mesurer ces effets, les auteurs ont réalisé des tests d'OGTT. Pendant ces tests, le groupe traité a pris la solution de glucose accompagné d'un extrait de fruits contenant une dose faible d'ABA (0,85 μ g/kg). La comparaison entre les sujets traités et les non-traités (OGTT sans ABA) montre une différence dans la réponse glycémique ($p=0,004$). De plus, les concentrations d'insuline ont montré de plus basses concentrations chez le groupe traité avec ABA ($p=0,049$). Cela indique que le contrôle de la glycémie n'est pas forcément lié à une sécrétion accrue d'insuline (Magnone et al., 2015).

Dans le but de mesurer l'effet de l'ABA sur des repas standards, la même équipe de recherche a réalisé une autre expérience pendant laquelle les participants ont pris un déjeuner et un souper avec et sans ABA. Les mêmes résultats ont été obtenus lors de cette deuxième expérience. La concentration d'ABA plasmatique est significativement plus élevée chez le groupe traité ($p=0,003$), tandis que le glucose et l'insuline montrent toujours des concentrations plus basses dans ce même groupe ($p=0,003$ et $p=0,03$). Il est important de noter que ces différences significatives ont été observées tout au long de la période du test. En fait, l'effet d'ABA pour réduire la glycémie a été maintenu, même six heures après la prise de l'hormone. L'observation de bénéfices liés à l'ABA pendant une longue période est expliquée par les auteurs grâce à une élimination lente de l'hormone. Des résultats non publiés ont montré que la molécule d'ABA se lie aux protéines plasmatiques, ce qui lui permet d'éviter la filtration rénale rapide (Magnone et al., 2015).

La diminution des niveaux d'insuline observée en réponse à la prise d'un extrait d'ABA *in vivo* (Magnone et al., 2015) semble avoir un effet inverse à l'augmentation de la sécrétion d'insuline trouvée *in vitro* (Bruzzzone et al., 2008). L'équipe de Magnone explique cette différence par le décalage de l'action et de la sensibilisation cellulaire qui détermine fortement la réponse cellulaire (Magnone et al., 2015).

Cependant, la relation entre la sécrétion d'insuline et la présence d'ABA n'est pas encore bien expliquée. Il semble avoir un effet de la dose d'ABA qui influence la réponse insulinaire. Par exemple, des observations affirment que la prise d'une dose élevée d'ABA (50mg/kg) chez les rats entraîne une hausse d'insuline et une réduction du glucose plasmatique (Magnone et al., 2015). Par contre, une dose aussi faible que 1 μ g/kg réduit l'insulinémie significativement ($p=0,003$) (Magnone et al., 2015). Bref, les doses élevées d'ABA chez l'animal (à partir de 50 mg/kg) provoquent autant l'absorption de glucose que la sécrétion d'insuline, tandis que les doses

faibles d'ABA (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) n'entraînent pas une stimulation de la sécrétion d'insuline, mais seule une hausse de l'utilisation de glucose (Magnone et al., 2015).

Chapitre 3 : Hypothèses et objectifs

Depuis plusieurs années, des efforts en recherche ont été orientés vers la prévention du diabète pour aider à diminuer le fardeau lié à cette maladie au niveau mondial. En conséquence, différentes études ont rapporté une amélioration de la sensibilité à l'insuline notamment grâce à la consommation de polyphénols de petits fruits. Nous savons par ailleurs qu'en plus du rôle des polyphénols sur le contrôle de la glycémie, l'ABA pourrait aussi avoir un effet marqué. C'est la raison pour laquelle la présente étude s'est attardée à déterminer la biodisponibilité des polyphénols et de l'ABA ainsi que de leurs métabolites en relation avec les effets bénéfiques observés suite à la consommation d'un breuvage riche en polyphénols de fraises et de canneberges sur le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline, un thème encore peu étudié.

Hypothèses :

- 1) La consommation d'un breuvage riche en polyphénols de fraises et de canneberges augmente la teneur plasmatique en acide abscissique et en métabolites des polyphénols chez des humains résistants à l'insuline.
- 2) Il existe une relation entre les teneurs sanguines de certains métabolites des polyphénols et d'acide abscissique, et la sensibilité à l'insuline de ces sujets.

Objectif général :

Déterminer la biodisponibilité de métabolites de polyphénols (PP) et de l'acide abscissique (ABA) chez des sujets humains résistants à l'insuline consommant un breuvage à base d'extraits de fraises Authentique Orléans et de canneberges du Québec.

Objectifs spécifiques :

- I. Mise au point et validation d'un procédé d'extraction d'ABA et de ses métabolites à partir du plasma de sujets humains.
- II. Mesurer la composition en PP et ABA des breuvages expérimentaux.
- III. Mesurer les teneurs sanguines en métabolites de polyphénols et en ABA à différents temps pendant 6 heures suite à une consommation aiguë d'un breuvage riche en polyphénols provenant d'extraits de fraises et canneberges.

- IV. Établir des relations entre les teneurs en métabolites des PP et d'ABA avec différents paramètres du métabolisme du glucose (GDR, *M/I*, glycémie, insulinémie, C-peptide, lipides, marqueurs inflammatoires).

La présente étude fait partie d'une étude plus vaste (Étude Glucophénol) réalisée dans notre laboratoire et à laquelle j'ai participé, portant sur les effets d'un extrait de fraises et de canneberges sur la sensibilité à l'insuline chez des sujets humains résistants à l'insuline (Chapitre 4). Cette dernière étude a évalué les changements des paramètres du glucose en pré et post-intervention lors d'un clamp hyperinsulinémique-euglycémique et d'un test de tolérance au glucose chez 41 sujets.

La présente étude de biodisponibilité est une sous-étude de Glucophénol qui a été réalisée chez un sous-groupe de 17 sujets pour qui les concentrations des métabolites de polyphénols (PP) et d'acide abscissique (ABA) ont été déterminées. Des corrélations ont ensuite été calculées entre les concentrations des métabolites de polyphénols (PP) et d'acide abscissique (ABA) avec les principaux paramètres du métabolisme du glucose mesurés lors de l'étude Glucophénol, notamment la sensibilité à l'insuline et les variables composantes de l'OGTT. Quelques données sur la biodisponibilité des polyphénols suite à la consommation de l'extrait de fraises et de canneberges chez ce sous-groupe de l'étude se retrouvent au chapitre 4. Cependant la méthodologie et les résultats détaillés de même que la discussion et la conclusion de la recherche sur la biodisponibilité des polyphénols et de l'ABA en lien avec divers paramètres du métabolisme glucidique chez ce sous-groupe sont décrits dans les chapitres 5, 6, 7 et 8.

Chapitre 4: Strawberry and Cranberry Polyphenols Increase Insulin Sensitivity in Insulin-Resistant, Non-Diabetic Adults: A parallel, double-blind, controlled and randomized clinical trial

Martine Paquette, Ana Sofía Medina-Larqué, S. John Weisnagel, Yves Desjardins, Julie Marois, Geneviève Pilon, Stéphanie Dudonné, André Marette, Hélène Jacques.

Cette section correspond au manuscrit qui a été soumis à la revue scientifique *British Journal of Nutrition*.

Les contributions des auteurs ont été comme suit: S.J.W., Y.D., A.M. et H.J. ont conçu l'étude. J.M. et H.J. ont planifié l'étude alors que M.P. et J.M. ont conduit l'essai clinique. M.P. et A.S.M.L. ont réalisé les analyses statistiques. M.P., A.S.M.L., S.J.W., Y.D., A.M. et H.J. ont écrit le manuscrit. S.D. a effectué les déterminations des polyphénols. H.J. a la responsabilité principale du contenu final. M.P., A.S.M.L., S.J.W., Y.D., J.M., G.P., S.D., A.M. et H.J. ont contribué à la discussion et à l'interprétation des données.

Mon projet de maîtrise fait partie de l'étude présentée dans ce manuscrit. Ma contribution a été centrée sur l'analyse statistique et l'interprétation des données concernant la biodisponibilité de polyphénols.

4.1. Résumé

Les aliments végétaux riches en polyphénols sont associés à plusieurs avantages cardiométaboliques, comme la réduction de la glycémie postprandiale. Toutefois l'impact des polyphénols est peu connu sur la sensibilité à l'insuline mesurée à l'aide de la technique de clamp hyperinsulinémique-euglycémique. L'objectif de l'étude est de déterminer les effets d'un extrait riche en polyphénols provenant de fraises et de canneberges sur la sensibilité à l'insuline, la tolérance au glucose, la sécrétion d'insuline, le profil lipidique ainsi que sur des marqueurs reliés à l'inflammation et au stress oxydatif chez des hommes et des femmes en surpoids ou obèses et résistants à l'insuline ($n = 41$) dans un essai clinique randomisé, contrôlé, à double aveugle, selon un dispositif en bras parallèles. Les sujets du groupe expérimental ont consommé quotidiennement un breuvage riche en polyphénols (333 mg PFC de polyphénols) pendant 6 semaines, alors que le groupe contrôle a reçu un breuvage placebo sans extrait.

Au début et à la fin de la période expérimentale, la sensibilité à l'insuline (M/I) a été évaluée à l'aide d'un clamp hyperinsulinémique-euglycémique alors que la tolérance au glucose et la sécrétion d'insuline ont été déterminées à l'aide d'un test de tolérance au glucose (OGTT) de 2h. Le breuvage riche en polyphénols a augmenté le niveau de sensibilité à l'insuline ($+0,9$ (SEM 0.5) $\times 10^{-3}$ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{pmol}^{-1}$) comparativement au placebo ($-0,5$ (SEM 0.5) $\times 10^{-3}$ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{pmol}^{-1}$) ($p = 0,03$) chez nos sujets en surpoids ou obèses. Les sujets du groupe expérimental, comparés à ceux du groupe placebo, présentaient également une première phase de sécrétion d'insuline plus faible, telle que mesurée par les concentrations de C-peptide lors des 30 premières minutes de l'OGTT ($p = 0,002$). Aucune différence n'a été observée au niveau des lipides sanguins ou des marqueurs reliés à l'inflammation et au stress oxydatif. Les résultats de la présente étude indiquent que la consommation quotidienne d'un extrait riche en polyphénols de fraises et de canneberges pendant six semaines améliore la sensibilité à l'insuline d'hommes et de femmes en surpoids ou obèses et résistants à l'insuline, cependant aucun effet n'a été observé sur les autres marqueurs du risque cardiovasculaire.

4.2. Abstract

Plant derived foods rich in polyphenols are associated with several cardiometabolic health benefits, such as reduced postprandial hyperglycemia. However, their impact on whole-body insulin sensitivity using the hyperinsulinemic-euglycemic clamp technique remains under-studied. We aimed to determine the effects of strawberry and cranberry polyphenols (SCP) on insulin sensitivity, glucose tolerance, insulin secretion, lipid profile, inflammation and oxidative stress markers in free-living insulin-resistant overweight or obese human subjects (n 41) in a parallel, double-blind, controlled and randomized clinical trial. The experimental group consumed SCP beverage (333 mg SCP polyphenols) daily for 6 weeks, while the Control group received a flavor-matched Control beverage that contained 0 mg SCP. At the beginning and at the end of the experimental period, insulin sensitivity (M/I) was assessed by a hyperinsulinemic-euglycemic clamp, and glucose tolerance and insulin secretion by a 2-h oral glucose tolerance test (OGTT). Insulin sensitivity increased in the SCP group as compared to the Control group ($+0.9$ (SEM 0.5) $\times 10^{-3}$ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{pmol}^{-1}$ vs -0.5 (SEM 0.5) $\times 10^{-3}$ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{pmol}^{-1}$ respectively, $P = 0.03$) in overweight and obese subjects. Compared to the Control group, the SCP group had lower first phase insulin secretion response as measured by C-peptide levels during the first 30 minutes of the OGTT ($p=0.002$). No differences were detected between the 2 groups for lipids and markers of inflammation and oxidative stress. A 6-week dietary intervention with 333 mg polyphenols from strawberries and cranberries improved insulin sensitivity in overweight and obese non-diabetic, insulin-resistant human subjects but was not effective in improving other cardiometabolic risk factors.

4.3. Introduction

According to the International Diabetes Federation (2013), up to 592 million people worldwide (1 adult/10) will suffer from type 2 diabetes by the year 2035. This alarming increase has been predicted based on several factors, such as the high prevalence of obesity and sedentary lifestyles (Anderson et al., 2003; Jeon et al., 2007). Indeed in obese humans, elevated levels of non-esterified fatty acids, pro-inflammatory cytokines and other factors produced by adipose tissue are key determinants of insulin resistance (Wellen and Hotamisligil, 2005). To maintain plasma glucose at normal levels, pancreatic β cells must adjust their function to compensate for insulin resistance. This leads to an exhaustion of β cell insulin secretion and the development of impaired glucose tolerance and subsequent type 2 diabetes.

In recent decades, scientific evidence has shown a link between increased consumption of fruits and vegetables, particularly berries, and reduced incidence of type 2 diabetes (Mursu et al., 2014). Recent reviews have indeed reported that berries, like strawberries and cranberries, can lower markers of cardiometabolic risk (Basu et al., 2010; Basu et al., 2009; Burton-Freeman et al., 2010; Ruel et al., 2006; Basu et al., 2011; Ruel et al., 2005) and improve markers of the metabolic syndrome in humans (Afrin et al., 2016; Giampieri et al., 2015; Novotny et al., 2015). It is well-documented that strawberries and cranberries are rich in polyphenols and contain a wide variety of phenolic compounds, ranging from phenolic acids (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids), flavonoids (anthocyanins, flavonols and flavan-3-ols) to polymerized molecules (proanthocyanidins and ellagitannins) (Szajdek and Borowska, 2008). According to several *in vitro* and animal studies, polyphenols may improve glucose metabolism (Hanhineva et al., 2010) and peripheral glucose uptake in insulin-sensitive tissues by increasing GLUT4 translocation and activity and reducing oxidative stress and inflammation (Nizamutdinova et al., 2009; Denis et al., 2015). It has recently been demonstrated that anthocyanin-rich bilberry extract reduces glycemia and improves insulin sensitivity in diabetic mice (Takikawa et al., 2010). Afrin *et al.* (2016) reviewed 6 human intervention studies on the impact of strawberries on the metabolic syndrome and specifically on the prevention of type 2 diabetes, but none used the gold standard clamp technique to assess insulin sensitivity.

There are several indices calculated from the oral glucose tolerance test (OGTT) (e.g. Matsuda, ISI) or fasting glycemia and/or insulinemia (e.g. HOMA-IR, Quicki) that indirectly estimate insulin sensitivity in humans. However, these indices are not as accurate as a direct measurement of whole-body insulin sensitivity by the hyperinsulinemic-euglycemic clamp (DeFronzo et al., 1979). In this respect, the clamp technique is recognized as the reference method for measuring insulin sensitivity, and according to Antuna-Puente et al. (2011), it should be promoted in clinical human studies. So far, only 2 studies have used a hyperinsulinemic-euglycemic clamp to assess the effect of berry polyphenols on insulin sensitivity (Stull et al., 2010; Hokayem et al., 2013). According to one study in which obese non-diabetic insulin-resistant participants received a blueberry or a placebo smoothie twice a day, the mean percentage increase in insulin sensitivity was 5 times greater in the experimental

group compared with the placebo group (Stull et al., 2010). In the second study, a grape polyphenol supplement protected against a decrease in insulin sensitivity caused by a fructose-rich diet in overweight subjects (Hokayem et al., 2013). To the best of our knowledge, there are no human studies evaluating the effects of strawberry and cranberry polyphenols (SCP) on insulin sensitivity assessed by the hyperinsulinemic-euglycemic clamp in non-diabetic insulin-resistant subjects.

The proposed study aims to test the effects of a SCP blend incorporated in a beverage on insulin sensitivity and related parameters in free-living overweight or obese men and women with insulin resistance. This blend has been comprehensively analysed and contains well-defined amounts of anthocyanins, proanthocyanidins, ellagitannins, phenolic acids and flavonols (quercetins) (Dudonné et al., 2014). The primary end-point was the difference in the change in insulin sensitivity after 6 weeks of SCP consumption compared with a SCP-free Control beverage. Secondary end points aimed to assess changes in glucose tolerance, insulin secretion, plasma lipids, markers of oxidative stress and inflammation, as well as to characterise plasma phenolic components as bioavailability (efficacy) outcomes. We hypothesized that the consumption of SCP improves insulin sensitivity and lipid profile and reduces inflammatory and oxidative stress markers in overweight/obese subjects.

4.4. Methods

4.4.1. Study design. This 6-week clinical trial was a randomized, double-blinded, controlled, parallel study performed at the Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF) in Quebec City (Qc, Canada). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects were approved by the Research Ethical Committee of the Quebec University Health Center. Written informed consent was obtained from all the participants after reading a detailed consent form prior to their participation in the study. This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT01766570. The study was conducted including analyses between Spring 2012 and Fall 2015.

4.4.2. Subjects. All subjects were overweight or obese ($\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) and insulin resistant based on fasting plasma insulin level $> 60 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Jean-Pierre Després and Jean Bergeron, personal communication). Subjects may have also displayed impaired fasting plasma glucose (IFG) ($5.6\text{-}6.9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) with or without impaired glucose tolerance (IGT) ($7.8\text{-}11.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) following a 2-h 75g oral glucose tolerance test (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). Exclusion criteria included smoking, chronic disease (diabetes, cardiovascular, respiratory, renal, gastrointestinal or hepatic disease, hypertension, cancer), metabolic or acute disease, use of medication or supplement known to affect lipid or glucose metabolism, use of antioxidant supplements, major surgery in the 3 months preceding the study and significant weight change ($\pm 10\%$) within 6 months prior to beginning the study.

A total of 116 subjects, recruited in the Quebec City metropolitan area by media advertising, were first screened to examine their eligibility to participate in this study. Of the 50 eligible subjects who began the experimental period, 46 participants (20 men and 26 women) aged between 40 and 70 years completed the study. However, 5 subjects (3 in the SCP group and 2 in the Control group) were excluded from analysis because they no longer met some inclusion criteria, leading to a total of 18 men (9 in both groups) and 23 post-menopausal women (11 in the SCP group and 12 in the Control group) who were included in the statistical analysis (Supplemental Fig. 4.1).

4.4.3. Experimental groups. The polyphenol blend and Control were provided as calorie-free beverages formulated with purified water and small amounts of sucralose. A red food color was added in the Control beverage. They had thus the same taste and visual aspect. Both were formulated in a single batch by Atrium Innovations Inc. (Quebec, Canada) and were provided in dark bottles as 120 ml per day. The bottles were sealed and kept at room temperature with limited light exposure. The polyphenol blend contained 1,84 g of a mixture of dry strawberry (*Fragaria x ananassa Duch*) and cranberry (*Vaccinium macrocarpon L.*) polyphenol extracts (as GlucoPhenol™) providing an average daily dose of 333 (SD 12) mg of polyphenols (18% total polyphenols in GlucoPhenol™, as determined by Folin-Ciocalteu assay). SCP (GlucoPhenol™) provided by Nutra Canada (Quebec, Canada) complies with good manufacturing practices (GMP) according to Health Canada regulations. To determine the amount of polyphenols to be used for the present study, we first conducted a bioavailability study in rats with different doses of SCP (Dudonné et al., 2014). The dose of 333 mg polyphenols was chosen as corresponding, for a 60 kg human, to the dose (36 mg/kg) that induced the highest concentration of plasma total phenolic metabolites in the rat (Dudonné et al., 2014). The total phenolic content was monitored in the SCP beverage throughout the study ensuring a minimum of 300 mg per day. In order to simulate the taste and color of the SCP-containing beverage, a pomegranate-derived red food color was used in the SCP-free Control beverage providing a small quantity of polyphenols. The two beverages were characterized for their phenolic composition as previously described (Dudonné et al., 2014) (Table 4.1). Briefly, proanthocyanidins were

analyzed by normal-phase HPLC with fluorescence detection, and quantified using epicatechin standard. Phenolic acids were analyzed using reverse-phase UHPLC coupled to tandem mass spectrometry and their quantification was achieved using their corresponding standard when available, their aglycone or most similar phenolic structure otherwise. The daily phenolic dose provided by SCP corresponds approximately to the intake of 112 g of fresh fruits (equivalent to two servings).

4.4.4. Study timeline. Participants were equally divided into 2 groups by sex after a 2-week run-in period. During this period, subjects were asked to maintain their usual food habits and physical activity level and were limited to one unit drink or less of beer or spirits per day. The consumption of berries, wine, polyphenol supplements and all products containing berries or wine was also forbidden. Assignment of treatment was conducted via the use of random sequence of numbers. Allocation to treatment was concealed by a secure computer-assisted method enabling preservation of assignments until enrolment was assured and confirmed. Men and women were equally distributed among the 2 groups using the same computer-assisted method. The study sponsor held the trial codes which were disclosed after completion of the statistical analyses. Participants in the treatment group consumed an SCP-containing beverage, whereas the Control group received a flavour-matched SCP-free Control beverage, daily for a 6-week period. During the experimental period, subjects were asked to follow the same aforementioned recommendations as during the run-in period. Approximately 2 to 3 weeks after the beginning of the experimental period, a registered dietician called all participants once to ensure that they consumed the beverages daily and followed the prescribed instructions. Subjects were instructed to shake the bottle before consumption, and drink the beverage with or without food regardless of the time of day. To document compliance, subjects were requested to bring back the unused bottles at the end of the study. Bottle counts indicated 99% compliance in both groups. Also, a 6-week checklist was provided to all participants to identify study materials that had not been ingested, thus providing us with a tool to confirm the compliance rate of the participants.

4.4.5. Anthropometric and Blood Pressure Measurements. Fasted body weight, height, waist and hip circumferences were measured at the beginning and at the end of the study using standardized methods. BMI and waist-to-hip ratio were then calculated. Blood pressure was measured 3 times on the right arm with an automatic tensiometer (Digital Blood Pressure Monitor, model HEM-907XL, OMRON®, Canada) following a 10-minute rest at the beginning and the end of the experimental period.

4.4.6. Food Records and Questionnaires. During the screening visit, 2 online self-administered questionnaires were completed by all subjects to collect information on medical history, lifestyle, economic and socio-demographic characteristics. Participants were also asked to complete 2 online self-administered questionnaires at the beginning and at the end of the experimental period, including a validated food frequency questionnaire (FFQ) to record energy and macronutrient intake for 28 consecutive days (Labonte et al., 2012) and a short physical activity questionnaire. There was also an additional questionnaire on subjects' liking of the experimental beverages (taste, texture, etc.) and on side effects, administered at the end of the study. Changes in medication, temporary medication, natural health products intake or consumption of any other food supplements were monitored according to the exclusion criteria during the entire study period.

4.4.7. Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamp. A 120-min hyperinsulinemic-euglycemic clamp was performed at the beginning and at the end of the experimental period at the Diabetes Research Unit of the Laval University Health Center of Quebec after a 12-h overnight fast according to the method described by Piché et al. (2005). Alcohol intake was forbidden 48 h before the clamp. The insulin sensitivity index (M/I) was calculated from glucose infusion rate ($\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$) during the final 30 min of the clamp divided by body weight (kg) and then divided by the mean insulin concentration during the final 30 minutes of the clamp ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{pmol}^{-1}$) (Piché et al., 2005). For free fatty acids (FFA) analysis, additional blood samples were collected during the clamp at 0, 30, 60, 90 and 120 min, centrifuged after 30 min at room temperature and then stored at -80°C until analysis.

4.4.8. Oral Glucose Tolerance Test (OGTT). A 75-g oral glucose tolerance test was performed 2-3 days before each clamp at the beginning and the end of the experimental period at INAF to assess glucose tolerance after a 12-h overnight fast. Blood samples were collected at time points -15, 0, 15, 30, 60 and 120 min, immediately centrifuged and kept at -20°C for further measurements of glucose, insulin and C-peptide. Alcohol intake was forbidden 48 h before the test. For the second clamp and OGTT, participants were asked to consume the beverage 12 h before their appointment.

4.4.9. Blood collection and storage. Plasma and serum samples were collected in the fasting state before each OGTT and clamp, and stored at -80°C for further analysis of lipids, inflammatory markers [high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), Interleukin-6 (IL-6), TNF- α , High molecular weight (HMW) adiponectin and Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES)/CCL5], plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), a marker of cardiovascular risk, and ferric reducing antioxidant power (FRAP) and oxidized LDL, markers of oxidative stress.

4.4.10. Glucose, insulin and C-peptide. Plasma glucose was determined using an enzymatic method (Richterich and Dauwalder, 1971) and plasma insulin was measured by radioimmunoassay with polyethylene glycol separation (Desbuquois and Aurbach, 1971). Plasma C-peptide level, an indicator of insulin secretion used to estimate pancreatic β -cell function, was determined using a modified version of the method of Heding with polyclonal antibody A-4741 from Ventrex (Portland, ME) and polyethylene glycol precipitation (Desbuquois and Aurbach, 1971).

4.4.11. Lipids. LDL and HDL were isolated from fresh blood by ultracentrifugation combined with a heparin-manganese chloride precipitation (Couillard et al., 2001). Then cholesterol and triglyceride concentrations in total serum and lipoproteins were determined enzymatically by using a Technicon RA-500 analyzer (Bayer, Tarrytown, NY). FFA were determined in serum via an enzymatic colorimetric assay (Wako Diagnostics, Richmond, USA) using a Beckman Olympus AU400.

4.4.12. Inflammatory, thrombogenic and oxidative markers. Serum level of hsCRP was measured using nephelometry as described previously (Piché et al., 2005). PAI-1, IL-6 and TNF- α were measured in plasma at the Quebec Heart and Lung Institute, Quebec, using commercially available Multiplex kits (EMD Millipore, USA). Plates were read and analyzed using the Bioplex 200 system (BioRad, USA). Oxidized LDL, HMW adiponectin and RANTES were determined using a commercially available ELISA (Merckodia, Sweden; R&D Systems, USA) according to manufacturer's instructions. Total antioxidant capacity of plasma, assessed by FRAP assay, was determined as described previously (Rubió et al., 2014).

4.4.13. Bioavailability study. A sub-group of 17 subjects performed an additional bioavailability study, to identify circulating phenolic metabolites following the administration of experimental beverages. Halfway through the supplementation period (30 ± 3 days), fasted subjects were administered their respective treatment at INAF (SCP n 8, Control n 9). Blood samples were collected with EDTA-containing syringes prior and 30, 60, 120, 240 and 360 minutes after the ingestion. During the experiment, all subjects were kept fasted. Plasma samples were obtained by centrifugation (3500 rpm, 10 min at 4°C). Plasma phenolic compounds were characterized by UHPLC-MS/MS as previously described (Dudonné et al., 2014), with slight modifications. Acidified plasma samples (300 μ l) were loaded into preconditioned Waters OASIS HLB μ elution plates 2mg-30 μ m. The retained phenolic compounds were eluted with 75 μ l of acetone/ultrapure water/acetic acid solution 70/29.5/0.5 v/v/v in presence of rosmarinic acid as internal standard (1 μ g/ml final concentration). The eluted solutions were directly analyzed by UHPLC-MS/MS, using a Waters Xevo TQD mass spectrometer coupled to a Waters Acquity UHPLC (Milford, MA, USA). Phenolic metabolites were separated and identified as previously reported (Dudonné et al., 2014).

4.4.14. Statistical Analyses. We estimated sample size based on the primary end point of insulin sensitivity from data published by Stull et al. (2010) and Ouellet et al. (2007). For this purpose, we used the following values: an average difference in changes from baseline (Post vs Pre) of $17 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol}^{-1}$ for insulin sensitivity between SCP and Control after 6 weeks and an estimated standard deviation of 18. Power calculation at 80% with a two-sided significance level set at 0.05 showed that a minimum of 40 subjects, 20 in each group, was required to observe significant changes from baseline in insulin sensitivity between the SCP and Control groups over a 6-week dietary intervention, taking into account 25% expected dropouts. Statistical analyses were performed using SAS 9.3 (SAS Institute, Cary NC).

Paired *t* tests were performed to compare changes from baseline (Post vs Pre) within the same group. Because baseline insulin sensitivity was correlated with *M/I* ($r_s=0.50$; $n=39$; $P<0.001$) only, PROC MIXED for ANCOVA with baseline insulin sensitivity as covariate was used to compare the changes in *M/I* between the 2 treatments. A 2-way repeated-measures ANOVA was applied for variables with repeated measures over time (glucose, insulin, C-peptide and FFA concentrations during the OGTT or clamp). In this model, no significant time by treatment interaction was observed. Furthermore, positive incremental area under the curve (IAUC) for glucose ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), insulin ($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) and C-peptide ($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) up to 30 and 120 min were calculated using the trapezoid method with baseline value corresponding to the fasting level (timepoint -15 min of the OGTT). The percent of change in IAUC ($[\text{IAUC post value} - \text{IAUC pre value}] \times 100 / \text{IAUC pre value}$) was also calculated. PROC MIXED for a 2-way ANOVA was used to compare changes from baseline for anthropometric and blood pressure measurements, IAUC glucose, insulin and C-peptide during OGTT, lipid and cardiovascular parameters and markers of inflammation and oxidative stress. Data from men and women were pooled together because there was no sex by treatment significant interaction. As several significant correlations were observed within and between OGTT and lipid variables, a Bonferroni correction was applied, setting the two-sided significance level at $P < 0.004$ for those variables. No Bonferroni correction was applied for *M/I*, inflammatory and oxidative stress because no correlation was observed between those and the other variables, and a two-sided significance level was set at 0.05. PROC GLM ANOVA was used to compare the FFQ variables.

Plasma concentrations of phenolic metabolites were measured post-ingestion in a subgroup ($n=17$) and were compared using the Welch's *t*-test (correcting for unequal variance) when data were assumed to be normally distributed (or met the criteria for normality after log transformation), or using the non-parametric Mann-Whitney test otherwise, using GraphPad Prism 6.05 software (La Jolla, CA, USA). Correlations were assessed between circulating concentrations of phenolic metabolites (expressed as area under the plasma concentration (nM) time (min) curve between 0 and 30 minutes after the ingestion of the beverages) and changes in *M/I* and in outcomes of OGTT (expressed as the percentage of change in the IAUC for glucose, insulin and C-peptide during the first 30 minutes of the OGTT). A robust regression with *M* estimations was adjusted using the procedure

ROBUSTREG of SAS 9.4 (SAS Institute, Cary NC). To perform an optimal selection of the model, the smallest AICR (Akaike criterion) was deemed the best model. Considering the small size of the subgroup and the multiplicity of analysis, a Bonferroni correction ($P < 0.0025$) was performed for post-ingestion plasma concentration of phenolic metabolites. Bonferroni correction was also applied for the correlational analysis with the outcomes of the first 30 minutes OGTT parameters ($P < 0.017$). Because *M/I* is an index assessing insulin sensitivity by hyperinsulinemic-euglycemic clamp, correlations with *M/I* changes were analyzed separately from the OGTT rate changes and remained at a statistically significant level of $P \leq 0.05$. The results are presented as means with their standard errors.

4.5. Results

4.5.1. Subject Baseline Characteristics. Baseline clinical and laboratory characteristics of all participants are shown in Table 4.2. All subjects were insulin resistant, overweight or obese ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$) with increased abdominal adiposity (waist circumference $> 94 \text{ cm}$ for men and $> 80 \text{ cm}$ for women). There were no differences between the 2 groups regarding age, body weight, BMI, waist and hip circumferences, lipid profile, fasting plasma glucose, 2-h plasma glucose or fasting plasma insulin.

At baseline, all subjects had a high fasting plasma insulin level ($> 60 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$), of which 31 subjects had fasting plasma insulin levels $> 90 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$. From data collected during the pre-intervention OGTT and according to the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2003), 12 subjects had both IFG ($5.6\text{-}6.9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) and IGT ($7.8\text{-}11.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 17 subjects had IFG only, 3 subjects had IGT only and 9 among them had normal glucose tolerance (NGT) (Fasting plasma glucose $< 5.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and plasma glucose $< 7.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ after 120 minutes).

4.5.2. Food Intake and physical activity. According to FFQ data (Supplemental Table 4.1), there were no differences in baseline dietary intake or in changes from baseline (Post vs Pre) in energy and macronutrient intake between the 2 groups. In addition, no change from the level of physical activity was perceived during the study (data not shown). As for side effects, no important harms or unexpected effects were reported in either group.

4.5.3. Anthropometric Measurements and Blood Pressure. Body weight, anthropometric, systolic and diastolic blood pressure measurements were performed at the beginning and at the end of the experimental period. No differences in changes from baseline (Post vs Pre) were observed for these parameters between the 2 groups (Supplemental Table 4.2).

4.5.4. Insulin Sensitivity and other parameters of glucose homeostasis. Insulin sensitivity (*M/I*) increased by 14% (+0.9 (SEM 0.5 x10⁻³ mg·kg⁻¹·min⁻¹·pmol⁻¹)) (Fig. 4.1) in the SCP group (P = 0.05) whereas it decreased by 7% (-0.5 (SEM 0.5 x 10⁻³mg·kg⁻¹·min⁻¹·pmol⁻¹)) in the Control group without achieving the level of significance (P = 0.28). When we compared the changes from baseline (Post vs Pre) between the 2 treatments, SCP showed significant improvement in insulin sensitivity (P = 0.03) compared with Control.

We also performed repeated measurements ANOVA for glucose (Table 4.3), insulin (Table 4.3) and C-peptide (Fig. 4.2A and 4.2B) up to 120 minutes during OGTT and for FFA (Supplemental Fig. 4.2) over time during the clamp. There were no differences between baseline values (Pre) for all glucose metabolism parameters. While glucose, insulin and FFA responses were not different between treatments, there was an overall increase in C-peptide with Control compared with SCP (P=0.002) (Fig. 4.2C).

The mean IAUC up to 30 min corresponding to the early phase of insulin response during the OGTT and the mean IAUC up to 120 min after the OGTT are shown in Table 4.3 for plasma glucose and insulin and in Fig. 4.3 and 4.4 for C-peptide. No differences in changes from baseline (Post vs Pre) for plasma IAUC glucose (Table 4.3), IAUC insulin (Table 4.3) and IAUC C-peptide (Fig. 4.3) were observed up to 120 min within each group or between the 2 groups. However, compared to the baseline (Pre) values, plasma IAUC C-peptide up to 30 min was increased by 26% in the Control group (P= 0.003) and non significantly reduced by 8% in the SCP group (P= 0.21). These changes were different between the 2 groups (P= 0.002) (Fig. 4.4).

4.5.5. Lipid profile. No differences in changes from baseline (Post vs Pre) for total, LDL and HDL cholesterol or TG were observed within each group or between the 2 groups (Table 4.4).

4.5.6. Inflammatory, thrombogenic and oxidative markers. The effects of SCP on inflammatory and oxidative stress markers are shown in Table 4.4. No differences in changes from baseline (Post vs Pre) for pro-inflammatory cytokines, hsCRP, HMW adiponectin, PAI-1, oxidized-LDL, RANTES or total antioxidant capacity of plasma (FRAP) were observed within each group or between the 2 groups.

4.5.7. Phenolic composition and bioavailability of experimental beverages. As shown in Table 4.1, SCP-containing and SCP-free Control beverages differed significantly in terms of phenolic content. SCP contained 4-times more proanthocyanidins and 6-times more phenolic acids. In particular, SCP was characterized by a very high content of coumaric acids: *p*-coumaric acid, *m*-coumaric acid and coumaroyl-glucoside. At the 30-day midpoint of the daily consumption of the beverages, around 20 phenolic metabolites were identified in the plasma of volunteers. They are present in circulation as conjugate metabolites and microbial degradation products, because the native phenolic compounds are normally extensively metabolized. Among these, *p*-coumaric acid, *m*-coumaric acid, ferulic acid and hydroxyhippuric acid, whose absorption kinetics is presented in Fig. 4.5, were detected in significantly higher concentration following the consumption of SCP, relative to Control (respective AUC of 17.4 (SEM 1.8) vs 0, 85.9 (SEM 5.3) vs 0.7 (SEM 0.3), 20.3 (SEM 3.9) vs 0.9 (SEM 0.4), 204.6 (SEM 25.4) vs 38.6 (SEM 6.9), $P < 0.0001$). A significant negative correlation was found between plasma concentration of *p*-coumaric acid (AUC 0-30 min) and the percentage of change (before and after treatment) of the above-mentioned C-peptide response (first 30 minutes of the OGTT) ($P = 0.0046$, $r^2 = 0.34$). No correlations were reported between the remaining metabolites and the parameters related to insulin sensitivity and the first 30 minutes OGTT.

4.6. Discussion

This study investigated the impact of daily consumption of a 333 mg strawberry and cranberry polyphenols blend on insulin sensitivity in insulin-resistant, non-diabetic subjects over a period of 6 weeks. The main outcomes of this study are: 1) an improvement in insulin sensitivity, as assessed by the hyperinsulinemic-euglycemic clamp, and 2) the prevention of further compensatory insulin secretion, as shown by a lack of increase in the early C-peptide response during an OGTT. Analysis of plasma phenolic metabolites also revealed that the most abundant phenolic acids identified with SCP intake were *p*-coumaric acid, *m*-coumaric acid, ferulic acid and hydroxy-hippuric acid. Interestingly, plasma *p*-coumaric acid was inversely related to the early C-peptide response during OGTT.

The hyperinsulinemic-euglycemic clamp is the gold standard and reference technique for assessing insulin sensitivity when whole-body insulin sensitivity is the primary outcome (DeFronzo et al., 1979). It is a steady-state technique that requires a constant insulin infusion. It is the most reliable technique in a clinical study like ours with relatively low number of subjects. Although indirect OGTT-derived indices (e.g. Matsuda-index and ISI-index) may be of particular interest in prospective studies with large cohorts, they have potential limitations in reproducibility due to intra-individual variation in plasma glucose and insulin responses during the OGTT (Balion et al., 2007). With regards to the indirect indices based on fasting levels of glucose and insulin (e.g.

HOMA-IR and Quicki), they tend to assess hepatic insulin resistance rather than peripheral and whole-body insulin sensitivity (Borai et al., 2011).

Our study demonstrates an improvement in insulin sensitivity following the consumption of SCP compared to Control. These results are in good agreement with those of Stull et al. (2010) who observed a 22% increase in insulin sensitivity, assessed with the hyperinsulinemic-euglycemic clamp technique, following a 6-week daily dietary supplementation with whole blueberries in obese, non-diabetic, and insulin-resistant human subjects, and those of Hokayem et al. (2013) who noted that the negative effects of fructose used to develop insulin resistance were counteracted by grape polyphenol supplementation in a double-blind controlled trial. It is noteworthy that our dose of polyphenols (a total of 333 mg of combined strawberry and cranberry polyphenols per day) which is a much lower dose than those used by Stull et al. (2010) (1462 mg polyphenols from blueberry powder/day) and Hoyakem et al. (2013) (2 g from grape polyphenols/day) can exert a comparable effect on insulin sensitivity. The present results with SCP are also in good agreement with those reported by Edirisinghe et al. (2011) who observed a reduction in postprandial insulin response in overweight adults after a single consumption of a high-carbohydrate, moderate-fat meal with a strawberry beverage containing 10 g of strawberry in a freeze-dried form (95 mg of polyphenols). Furthermore, Park et al. (2016) observed a reduction in systolic and diastolic blood pressure concomitant with a trend to improve fasting insulin and insulin sensitivity in subjects with pre-hypertension consuming a grape seed extract-containing beverage (528 mg of polyphenols). Most of these subjects were hyperinsulinæmic or insulin resistant. This is of interest in the present study, given the evidence supporting a link between hypertension and insulin resistance through insulin mediated signaling pathways (Addison et al., 2008) and NO production (Kim et al., 2006). Similarly, Rodriguez-Mateos et al. (2013) reported that endothelial function (at 1 h) in healthy men increased in a dose-dependent manner up to an intake of 766 mg polyphenols from a blueberry drink and reached a plateau at higher doses. Therefore, the present results together with those from the three latter studies suggest that polyphenol doses lower than 800 mg may offer metabolic benefits. Of note, the beneficial effect of SCP on insulin sensitivity observed in the present study cannot be explained by variations in energy and macronutrient intake, body weight or body fat mass since no changes in these parameters were seen between the 2 groups.

The progression from normal glucose tolerance to type 2 diabetes is characterized by both an increase in insulin resistance and a decrease in insulin secretion caused by β -cell dysfunction. Insulin resistance is defined as decreased tissue sensitivity to insulin to stimulate glucose uptake and utilization. In the early stages of insulin resistance, plasma glucose is maintained at normal levels by a compensatory increase in insulin secretion, the first abnormality being an increase in first-phase insulin secretion by pancreatic β -cells (Khan et al., 1993). But when β -cell compensation fails, fasting plasma glucose levels rise (IFG), leading to impaired glucose tolerance (IGT) and eventually type 2 diabetes (Pratley and Weyer, 2002). In the context of the present study, the beverage

rich in polyphenols prevented a further elevation in early-phase insulin release, as indicated by C-peptide levels, and prevented the overall increase of insulin secretion, suggesting that the improvement in insulin sensitivity after consumption of the SCP beverage may have precluded a further compensatory increase in insulin secretion. A reducing effect of a polyphenol-rich cranberry extract has already been observed on C-peptide levels in high fat/high sucrose-fed mice (Anhê et al., 2015). However, in humans, to the best of our knowledge, this is the first report showing a beneficial effect of a strawberry and cranberry polyphenol extract on C-peptide response during an OGTT.

In this study, we found differences between plasma the SCP and the Control groups in the levels of four polyphenolic compounds and metabolites (*p*-coumaric acid, *m*-coumaric acid, ferulic acid, hydroxyhippuric acid). These levels were found in the same low micromolar range as that reported by Feliciano et al. (2016) and Park et al. (2016), where physiological and metabolic bioactivity is probable (Scheepens et al., 2010). Particularly of interest, an increased plasma concentration of *p*-coumaric acid during the 30 minutes post-consumption was found to significantly correlate with a reduced secretion of C-peptide compared to the Control during the early phase of the OGTT response ($P = 0.0046$, $r^2 = 0.34$). Although a direct effect of *p*-coumaric acid on insulin sensitivity cannot be confirmed by these results, this compound was recently found to stimulate AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation, leading to increased glucose uptake in L6 myocytes (Yoon et al., 2013). *p*-Coumaric acid was also found to improve glucose uptake *in vitro* through synergistic interactions with a commercial oral hypoglycemic drug (thiazolidinedione) (Prabhakar and Doble, 2011). Moreover, since only 5-10% of ingested phenolic compounds are assumed to be absorbed (Cardona et al., 2013), a large amount proceeds to the large intestine (especially polymeric forms such as proanthocyanidins) where they can exert an activity. Indeed, we recently showed that cranberry polyphenols can improve insulin sensitivity in high-fat fed mice, leading to reduced inflammation in both intestinal and hepatic tissues, through modulation of gut microbiota (Anhê et al., 2015). In this latter study, changes in gut microbiota were detected following 5 weeks of supplementation, suggesting that 6 weeks of supplementation in humans was very likely a period long enough to modulate their intestinal microbiota. These SCP polyphenols may also improve insulin sensitivity by increasing insulin signaling and glucose transport in skeletal muscle cells. Indeed, Nizamutdinova et al. (2009) showed that anthocyanins administered by gavage can improve insulin signaling by stimulating tyrosine phosphorylation of the insulin receptors and by increasing the expression of GLUT4 glucose transporters in muscle of streptozotocin (STZ)-diabetic rats.

While our study provides evidence for the beneficial effect of SCP treatment on insulin sensitivity, this finding was not associated with a decrease in other markers of cardiovascular risk. Nutritional studies are somewhat contradictory regarding the effects of strawberries and cranberries on cardiometabolic markers such as plasma lipids, oxidative stress, antioxidant capacity and inflammation. Indeed, lipid changes seen in our study contrast

with those reported by Basu et al. (2010) and Lee et al. (2008) who observed a decrease in total cholesterol and LDL-C in human subjects consuming either freeze-dried strawberry powder (Basu et al., 2010) or cranberry extract (Lee et al., 2008). Similarly, our findings on inflammatory and oxidative markers do not agree with those of Moazen et al. (2013) who observed a decrease in plasma CRP and oxidized LDL after administration of freeze-dried strawberries, and those of Ruel et al. (2006,2005,2008) who observed an increase of plasma HDL cholesterol, antioxidant capacity and a decrease in oxidized LDL after consumption of low-calorie cranberry drink. Additionally, some clinical studies investigating the effects of ~300 mg polyphenols from freeze-dried strawberry powder reported reducing effects on fasting oxidized LDL for 6 weeks (Ruel et al., 2006), and postprandial CRP and IL-6 (Edirisinghe et al., 2011) in an overweight, hyperlipidemic population. However, other clinical studies using freeze-dried strawberry powder or reduced-energy cranberry juice have demonstrated, as in our study, a lack of effect on antioxidant status (Zunino et al., 2012), on CRP, IL-6 and TNF- α (Zunino et al., 2012; Ellis et al., 2011).

Discrepancies between our results on lipids and inflammatory and oxidative markers and those of the above-cited studies (Burton-Freeman et al., 2010; Ruel et al., 2006; Basu et al., 2011; Afrin et al., 2016; Edirisinghe et al., 2011; Lee et al., 2008; Moazen et al., 2013; Ruel et al., 2008) may stem from the delivery form of strawberry (freeze-dried form vs SCP extract) or cranberry (juice, dried fruit forms or SCP extract), the experimental design (acute vs longer term), the polyphenol dose or the population studied. In the present study, the SCP was a strawberry and cranberry polyphenol enriched extract providing 333 mg/day of polyphenols and was devoid of fibers, sugars, minerals and vitamins. On the one hand, this amount of polyphenols, which corresponds to the quantity supplied by about 120 g of fresh fruits, is equivalent to approximately $\frac{1}{4}$ the level of polyphenols present in the freeze-dried strawberry powder used by Basu et al. (2009; 2010) and Moazen et al. (2013) (1001 to 2006 mg polyphenols/day) and in the low-energy cranberry juice used in previous studies (Basu et al., 2011; Ruel et al., 2005; Afrin et al., 2016; Szajdek and Borowska, 2008; Ruel et al., 2008). On the other hand, the key difference between the SCP extract used in the present study and these other sources of polyphenols is the lack of fermentable fibers. It is well recognized that strawberries (Quirós-Sauceda et al., 2014) and cranberries (Hotchkiss et al., 2015) contain significant amounts of fermentable soluble and insoluble fibers that may reduce lipids, inflammatory and oxidative markers (Erkkilä and Lichtenstein, 2006). Therefore, the lack of dietary fiber in our extract is among the plausible explanations for the absence of SCP effect on lipids, inflammatory and oxidative markers in the current study. Moreover, the present results and those from a study by Hoyakem et al. (2013) who used a berry (grape) polyphenol extract, suggest that the various phenol compounds present in berries may specifically improve insulin sensitivity in humans.

The participants in this study were insulin resistant and included both genders and a relatively broad age range (40–70 y). Given the free-living nature of the study, the results can most likely apply to an overweight adult pre-

diabetic population. Despite the parallel arm design and polyphenol content of the beverage used, the present study did allow sufficient power to detect statistical differences on the primary endpoint of insulin sensitivity. However, this study was not sufficiently powered to detect differences on secondary endpoints, in particular hsCRP, TNF- α and oxidized-LDL. Yet, it would have been interesting to obtain muscle and adipose tissue biopsies to test whether SCP reduced inflammation in these tissues. Such biopsies may have also allowed us to ascertain the identity of the molecules involved in cellular insulin signaling. Nonetheless, considering the robust nature of our randomized, controlled, double-blind study, it is likely that the consumption of SCP resulted in the improvement in the hyperinsulinemic-euglycemic clamp insulin sensitivity and OGTT parameters. Finally, since this is a proof-of-concept study, it will be necessary to consider longer-term interventions in larger populations of subjects to confirm the results and expand upon the potential role of SCP in preventing or delaying the onset of type 2 diabetes.

In conclusion, our data indicate that 6-week consumption of 333 mg polyphenols from strawberries and cranberries may improve insulin sensitivity and prevent an increase in compensatory insulin secretion without affecting plasma lipids, CRP, pro-inflammatory cytokines and antioxidant capacity. Controlled dose-response trials are needed to ascertain the lower and upper range of activity of these polyphenols, as well as larger and longer-term studies.

4.7. Acknowledgements

The authors are grateful to Marie-Christine Dubé, Louise Rhéaume, Valérie-Ève Julien, Marie Tremblay and Camille Lambert, from the Diabetes Research Unit (CHU of Quebec) who helped in performing hyperinsulinemic-euglycemic clamps and Steeve Larouche and Danielle Aubin, the nurses who performed OGTT (INAF, Laval University). The authors also thank Hélène Crépeau from Laval University, for help with statistical analysis and the subjects who participated in this study. Finally, the authors acknowledge Jean-Paul-Houle Funds, Diabète Québec and The Institute of Nutrition and Functional Foods for scholarships.

The present study was supported by the Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec (CRIBIQ), Atrium Innovations Inc., and Nutra Canada.

The Authors' Contributions were as follows: S.J.W., Y.D., A.M. and H.J. designed research. J.M. and H.J. planned the study. M.P. and J.M. conducted research. M.P. and A.S.M.L. performed statistical analysis. M.P., A.S.M.L., S.J.W., Y.D., A.M. and H.J. wrote the paper. S.D. performed polyphenol determinations. H.J. had primary responsibility for final content. M.P., A.S.M.L., S.J.W., Y.D., J.M., G.P., S.D., A.M. and H.J. contributed to the discussion and data interpretation. All authors have read and approved the final manuscript. The Study

funders had no role in the study design or in the collection, analysis, interpretation of data, and decision to publish. The authors have sole responsibility for the manuscript content. None of the authors has any conflicts of interest.

Parts of this study were presented in abstract form at the 17th Annual CDA/CSEM Professional Conference & Annual Meetings, Winnipeg, Manitoba, Canada, 22-25 October 2014.

4.8. References chapter 4

Addison S, Stas S, Hayden MR et al. (2008). Insulin resistance and blood pressure. *Curr Hypertens Rep* 10, 319–325.

Afrin S, Gasparini M, Forbes-Hernandez TY et al. (2016). Promising health benefits of the strawberry: a focus on clinical studies. *J Agric Food Chem* 64, 4435-4449.

Anderson JW, Kendall CW, Jenkins DJ (2003). Importance of weight management in type 2 diabetes: Review with meta analysis of clinical studies. *J Am Coll Nutr* 22, 331-9.

Anhê FF, Roy D, Pilon G et al. (2015). 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.

Antuna-Puente B, Disse E, Rabasa-Lhoret R et al. (2011). How can we measure insulin sensitivity/resistance? *Diabetes and Metabolism* 37, 179-188.

Balioni CM, Raina PS, Gerstein HC et al. (2007). Reproducibility of impaired glucose tolerance (IGT) and impaired fasting glucose (IFG) classification: a systematic review. *Clin Chem Lab Med* 45, 1180–1185.

Basu A, Betts NM, Ortiz J et al. (2011). Low-energy cranberry juice decreases lipid oxidation and increases plasma antioxidant capacity in women with metabolic syndrome. *Nutr Res (NY)* 31, 190–196.

Basu A, Fu DX, Wilkinson M et al. (2010). Strawberries decrease atherosclerotic markers in subjects with metabolic syndrome. *Nutr Res (NY)* 30, 462–469.

Basu A, Wilkinson M, Penugonda K et al. (2009). Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. *Nutr J* 8, 43.

Borai A, Livingstone C, Kaddam I et al. (2011). Selection of the appropriate method for the assessment of insulin resistance. *BMC Med Res Methodol* 11, 158-167.

Burton-Freeman B, Linares A, Hyson D et al. (2010). Strawberry modulates LDL oxidation and postprandial lipemia in response to high-fat meal in overweight hyperlipidemic men and women. *J Am Coll Nutr* 29, 46-54.

Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S et al. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr Biochem* 24, 1415-1422.

Couillard C, Després JP, Lamarche B et al. (2001). Effects of endurance exercise training on plasma HDL cholesterol levels depend on levels of triglycerides: evidence from men of the Health, Risk Factors, Exercise Training and Genetics (HERITAGE) Family Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1226–1232.

DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237, E214–223.

Denis MC, Desjardins Y, Furtos A et al. (2015). Prevention of oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction in the intestine by different cranberry phenolic fractions. *Clin Sci (Lond)* 128, 197-212.

Desbuquois B, Aurbach GD (1971). Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 33, 732–738.

Dudonné S, Dubé P, Pilon G et al. (2014). Modulation of strawberry/cranberry phenolic compounds glucuronidation by co-supplementation with onion: Characterization of phenolic metabolites in rat plasma using an optimized μ SPE-UHPLC-MS/MS method. *J Agric Food Chem* 62, 3244–3256.

Edirisinghe I, Banaszewski K, Cappozzo J et al. (2011). Strawberry anthocyanin and its association with postprandial inflammation and insulin. *Br J Nutr* 106, 913-922.

Ellis CL, Edirisinghe I, Kappagoda T et al. (2011). Attenuation of meal-induced inflammatory and thrombotic responses in overweight men and women after 6-week daily strawberry (*Fragaria*) intake – A randomized placebo-controlled trial. *J Atheroscler Thromb* 18, 318-327.

Erkkilä AT & Lichtenstein AH (2006). Fiber and cardiovascular disease risk: how strong is the evidence? *J Cardiovasc Nurs* 21, 3-8.

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2003). Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26, 3160-3167.

Feliciano RP, Boeres A, Massacessi L et al. (2016). Identification and quantification of novel cranberry-derived plasma and urinary (poly)phenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 599, 31-41.

Giampieri F, Forbes-Hernandez TY, Gasparri M et al. (2015). Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food Funct* 6, 1386–1398.

Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I et al. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci* 11, 1365-1402.

Hokayem M, Blond E, Vidal H et al. (2013). Grape polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 36,1454-1461.

Hotchkiss AT Jr, Nuñez A, Strahan GD et al. (2015). Cranberry xyloglucan structure and inhibition of *Escherichia coli* adhesion to epithelial cells. *J Agric Food Chem* 63, 5622–5633.

International Diabetes Federation (2013). In *IDF Diabetes Atlas* pp11-12. 6th edition. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.

Jeon CY, Lokken RP, Hu FB et al. (2007). Physical activity of moderate intensity and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 30, 744-752.

Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK et al. (1993). Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 42, 1663-1672.

Kim JA, Montagnani M, Koh KK et al. (2006). Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 113, 1888–1904.

Labonte ME, Cyr A, Baril-Gravel L et al. (2012). Validity and reproducibility of a web-based, self-administered food frequency questionnaire. *Eur J Clin Nutr* 66, 166-173.

Lee I T, Chan Y C, Lin CW et al. (2008). Effect of cranberry extracts on lipid profiles in subjects with type 2 diabetes. *Diabet Med* 25, 1473–1477.

Moazen S, Amani R, Homayouni Rad A et al. (2013). Effects of freeze-dried strawberry supplementation on metabolic biomarkers of atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes: a randomized double-blind controlled trial. *Ann Nutr Metab* 63, 256-264.

Mursu J, Virtanen JK, Tuomainen TP et al. (2014). Intake of fruit, berries, and vegetables and risk of type 2 diabetes in Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Clin Nutr* 99, 328-333.

Nizamutdinova IT, Jin YC, Chung JI et al. (2009). The anti-diabetic effect of anthocyanins in streptozotocin-induced diabetic rats through glucose transporter 4 regulation and prevention of insulin resistance and pancreatic apoptosis. *Mol Nutr Food Res* 53, 1419-1429.

Novotny JA, Baer DJ, Khoo C et al. (2015). Cranberry juice consumption lowers markers of cardiometabolic risk, including blood pressure and circulating C-reactive protein, triglyceride, and glucose concentrations in adults. *J Nutr* 145, 1185–1193.

Ouellet V, Marois J, Weisnagel SJ et al. (2007). Dietary cod protein improves insulin sensitivity in insulin-resistant men and women: a randomized controlled trial. *Diabetes Care* 30, 2816-2821.

Park E, Edirishinghe I, Choy YY et al. (2016). Effects of grape seed extract beverage on blood pressure and metabolic indices in individuals with pre-hypertension: a randomised, double-blinded, two-arm parallel, placebo-controlled trial. *Br J Nutr* 115, 226-238.

Piché ME, Lemieux S, Weisnagel SJ et al. (2005). Relation of high-sensitivity C-reactive protein, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and fibrinogen to abdominal adipose tissue, bloodpressure, and cholesterol and triglyceride levels in healthy postmenopausal women. *Am J Cardiol* 96, 92–97.

Piche ME, Weisnagel SJ, Corneau L et al. (2005). Contribution of abdominal visceral obesity and insulin resistance to the cardiovascular risk profile of postmenopausal women. *Diabetes* 54, 770-777.

Prabhakar PK, Doble M (2011). Interaction of cinnamic acid derivatives with commercial hypoglycemic drugs on 2-deoxyglucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *J Agric Food Chem* 59, 9835-9844.

Pratley RE, Weyer C (2002). Progression from IGT to type 2 diabetes mellitus: the central role of impaired early insulin secretion. *Curr Diab Rep* 2, 242-248.

Quirós-Sauceda AE, Palafox-Carlos H, Sáyago-Ayerdi SG et al. (2014). Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food Funct* 5, 1063–1010.

Richterich R, Dauwalder H (1971). Determination of plasma glucose by hexokinase- glucose-6-phosphate dehydrogenase method. *Schweiz Med Wochenschr* 101, 615–618.

Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Bergillos-Meca T et al. (2013). Intake and time dependence of blueberry flavonoid-induced improvements in vascular function : a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study with mechanistic insights into biological activity. *Am J Clin Nutr* 98, 1179-1191.

Rubió L, Serra A, Chen CY et al. (2014). Effect of the co-occurring components from olive oil and thyme extracts on the antioxidant status and its bioavailability in an acute ingestion in rats. *Food Funct* 5, 740-747.

Ruel G, Pomerleau S, Couture P (2008). Low-calorie cranberry juice supplementation reduces plasma oxidized LDL and cell adhesion molecule concentrations in men. *Br J Nutr* 99, 352-359.

Ruel G, Pomerleau S, Couture P et al. (2005). Changes in plasma antioxidant capacity and oxidized low-density lipoprotein levels in men after short-term cranberry juice consumption. *Metabolism* 54, 856-861.

Ruel G, Pomerleau S, Couture P et al. (2006). Favourable impact of low-calorie cranberry juice consumption on plasma HDL-cholesterol concentrations in men. *Br J Nutr* 96, 357–364.

Scheepens A, Tan K, Paxton JW (2010). Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. *Genes Nutr* 5, 75-87.

Stull AJ, Cash KC, Johnson WD et al. (2010). Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women. *J Nutr* 140, 1764-1768.

Szajdek A, Borowska EJ (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods Hum Nutr* 63, 147-156.

Takikawa M, Inoue S, Horio F et al. (2010). Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J Nutr* 140, 527-533.

Wellen KE, Hotamisligil GS (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115, 1111-1119.

Yoon SA, Kang SI, Shin HS et al. (2013). *p*-Coumaric acid modulates glucose and lipid metabolism via AMP-activated protein kinase in L6 skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 432, 553-557.

Zunino SJ, Parelman MA, Freytag TL et al. (2012). Effects of dietary strawberry powder on blood lipids and inflammatory markers in obese human subjects. *Br J Nutr* 108, 900-909.

Table 4. 1. Phenolic composition of experimental beverages*
(Mean values and standard deviations)

Phenolic composition ($\mu\text{g}/120\text{ml}$)	SCP		Control	
	Mean	SD	Mean	SD
Proanthocyanidins	20040	522	5070	169
Monomers	4156	9	1276	36
Dimers	237	4.8	ND	ND
Polymers	15647	528	3794	133
Phenolic acids	28206	256	5013	138
Gallic acid	728	5	11	2
Hydroxybenzoic acid	3334	94	103	12
<i>p</i> -coumaric acid	9095	171	47	9
<i>m</i> -coumaric acid	2051	80	6	1
Cafeic acid	372	22	ND	ND
Ferulic acid	65	7	33	4
Vanillic acid	107	3	3	0.3
Caffeoyl glucoside	1282	54	8	2
Coumaroyl glucoside	5508	178	9	4
Chlorogenic acid	927	14	240	28

ND, not detectable/below limit of detection; SCP, strawberry and cranberry polyphenols.

* The Welch's t-test and the Mann-Whitney test showed significant differences ($P < 0.05$) in concentrations of each measured phenolic compound in SCP beverage compared to Control.

The SCP beverage provided an average daily dose of 333 (SD 12) mg of polyphenols, as determined by Folin-Ciocalteu assay.

Table 4. 2. Baseline characteristics of the study participants*
(Mean values with their standard errors; numbers and percentages)

Variables	SCP (<i>n</i> 20)		Control (<i>n</i> 21)		<i>P</i> value
	Mean	SEM	Mean	SEM	
Age (years)	57	1	60	1	0·18
Body weight (kg)	85	3	85	3	0·97
BMI (kg·m ⁻²)	31	1	31	1	0·91
Waist circumference (cm)	104	3	104	2	0·95
Hip circumference (cm)	111	2	111	2	0·93
Cholesterol (mmol·L ⁻¹)					
Total	5·70	0·17	5·37	0·22	0·07
HDL	1·25	0·05	1·33	0·05	0·24
LDL	3·52	0·17	3·20	0·15	0·18
Total TG (mmol·L ⁻¹)	2·03	0·24	1·73	0·26	0·39
Total chol./HDL chol. ratio	4·8	0·3	4·1	0·2	0·07
Fasting plasma glucose (mmol·L ⁻¹)	6·0	0·1	5·8	0·1	0·16
2-h plasma glucose (mmol·L ⁻¹)	7·7	0·4	7·4	0·4	0·71
Fasting plasma insulin (pmol·L ⁻¹)	118	11	130	11	0·45
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Sex					
Women	11	55	12	57	-
Men	9	45	9	43	-

Chol., cholesterol; SCP, strawberry and cranberry polyphenols.

* PROC MIXED ANOVA test showed no significant differences in baseline characteristics between the 2 groups

Table 4. 3. IAUC and time point values over time during OGTT for glucose and insulin before and after 6-week consumption of SCP or Control in insulin-resistant human subjects

(Mean values with their standard errors)

Variables	SCP (n 20)				P_1^*	Control (n 21)				P_2^*	P^\ddagger
	Pre		Post			Pre		Post			
	Mean	SEM	Mean	SEM		Mean	SEM	Mean	SEM		
IAUC glucose up to 30 min	56	4	58	6	0.77	55	5	53	4	0.48	0.77
Plasma glucose (mmol·L ⁻¹)					0.42					0.53	0.31 [‡]
-15	6.1	0.1	6.1	0.1		5.9	0.1	6.0	0.1		
0	6.0	0.1	6.1	0.1		5.8	0.1	5.9	0.1		
15	8.1	0.2	8.1	0.3		7.7	0.2	8.0	0.2		
30	9.7	0.3	9.8	0.3		9.3	0.3	9.4	0.3		
60	10.3	0.5	10.6	0.4		9.9	0.5	9.5	0.4		
120	7.7	0.4	7.5	0.4		7.4	0.4	6.9	0.3		
IAUC glucose up to 120 min	348	31	357	32	0.71	329	34	291	27	0.11	0.16
IAUC insulin up to 30 min	9	1	8	1	0.56	10	1	12	2	0.12	0.13
Plasma insulin (pmol·L ⁻¹)					0.41					0.34	0.21 [‡]
-15	129	11	132	14		134	12	144	16		
0	118	9	120	13		130	13	131	17		
15	402	37	418	53		479	58	600	85		
30	729	73	645	76		759	79	822	106		
60	1006	99	968	104		1173	148	1064	127		
120	895	111	818	99		1094	184	1208	233		
IAUC insulin up to 120 min	80	8	74	8	0.40	95	12	95	13	0.94	0.51

IAUC, positive incremental area under the curve; SCP, strawberry and cranberry polyphenols.

* P -value obtained from paired t test to compare changes from baseline (Post vs Pre) within the SCP (P_1) and Control (P_2) groups.

[†] P -value represents between-treatment comparison of changes from baseline (Post vs Pre), assessed by PROC MIXED ANOVA.

[‡] P -value obtained from repeated measures ANOVA performed on the averages of all time points for SCP and Control to assess treatment effect. Due to significant correlations within OGTT variables, a Bonferroni correction was applied for these variables, defining level of statistical significance at $P < 0.004$.

IAUC glucose (mmol·L⁻¹·min⁻¹), IAUC insulin (nmol·L⁻¹·min⁻¹).

Table 4. 4. Lipid profile, inflammatory and thrombogenic markers, and oxidative status before and after 6-week consumption of SCP or Control in insulin-resistant human subjects
(Mean values with their standard errors)

Variables	SCP (<i>n</i> 20)					Control (<i>n</i> 21)					<i>P</i> ₂ [*]	<i>P</i> [§]
	Pre		Post		<i>P</i> ₁ [*]	Pre		Post				
	Mean	SEM	Mean	SEM		Mean	SEM	Mean	SEM			
Cholesterol (mmol·L ⁻¹)												
Total	5.70	0.17	5.60	0.19	0.52	5.37	0.22	5.45	0.20	0.45	0.33	
HDL	1.25	0.05	1.26	0.06	0.68	1.33	0.05	1.37	0.06	0.10	0.40	
LDL	3.52	0.17	3.51	0.17	0.97	3.20	0.15	3.37	0.17	0.05	0.32	
Total chol./HDL chol. ratio	4.76	0.27	4.62	0.24	0.16	4.12	0.20	4.08	0.17	0.60	0.41	
TG (mmol·L ⁻¹)	2.03	0.24	1.82	0.21	0.06	1.73	0.26	1.56	0.18	0.07	0.99	
hsCRP (mg·L ⁻¹) [†]	3.6	0.7	3.0	0.6	0.13	5.4	2.9	3.0	0.6	0.69	0.53	
TNF-α (ng·L ⁻¹) [‡]	4.4	0.4	4.0	0.4	0.06	4.3	0.2	4.0	0.3	0.32	0.69	
IL-6 (ng·L ⁻¹) [‡]	4.9	0.4	4.8	0.6	0.99	5.6	1.0	4.9	0.8	0.24	0.23	
HMW adiponectin (μg·mL ⁻¹) [‡]	6.83	1.10	5.91	0.93	0.15	7.15	1.15	6.73	1.20	0.61	0.65	
PAI-1 x10 ³ (ng·L ⁻¹) [‡]	30.5	2.7	28.5	3.1	0.46	30.0	2.5	27.3	3.5	0.41	0.87	
RANTES (μg·L ⁻¹) [†]	3.21	0.39	3.15	0.44	0.86	3.06	0.40	2.77	0.37	0.53	0.71	
Oxidized-LDL (U·L ⁻¹) [†]	96.5	6.2	92.9	5.6	0.14	79.7	5.4	80.2	4.8	0.83	0.22	
FRAP (μM Fe ²⁺ ·L ⁻¹) [†]	1191	58	1237	65	0.37	1135	36	1189	41	0.07	0.70	

Chol., cholesterol; FRAP, ferric reducing antioxidant power; HMW, High molecular weight; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; IL-6, Interleukin-6; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; RANTES, Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted; SCP, strawberry and cranberry polyphenols.

^{*} *P*-value obtained from paired *t* test to compare changes from baseline (Post vs Pre) within the SCP (*P*₁) and Control (*P*₂) groups.

[§] *P*-value represents between-treatment comparison of changes from baseline (Post vs Pre), assessed by PROC MIXED ANOVA. Due to significant correlations between lipid and OGTT variables, a Bonferroni correction was applied for these variables, defining level of statistical significance at *P* < 0.004.

[†] *n* 38-39 (SCP *n* 18-20; Control *n* 18-21)

[‡] *n* 33 (SCP *n* 15; Control *n* 18)

Figure legends

Fig 4.1. Insulin sensitivity (M/I) before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of strawberry and cranberry polyphenols (SCP) or Control in insulin-resistant human subjects. Paired t test for comparisons from baseline (Post vs Pre) within each group showed a significant increase with SCP, † $P = 0.05$. NS, denotes no significant difference. PROC MIXED for ANCOVA with baseline insulin sensitivity as covariate indicated significant difference in changes from baseline (Post vs Pre) between the 2 groups, * $P = 0.03$. Values are means with their standard errors represented by vertical bars, $n = 39$.

Fig. 4.2. Responses of plasma C-peptide at -15, 0, 15, 30, 60 and 120 min during the OGTT before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of (a) strawberry and cranberry polyphenols (SCP) or (b) Control, in insulin-resistant human subjects. (c) Changes from baseline (Post vs Pre) in plasma C-peptide at -15, 0, 15, 30, 60 and 120 min during the OGTT before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of SCP or Control in insulin-resistant human subjects. Repeated measures ANOVA showed significant difference in the changes from baseline (Post vs Pre) between the 2 groups over time during the OGTT in insulin-resistant human subjects. A Bonferroni correction was applied defining level of statistical significance at $P < 0.004$. Values are means with their standard errors represented by vertical bars, $n = 41$.

---●---, SCP Pre values; —●—, SCP Post values; ---▲---, Control Pre values; —▲—, Control Post values; —○—, SCP (Post vs Pre values); —△—, Control (Post vs Pre values).

Fig. 4.3. Positive incremental area under the curve (IAUC) up to 120 minutes of the OGTT for C-peptide concentrations before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of strawberry and cranberry polyphenols (SCP) or Control in insulin-resistant human subjects. Paired t test showed no difference in changes from baseline (Post vs Pre) in the SCP and Control groups. PROC MIXED for a 2-way ANOVA showed no significant effect in the changes from baseline (Post vs Pre) between the 2 groups. Values are means with their standard errors represented by vertical bars, $n = 41$.

Fig. 4.4. Positive incremental area under the curve (IAUC) up to 30 minutes of the OGTT for C-peptide concentrations before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of strawberry and cranberry polyphenols (SCP) or Control in insulin-resistant human subjects. Paired t test for comparisons from baseline (Post vs Pre) within each group showed a significant increase with Control, † $P = 0.003$. NS, denotes no significant difference. PROC MIXED for a 2-way ANOVA showed a significant difference in the changes from baseline (Post vs Pre) between the 2 groups. Values are means with their standard errors represented by vertical bars, $n = 41$. * $P = 0.002$.

Fig. 4.5. Evolution of post-ingestion plasma concentrations of phenolic metabolites. (a) p -coumaric acid, (b) m -coumaric acid, (c) ferulic acid, (d) hydroxyhippuric acid. Welch's t -test (correcting for unequal variance) when data were assumed to be normally distributed and the non-parametric Mann-Whitney test otherwise, showed significantly higher concentrations of phenolic metabolites following the consumption of SCP relative to Control. A Bonferroni correction ($P < 0.0025$) was performed. Data are expressed as mean of replicates with their standard errors $n = 17$. $P < 0.0001$ for each phenolic metabolite.

—○—, SCP; —△—, Control.

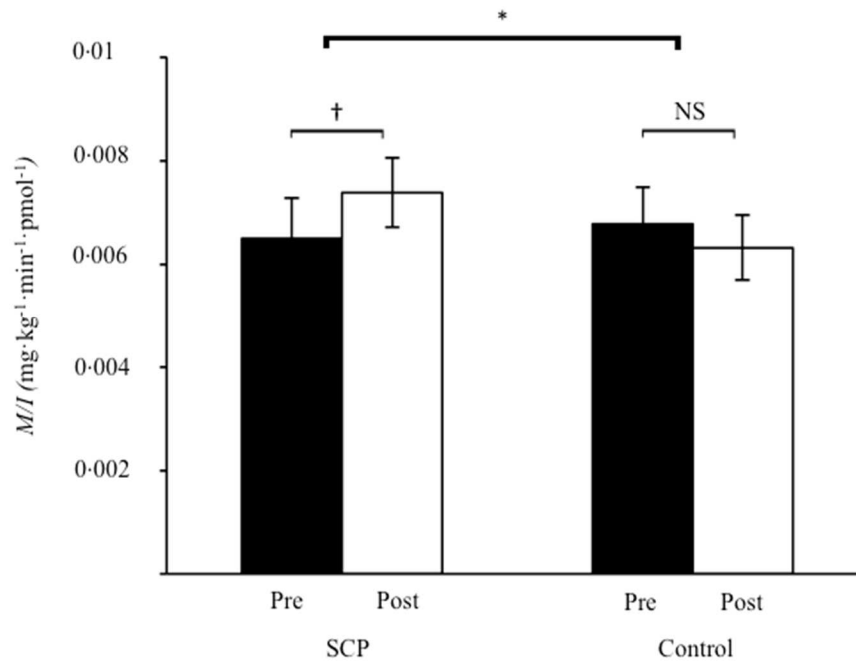


Fig 4. 1. Insulin sensitivity (M/I) before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of strawberry and cranberry polyphenols (SCP) or Control in insulin-resistant human subjects.

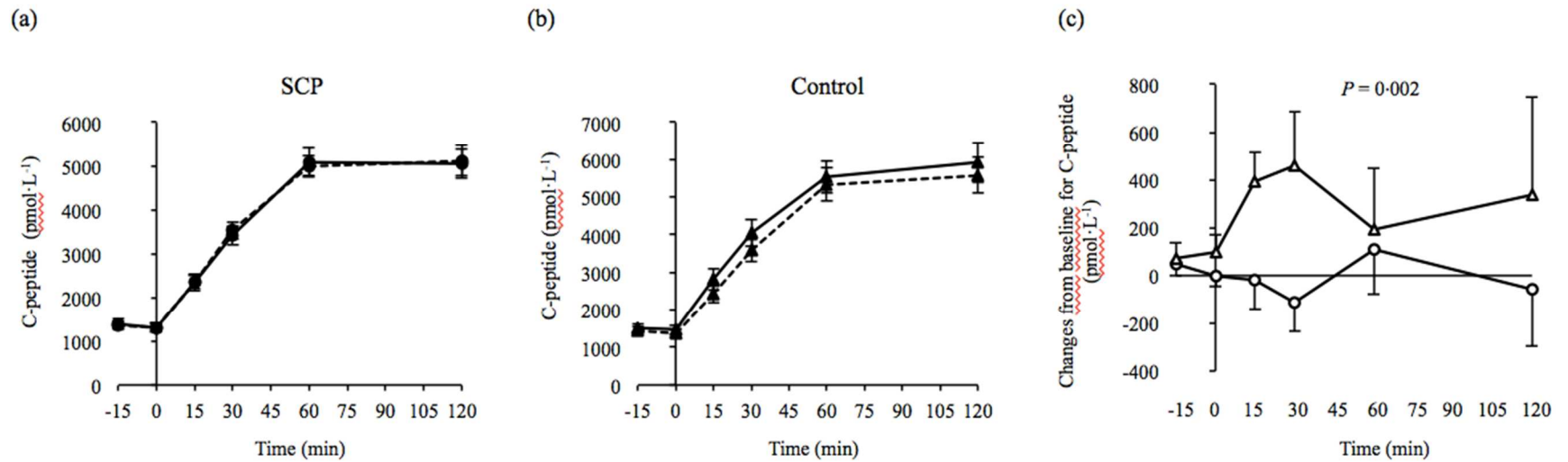


Fig 4. 2. Responses of plasma C-peptide at -15, 0, 15, 30, 60 and 120 min during the OGTT before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of (a) strawberry and cranberry polyphenols (SCP) or (b) Control, in insulin-resistant human subjects. (c) Changes from baseline (Post vs Pre) in plasma C-peptide at -15, 0, 15, 30, 60 and 120 min during the OGTT before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of SCP or Control in insulin-resistant human subjects.

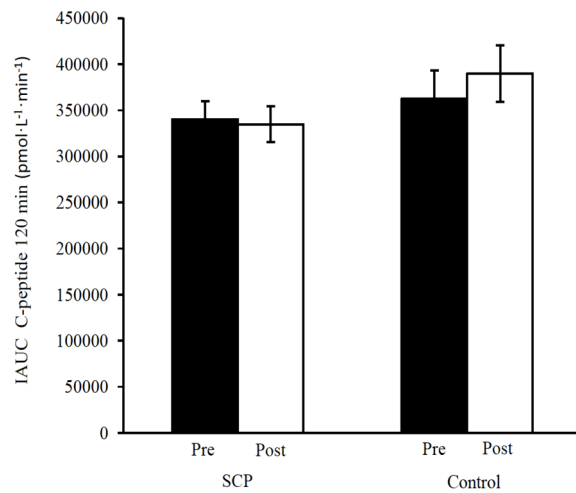


Fig 4. 3. Positive incremental area under the curve (IAUC) up to 120 minutes of the OGTT for C-peptide concentrations before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of strawberry and cranberry polyphenols (SCP) or Control in insulin-resistant human subjects.

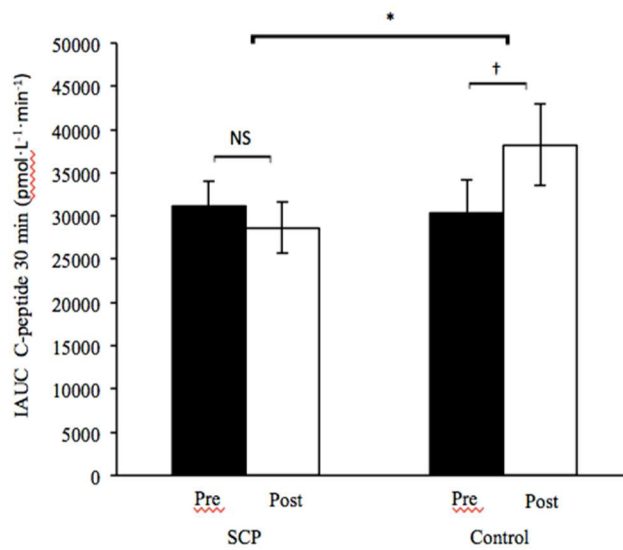


Fig 4. 4. Positive incremental area under the curve (IAUC) up to 30 minutes of the OGTT for C-peptide concentrations before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of strawberry and cranberry polyphenols (SCP) or Control in insulin-resistant human subjects.

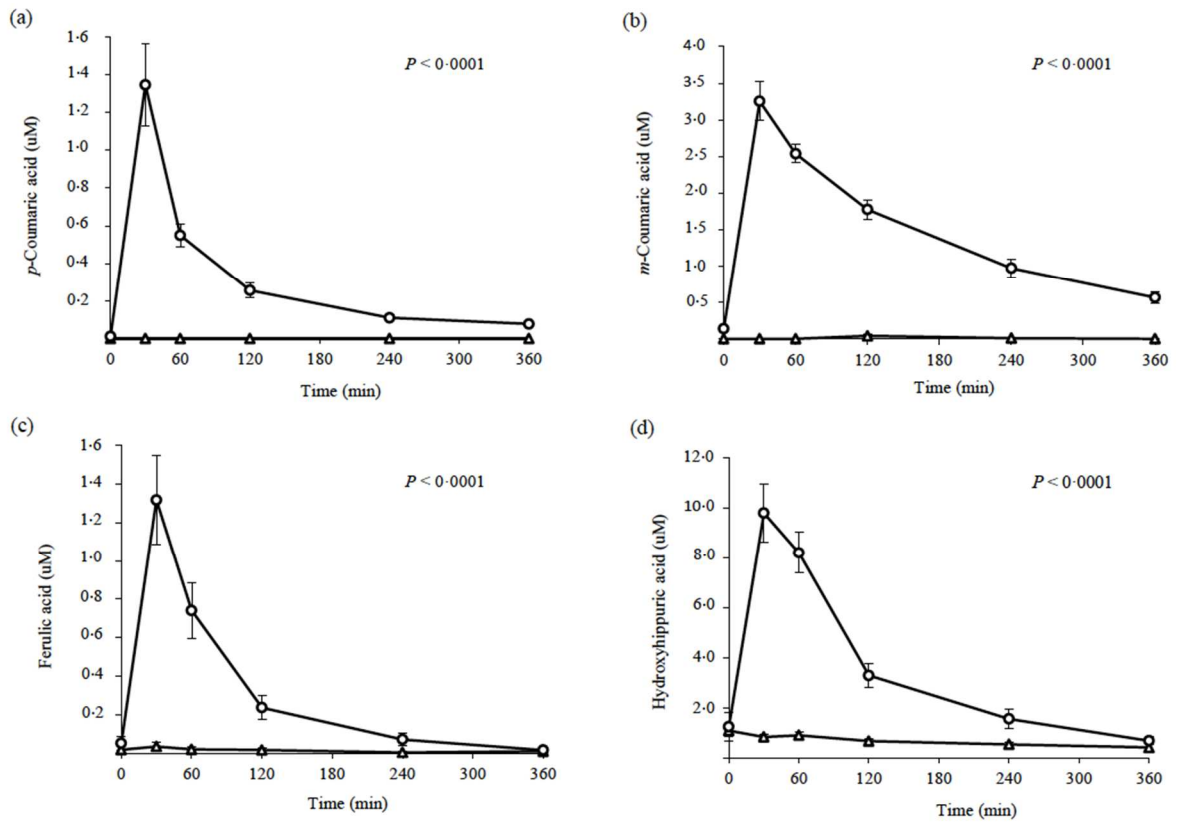


Fig 4. 5. Evolution of post-ingestion plasma concentrations of phenolic metabolites. (a) *p*-coumaric acid, (b) *m*-coumaric acid, (c) ferulic acid, (d) hydroxyhippuric acid.

Supplemental Table 4. 1. Dietary energy and macronutrient intake assessed by FFQ before and during 6-week consumption of SCP or Control in insulin-resistant human subjects*
(Mean values with their standard errors)

Variables	SCP (n 20)				Control (n 21)				P Value
	Pre		Post		Pre		Post		
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	
Energy (kcal)	2271	196	2284	179	2519	243	2206	174	0.27
Carbohydrate (g)	257	23	270	26	270	19	247	18	0.23
Protein (g)	96	9	98	7	118	16	101	10	0.12
Lipid (g)	96	8	95	7	107	14	93	8	0.32
Alcohol (g)	9	3	4	1	9	3	6	3	0.91
SFA (g)	30	3	30	3	37	5	32	4	0.27
MUFA (g)	39	3	38	3	43	6	37	3	0.35
PUFA (g)	19	2	19	2	19	2	17	1	0.43

SFA, saturated fatty acids; MUFA, Monounsaturated fatty acids; PUFA, Polyunsaturated fatty acids; SCP, strawberry and cranberry polyphenols.

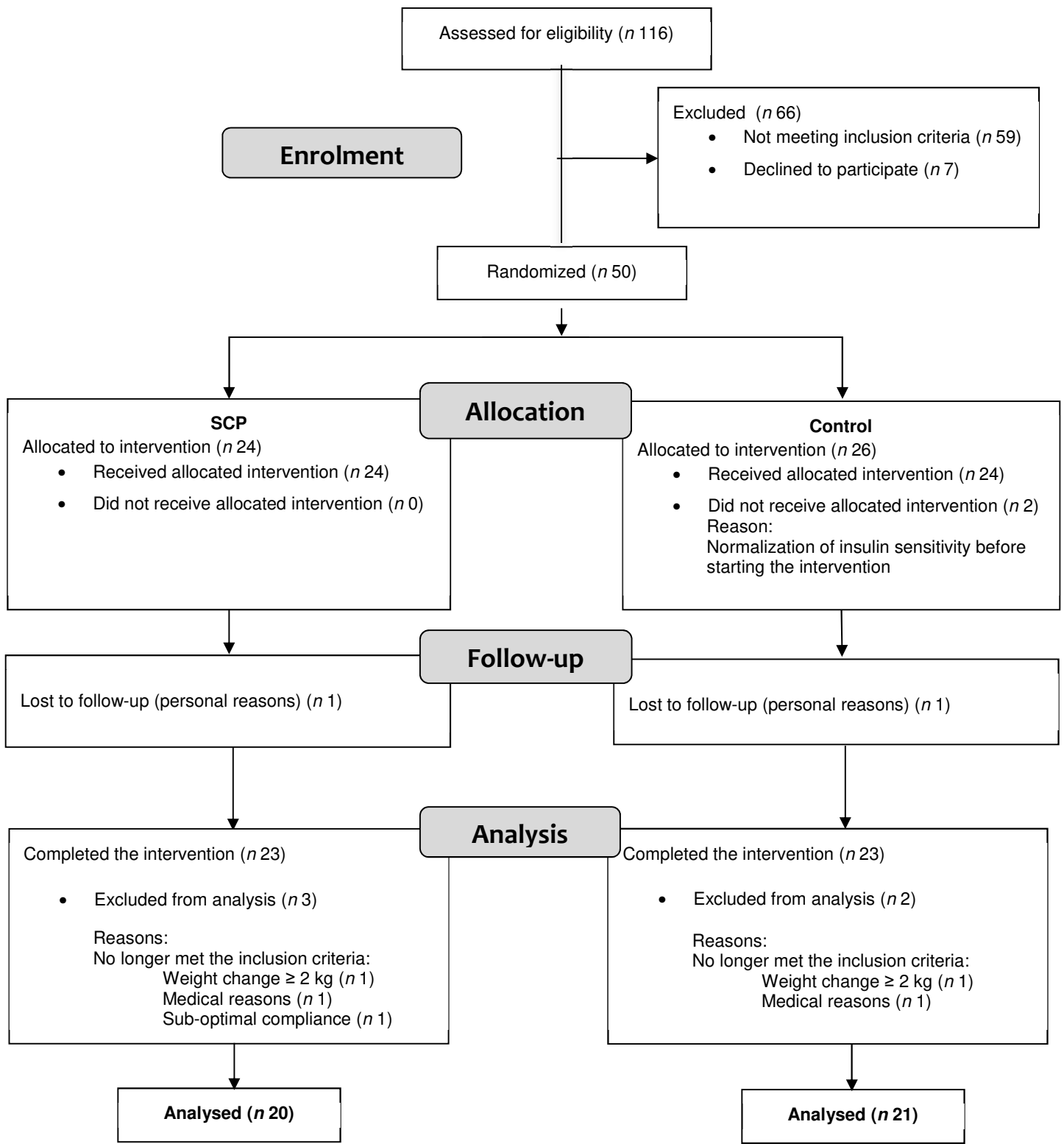
* PROC GLM ANOVA test showed no significant differences in the changes from baseline (Post vs Pre) between the 2 groups.

Supplemental Table 4. 2. Anthropometric measures and blood pressure before and after 6-week consumption of SCP or Control in insulin-resistant human subjects*
(Mean values with their standard error)

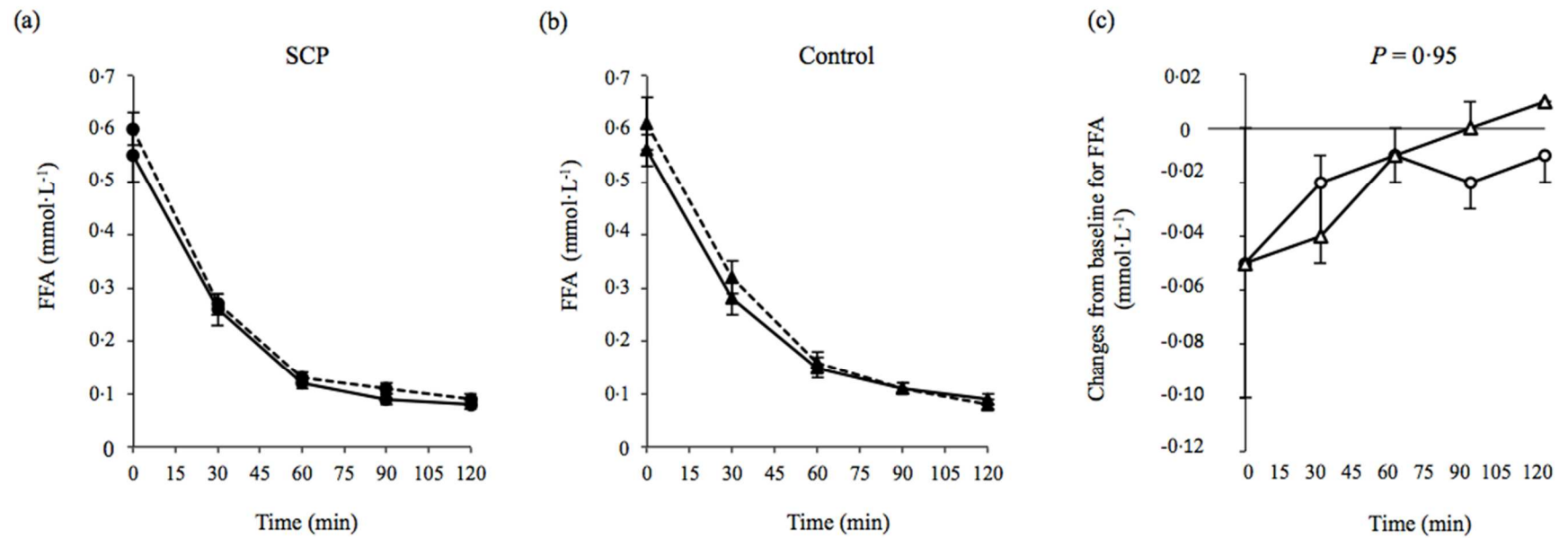
Variables	SCP (n 20)				Control (n 21)				P value
	Pre		Post		Pre		Post		
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	
Systolic blood pressure (mmHG)	117	3	116	3	123	3	120	3	0.72
Diastolic blood pressure (mmHG)	70	2	68	2	73	2	71	2	0.92
Weight (kg)	85	3	85	3	85	3	85	3	0.62
BMI (kg/m ²)	31	1	31	1	31	1	31	1	0.63
Waist circumference (cm)	104	3	103	3	104	2	103	2	0.77
Hip circumference (cm)	111	2	110	2	111	2	110	2	0.59
Waist to hip ratio	0.9	0.0	0.9	0.0	0.9	0.0	0.9	0.0	0.61

SCP, strawberry and cranberry polyphenols.

*PROC MIXED ANOVA test showed no significant differences in the changes from baseline (Post vs Pre) between the 2 groups.



Supplemental Fig. 4. 1. Participant Flow Diagram.
SCP, strawberry and cranberry polyphenols



Supplemental Fig. 4. 2. Responses of serum FFA at 0, 30, 60, 90 and 120 min during the hyperinsulinemic-euglycemic clamp before (Pre) and after (Post) 6-week consumption of (a) strawberry and cranberry polyphenols (SCP) or (b) Control, in insulin-resistant human subjects. (c) Changes from baseline (Post vs Pre) in serum FFA at 0, 30, 60, 90 and 120 min during the hyperinsulinemic-euglycemic clamp before (Pre) and after (Post) 6 week consumption of SCP or Control.

Chapitre 5 : Étude biodisponibilité - Matériel et méthodes

Le présent projet de maîtrise s'inscrit dans le cadre de l'étude Glucophérol qui vient d'être présentée au chapitre 4. La particularité de la présente étude de biodisponibilité est d'établir des corrélations entre les concentrations des métabolites de polyphénols (PP) et d'acide abscissique (ABA) avec les principaux paramètres du métabolisme du glucose mesurés lors de l'étude Glucophérol, notamment la sensibilité à l'insuline et les variables composantes de l'OGTT.

Il convient de préciser que l'étude de biodisponibilité est une étude ancillaire de l'étude Glucophérol, ainsi les prélèvements des échantillons ont été faits en parallèle. En fait, les sujets de l'étude de biodisponibilité des métabolites de PP et de l'ABA participaient en même temps à l'étude clinique Glucophérol. C'est pour cela que la méthodologie utilisée pour l'étude Glucophérol est la même que pour celle de biodisponibilité concernant le recrutement, les caractéristiques des sujets, les questionnaires utilisés, les mesures anthropométriques et les mesures de la sensibilité à l'insuline, des lipides et des marqueurs inflammatoires. Ces méthodes ont été décrites dans le Chapitre 4 aux sous-sections 4.3.2. «*Subjects*», 4.3.5. «*Anthropometric and Blood Pressure Measurements*», 4.3.6. «*Food Records and Questionnaires*», 4.3.7. «*Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamp*», 4.3.8. «*Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)* » et 4.3.9. «*Biochemical Analyses*» de la partie «*Methods*». La méthodologie utilisée pour la sélection des sujets, la description des breuvages de même que le dispositif expérimental et les méthodes de mesure des paramètres du métabolisme du glucose et de la biodisponibilité des métabolites de PP et de l'ABA sont décrits ci-dessous aux sous-sections 5.1 à 5.3.

5.1. Étude biodisponibilité - Sujets et breuvages

Des 41 sujets de l'étude Glucophérol, un sous-groupe de 17 sujets a participé à l'évaluation de la biodisponibilité. Chacun des sujets a conservé le même traitement qui lui avait été assigné dans la randomisation de l'étude Glucophérol. Ainsi, huit sujets ont consommé le breuvage expérimental et neuf sujets le breuvage contrôle. Pour être admissibles, les participants devaient répondre aux mêmes critères d'inclusion que ceux de l'étude Glucophérol (voir Chapitre 4 «*Methods*», sous-section 4.3.2. «*Subjects* »).

Le breuvage expérimental et le breuvage contrôle étaient isoénergétiques. L'apparence liquide et la saveur des deux breuvages étaient également similaires. Les deux breuvages ont été formulés par Atrium Innovations Inc. (Québec, Canada). Le breuvage expérimental riche en polyphénols de fraises et de canneberges (PFC) contenait 1,84 g d'un mélange d'extraits de fraises Authentiques d'Orléans (*Fragaria x ananassa* Duch.) et de canneberges (*Vaccinium macrocarpon* Aiton). Le mélange d'extraits de fraises et de canneberges a été fourni

par Nutra Canada (Québec, Canada). Le contenu en composés polyphénoliques des deux breuvages a été déterminé par une extraction qui a été faite en utilisant un standard interne, une solution de méthanol - acide acétique (99:1) et une autre d'eau-acide acétique (99:1). Les extraits ont été purifiés en utilisant des colonnes WATERS OASIS MCX et HLB. Pour l'élution, une solution d'acétonitrile-eau-acide acétique (30:69:1) a été utilisée. Finalement, la caractérisation des composés contenus dans l'extrait a été faite par chromatographie liquide d'ultra haute performance en phase inversée couplé avec spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS). En effet, différentes méthodes ont été utilisées selon les différentes molécules mesurées. Alors, la caractérisation des anthocyanes et des ellagitannines a été faite par HPLC en phase inverse, tandis que pour la caractérisation de procyanidines nous avons employé la méthode de HPLC en phase normale. Finalement, pour caractériser les acides phénoliques et les flavonoïdes, des méthodes d'HPLC-MS/MS en mode négatif ont été utilisées. Concernant la caractérisation d'ABA et ses métabolites, nous l'avons faite en reprenant la méthode d'Owen et Abrams (2009), avec quelques modifications, notamment l'utilisation d'UHPLC couplé à MS/MS.

5.2. Étude de biodisponibilité – Dispositif et mesures des paramètres glucidiques

L'étude de biodisponibilité des polyphénols et d'ABA a été effectuée en suivant le dispositif expérimental en bras parallèles avec le groupe contrôle et le groupe expérimental. Il faut préciser que la présente étude a été réalisée selon la méthode de l'essai randomisé en double insu au cours de l'étude Glucophénol et le déroulement de l'étude est illustré dans le schéma suivant (figure 5.1).

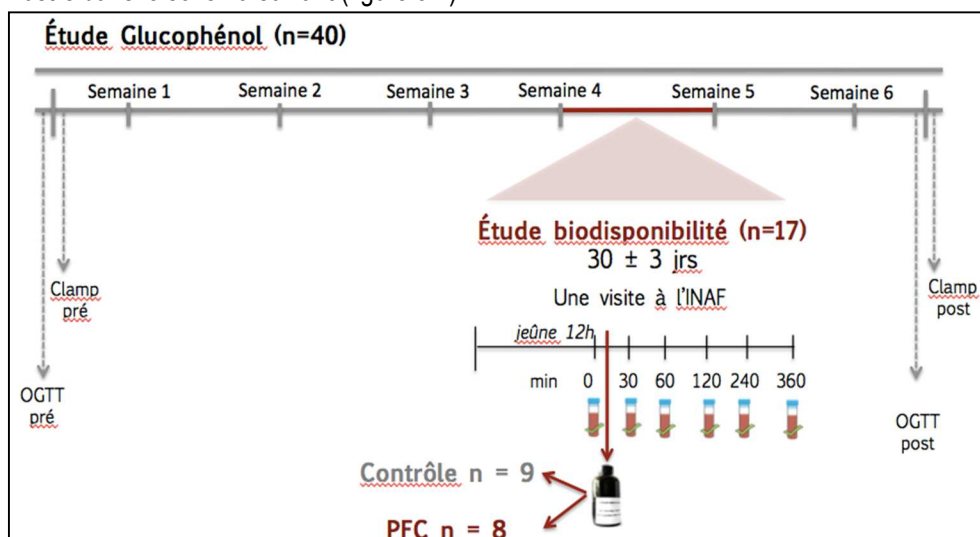


Figure 5. 1. Dispositif expérimental de l'étude de biodisponibilité

L'étude de biodisponibilité a été réalisée au jour 30 ± 3 au cours de la période 1 de l'étude Glucophénol. L'étude de biodisponibilité comprenait des prélèvements sanguins à différents temps ainsi que des procédés d'extraction

et la mesure des teneurs plasmatiques en métabolites de PP et d'ABA, ceci dans le but de déterminer les cinétiques d'absorption des polyphénols et de l'ABA.

Le protocole comprenait six prélèvements sanguins, qui ont eu lieu au cours d'une seule visite à l'Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels (INAF) à Québec. Il débutait après un jeûne de 12 heures et un premier prélèvement sanguin au temps zéro. Aussitôt après la prise de sang effectuée, les sujets ont consommé dans un intervalle d'une minute le même breuvage qui leur avait été attribué après randomisation au début de l'étude Glucophérol. Ensuite, cinq prélèvements sanguins ont été effectués à 30, 60, 120, 240, 360 minutes après la consommation du breuvage.

En ce qui concerne le protocole d'extraction et de mesure des teneurs sanguines en métabolites de PP et d'ABA, des procédés de chromatographie liquide à haute performance ont été utilisés et couplés à spectrométrie de masse (UHPLC-MS/MS). Ces procédés seront décrits plus en détail dans les sous-sections suivantes (5.3.1 et 5.4). L'étude de biodisponibilité se distingue de l'étude Glucophérol, car les concentrations en métabolites de PP et d'ABA mesurées dans le plasma de participants après la consommation des breuvages sont considérées les variables indépendantes ayant un effet sur les variables métaboliques dépendantes décrites ci-dessous.

Quant aux variables dépendantes à l'étude, ce sont des données sur le métabolisme du glucose recueillies lors de l'étude Glucophérol, notamment, les résultats obtenus au cours du test oral de tolérance au glucose (OGTT), du test de sensibilité à l'insuline (*M/I*), sur les lipides (triglycérides et cholestérol) et les marqueurs inflammatoires (IL-6 et TNF- α). Chacun des tests a été réalisé avant et après l'intervention de l'étude Glucophérol. L'OGTT a duré deux heures avec prélèvements sanguins à -15, 0, 15, 30, 60, 120 min. Il débutait après un jeûne de 12 heures. Après le prélèvement au temps zéro, les sujets ont pris une solution orale contenant 75 g de glucose. Les mesures effectuées à partir de ces échantillons sanguins correspondent aux valeurs des concentrations sanguines de glucose, d'insuline et de C-peptide. Les calculs effectués avec ces données correspondent aux aires sous la courbe incrémentale (IAUC) de glycémie, d'insulinémie et du C-peptide. L'AUC correspond à l'aire sous la courbe totale à partir de la valeur 0 de l'axe des « y », alors que l'IAUC correspond à l'aire sous la courbe à partir de la valeur de la glycémie basale (à -15 minutes) (Le Floch et al, 1990). Le pourcentage de changement de l'IAUC ($[(\text{IAUC valeur post} - \text{IAUC valeur pré}) \times 100 / \text{IAUC valeur pré}]$) a été ainsi calculé. Les concentrations de biomarqueurs lipidiques et inflammatoires ont été mesurées à partir d'échantillons sanguins prélevés à jeun (avant le clamp ou au temps -15 min au début de l'OGTT).

Le clamp hyperinsulinémique-euglycémique est considéré comme la méthode la plus précise en matière de mesure de sensibilité à l'insuline. Ce test a débuté après un jeûne de 12 heures. Il consiste à infuser du glucose (débit variable selon la glycémie) et de l'insuline exogène (débit constant selon la surface corporelle) pendant deux heures. L'utilisation de ce test a permis d'obtenir des données sur la sensibilité à l'insuline (*M/I*).

5.3. Étude de biodisponibilité - Méthodes d'extraction et de mesure des métabolites des polyphénols et de l'ABA plasmatiques

Les procédés d'extraction et de mesure des teneurs sanguines en métabolites de PP ont été adaptés à partir de la méthode de Marti et al. (2010) tandis que les procédés employés pour extraire et mesurer l'ABA se sont basés plutôt sur la méthode d'Owen & Abrams (2009), qui avaient mesuré des hormones végétales par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

La méthode d'Owen & Abrams (2009) a été utilisée pour analyser les échantillons de plasma et du breuvage de fraises et canneberges. Quelques modifications ont été appliquées selon la matrice à analyser. Du côté des échantillons de matrice végétale du breuvage, une extraction liquide-liquide a été faite en utilisant un standard interne, une solution de méthanol-acide acétique (99:1) et une autre d'eau-acide acétique (99:1). Le standard interne était une solution d'acétonitrile-eau-acide acétique (ACN:H₂O:AcOH) (49,5:50:0,5) combiné avec plusieurs analogues de deutérium (un pour chaque composé mesuré). Les extraits ont été purifiés en phase solide (SPE) en utilisant des colonnes WATERS OASIS MCX et HLB. Pour l'élution, une solution d'acétonitrile-eau-acide acétique (30:69:1) a été utilisée. Finalement, la caractérisation des composés a été faite par chromatographie liquide d'ultra haute performance en phase inversée couplé avec spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS). Du côté des analyses des échantillons du plasma, la méthode décrite ci-dessus a été suivie, sans l'utilisation de la colonne MCX (Dudonné et al., 2015).

5.3.1. Méthodes d'extraction et de mesure des métabolites des polyphénols plasmatiques

L'extraction de métabolites des PP plasmatiques a été effectuée par la méthode décrite par Marti et al. (2010), notamment l'extraction d'anthocyanes et de procyanidines. Quelques modifications ont été appliquées à cette méthode pour permettre la détection d'acides phénoliques et de flavonols.

Il est à mentionner que cette méthode se distingue pour la petite quantité d'échantillon nécessaire pour la mise en œuvre de l'extraction et pour l'absence d'une phase d'évaporation avant de démarrer l'analyse chromatographique (figure 5.2). En effet, le processus d'extraction a été fait dans une microplaque OASIS HLB (Waters, Milford, MA, USA) en utilisant 350 µL du plasma et 350 mL d'un aliquot d'acide phosphorique à 4%. Ensuite, la solution éluée a été injectée à l'UHPLC-MS/MS. L'identification des métabolites a été faite en comparant les temps de rétention avec ceux des standards disponibles. Les métabolites détectés ont été

quantifiés en utilisant des standards, le cas échéant, une détermination relative eu lieu en utilisant la courbe de calibration de son aglycone ou la structure la plus similaire possible.

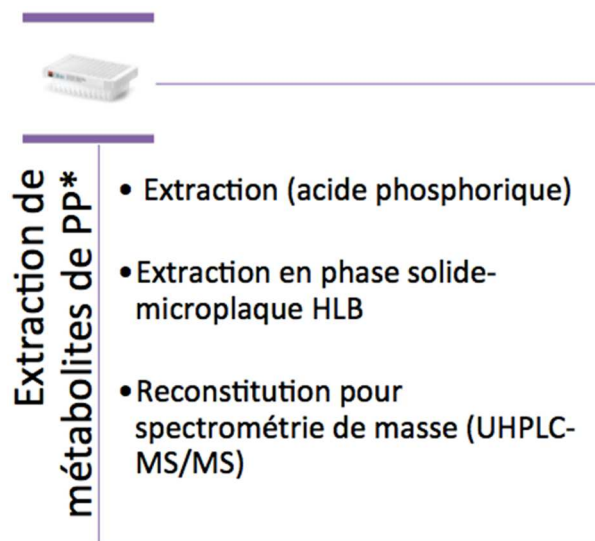


Figure 5. 2. Méthode d'extraction en plaque des métabolites des polyphénols plasmatiques

*Méthode adaptée de Martí et al., 2010.

HLB, méthodologie avec polymère mouillable fortement hydrophilique tout usage; UHPLC-MS/MS, chromatographie en phase liquide à haute performance avec spectrométrie de masse en tandem; MeOH, méthanol; AcOH, acide acétique; ACN, acétonitrile.

Pour chaque participant à l'étude, l'extraction et la quantification ont été réalisées à partir d'échantillons plasmatiques prélevés à six temps différents, c'est-à-dire 0, 30, 60, 120, 240 et 360 minutes après la prise orale du breuvage d'extraits de fraises et de canneberges, dans le but de calculer l'évolution de la concentration des métabolites des PP et de l'ABA.

5.4. Étude de biodisponibilité - Validation du procédé d'extraction d'ABA plasmatique

Afin de sélectionner le meilleur protocole pour extraire l'ABA plasmatique, trois différentes méthodes ont été testées. Deux méthodes, l'une totale et l'autre partielle, étaient habituellement utilisées pour extraire l'ABA de matrices autres que le plasma, notamment du sirop d'érable (extraction partielle) ou du jus de fruits (extraction totale). La troisième méthode était celle utilisée pour extraire les métabolites plasmatiques des polyphénols (voir sous-section 5.3.1). Les trois méthodes incluaient des procédés de chromatographie en phase solide. Cependant, chaque méthode présente des caractéristiques individuelles particulières par rapport aux autres. Les caractéristiques spécifiques pour les méthodes de l'extraction partielle et totale sont décrites dans la figure 5.3.

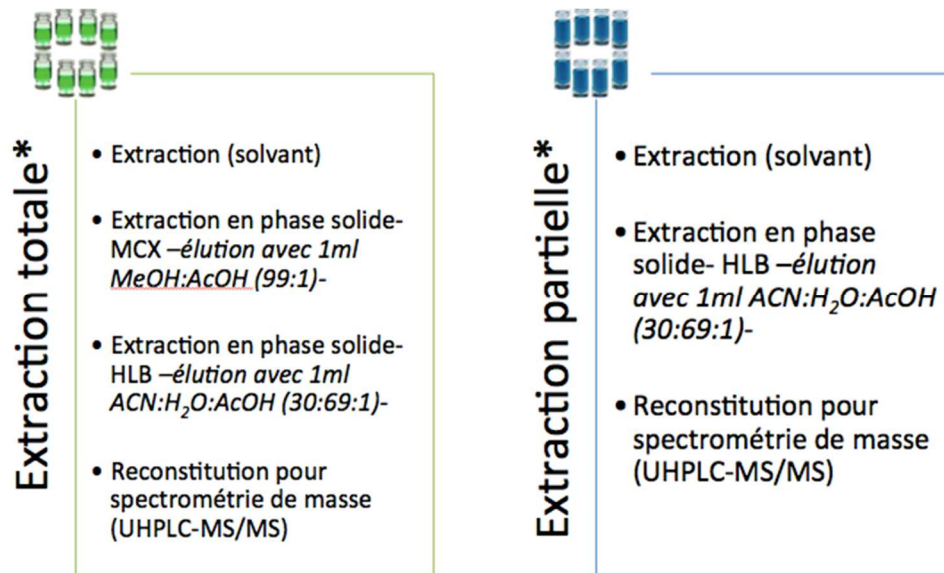


Figure 5. 3. Méthodes testées pour faire l'extraction de l'ABA

*Méthode adaptée d'Owen et Abrams, 2009.

MCX, méthodologie avec polymère mouillable pour échange intense de cations (polymère de type mixte en phase inverse); HLB, méthodologie avec polymère mouillable fortement hydrophilique tout usage; UHPLC-MS/MS, chromatographie en phase liquide à haute performance avec spectrométrie de masse en tandem; MeOH, méthanol; AcOH, acide acétique; ACN, acétonitrile.

La mise au point a permis de déterminer que la méthode d'extraction d'ABA partielle permettait d'extraire l'ABA plasmatique plus rapidement et avec des procédés moins coûteux que les deux autres. C'est pourquoi cette méthode a été sélectionnée pour faire les extractions d'ABA plasmatique.

La méthode d'extraction d'acide abscissique choisie a été validée en deux étapes: 1) par une analyse d'échantillons sanguins de plasma chez l'humain. Les échantillons utilisés pour l'optimisation de la méthode d'extraction comprenaient des échantillons de plasma sanguin de deux sujets humains différents avec deux quantités différentes d'ABA: 10 µM et 1000 µM; et 2) par une analyse d'échantillons de plasma de rats dans le but de vérifier la faisabilité du protocole en conditions «réelles». Pour ce faire, trois rats gavés à l'ABA (10 mg/kg) et trois rats témoins (0 mg/kg) ont été utilisés. Pour chacun des rats, trois prélèvements sanguins ont été effectués à 0 (à jeun), 30 et 180 minutes après le gavage de chaque rat, et sept métabolites d'ABA ont été mesurés : l'acide dihydroxyphaséique (DPA), l'acide phaséique (PA), le 7-hydroxy acide abscissique (7-OH-ABA), l'acide abscissique glucose ester (ABA-GE), le *trans*-acide abscissique (*trans*-ABA), le *neo*- acide abscissique (*neo*-ABA) et l'acide abscissique glucuronide (ABA Gluc).

5.5. Étude de biodisponibilité - Aires sous la courbe (AUC) et Statistiques

Les aires sous la courbe (AUC) de même que les aires incrémentales sous la courbe (IAUC) ont été calculées en Excel version 14.6.6 selon la méthode trapézoïdale. La méthode consistait à faire la somme de la concentration obtenue à un moment donné plus la concentration obtenue au moment suivant, divisé par deux, fois le numéro de minutes compris dans l'intervalle de temps des deux moments utilisés pour la première somme. Il faut faire la même équation pour chaque intervalle de temps compris dans l'AUC à calculer. Finalement, les résultats de ces équations doivent être additionnés pour obtenir l'aire sous la courbe. D'autre part, pour calculer les aires incrémentales sous la courbe (IAUC) il est suffisant de prendre la valeur obtenue d'AUC pour lui faire soustraire le résultat de la multiplication de la valeur de la concentration atteinte à -15 minutes par le numéro de minutes compris dans l'aire à calculer.

Les logiciels SAS version 9.3 et Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA) ont été utilisés pour faire les analyses statistiques et les graphiques. Les coefficients de corrélation ont été calculés par la méthode de Pearson pour détecter les associations entre les variables. Des corrélations significatives ont été retrouvées entre les variables de lipides sanguins et les variables de l'OGTT. Pour se protéger des erreurs α dues à ces associations, des corrections de Bonferroni ont été appliquées. Le niveau de signification statistique résultant correspond à $p < 0,004$ pour les variables lipidiques et pour les variables de l'OGTT utilisés dans les calculs des coefficients de corrélation (IAUC de la glycémie, l'insulinémie et du C-peptide). La méthode de Pearson n'a pas montré d'associations entre les paramètres inflammatoires ou entre les valeurs de *M/I* et les autres variables; ainsi aucune autre correction de Bonferroni n'a été utilisée pour ces paramètres.

Les analyses des variations des paramètres du métabolisme du glucose (*M/I*, IAUC de la glycémie, de l'insulinémie et du C-peptide, de lipides et de marqueurs inflammatoires) à l'intérieur des groupes ont été effectuées par test unilatéral (one-tailed) de Wilcoxon pour données paires. D'un autre côté, les analyses des changements entre les deux groupes ont été réalisées à l'aide de différents tests, selon les critères de normalité atteints. Avec des données normales, des tests de Welch ont été effectués avec corrections pour des variances inégales. Des transformations logarithmiques ont été également appliquées sur les données brutes des variables non-normales pour atteindre le critère de normalité (IAUC glycémie à 30 minutes en préintervention, IL-6 post, TFN- α post, triglycérides pre et post, CHOL-LDL pré et post). Lorsque les données n'atteignaient pas le critère de normalité, des tests non paramétriques de Mann-Whitney ont été réalisés. Du côté des analyses effectués à l'intérieur des groupes, ils ont été effectués par test de Wilcoxon pour données paires.

Des analyses d'ANOVA à mesures répétées ont été réalisées pour vérifier les effets traitement, temps et les interactions traitement x temps pendant les cinétiques (0 à 360 minutes) des sept molécules étudiées, l'acide *p*-

coumarique, l'acide *m*-coumarique, l'acide férulique, l'acide hydroxyhippurique, le *cis*-ABA, l'acide dihydroxyphaséique et l'ABA glucuronide.

Une régression linéaire multiple robuste avec M estimations a été calculée en utilisant une procédure *ROBUSTREG* de SAS 9.4 (*SAS Institute, Cary NC*). Pour éviter le surajustement et faire la sélection idéale du modèle, la valeur la plus petite de AICR a été jugée le meilleur modèle (*Akaike criterion*). Prenant en compte la petite taille de l'échantillon (17 sujets) et la multiplicité des analyses, des corrections de Bonferroni ont été appliquées. Ainsi, le seuil de p a été considéré comme étant significatif à $p < 0,0017$ pour les résultats de la régression entre les teneurs de métabolites de PP et d'ABA avec les paramètres de métabolisme du glucose. En matière d'analyse de la concentration des métabolites de PP et d'ABA après consommation du breuvage, le seuil de p a été considéré comme étant significatif à $p < 0,0025$, car il tient compte du nombre de métabolites des PP et de l'ABA qui sont reliés entre eux.

5.5.1. Corrélations de teneurs plasmatiques en métabolites des PP et d'ABA avec différents paramètres du métabolisme du glucose

Une régression linéaire multiple robuste a été calculée pour détecter les possibles corrélations entre la concentration des métabolites de PP et d'ABA et les changements observés dans le métabolisme du glucose. Lesdites concentrations des métabolites ont été exprimées en aire de concentration (nM x minutes) sous la courbe entre 0 et 30 minutes après la consommation des breuvages (AUC 0-30) tandis que les variables dépendantes reliées au glucose ont été exprimées en pourcentage de changement de l'aire incrémentale sous la courbe de concentration plasmatique du glucose, d'insuline et du C-peptide pendant les 30 premières minutes de l'OGTT (IAUC 0-30) et pendant l'OGTT au complet (IAUC 0-120).

La régression linéaire multiple robuste a aussi été calculée pour détecter des possibles corrélations entre les métabolites des PP et de l'ABA avec les changements observés de la sensibilité à l'insuline, des lipides plasmatiques et des marqueurs inflammatoires.

Chapitre 6 : Résultats

6.1. Mise au point du procédé d'extraction d'ABA

Les résultats de la mise au point du procédé d'extraction ont montré que la méthode d'extraction partielle représente la meilleure méthode pour extraire et quantifier les molécules d'ABA. La sélection de la méthode est basée sur les meilleurs pourcentages de récupération d'ABA ainsi que sur les pourcentages de suppression des standards internes atteints par chacune des méthodes. Du côté de la récupération d'ABA, les pourcentages obtenus ont montré que la méthode d'extraction totale permet un bon pourcentage de récupération pour les quantités élevées d'ABA, mais non pas pour les quantités faibles de l'ordre de 10 pg/μL. Concernant les résultats de la méthode d'extraction de métabolites de PP, elle n'a pas fonctionné pour la récupération de l'ABA. En effet, autant les quantités importantes que les plus faibles ne sont pas récupérables par cette méthode (0% de récupération). D'autre part, la méthode d'extraction partielle a montré les meilleurs pourcentages de récupération pour les deux différentes quantités d'ABA, avec des pourcentages au-dessus de 80% (tableau 6.1).

Tableau 6. 1. Comparaison des pourcentages de récupération de deux différentes doses d'ABA à partir de trois méthodes d'extraction différentes

Sujet	ABA consommé (pg/μL)	Méthode	ABA détecté (pg/μL)	Récupération %
SD	10	Extraction totale	6,3	63
PD	10	Extraction totale	7,8	78
SD	1000	Extraction totale	967,5	97
PD	1000	Extraction totale	848,0	85
SD	10	Extraction partielle	8,4	84
PD	10	Extraction partielle	9,3	93
SD	1000	Extraction partielle	810,7	81
PD	1000	Extraction partielle	869,7	87
SD	10	Extraction de métabolites de PP	5449,4	54494
PD	10	Extraction de métabolites de PP	0	0
SD	1000	Extraction de métabolites de PP	0	0
PD	1000	Extraction de métabolites de PP	0	0

ABA, acide abscissique; PP, polyphénols

Concernant les pourcentages de suppression observés lors des résultats des analyses des standards internes, la méthode partielle montre les pourcentages les plus bas par rapport aux autres méthodes, ce qui appuie à nouveau l'utilisation de cette méthode pour extraire l'ABA (tableau 6.2).

Tableau 6. 2. Comparaison des pourcentages de suppression des standards d'ABA à partir de trois méthodes d'extraction différentes

Sujet	ABA consommé (pg/μL)	Méthode	% de suppression							
			d4-ABA	d6-ABA	d3-DPA	d3-PA	d4-7-OH-ABA	d5-ABA-GE	d4-trans-ABA	d3-Neo-PA
SD	10	Extraction totale	49	-4	55	61	44	47	47	48
PD	10	Extraction totale	44	4	46	63	35	39	39	43
SD	1000	Extraction totale	27	-2	44	55	18	48	42	44
PD	1000	Extraction totale	30	0	47	63	25	47	36	44
SD	10	Extraction partielle	7	-4	0	7	-31	8	9	8
PD	10	Extraction partielle	9	3	6	8	-9	27	17	12
SD	1000	Extraction partielle	4	1	22	21	-9	34	22	22
PD	1000	Extraction partielle	8	-4	20	17	-41	34	9	21
SD	10	Extraction métabolites de PP	100	-1	100	100	100	100	100	100
PD	10	Extraction métabolites de PP	100	-2	100	100	100	100	100	100
SD	1000	Extraction métabolites de PP	100	-8	100	100	100	100	100	100
PD	1000	Extraction métabolites de PP	100	-5	100	100	100	100	100	100

ABA, acide abscissique; DPA, acide dihydroxyphaséique; PA, acide phaséique; OH-ABA hydroxy acide abscissique; ABA-GE, acide abscissique glucose ester.

Les résultats de la deuxième étape de validation de la méthode d'extraction sont en accord avec ceux obtenus lors de la première étape. En effet, les analyses faites avec le plasma de rats ont confirmé que la méthode d'extraction partielle permet d'extraire correctement l'ABA et ses métabolites. Les extractions faites chez les rats ont montré des différences claires entre les déterminations plasmatiques d'ABA et ses composés chez les rats gavés et non gavés. Au tableau 6.3, nous pouvons voir un exemple des différences de concentrations trouvées chez les rats.

Tableau 6.3. Comparaison des concentrations d'ABA et ses composés¹ chez un rat gavé et un rat non-gavé à l'ABA

	<i>cis</i> -ABA ¹	DPA ¹	PA ¹	7-OH-ABA ¹	ABA-GE ¹	trans-ABA ¹	Neo-PA ¹	ABA-Glucu ¹
Rat non gavé à l'ABA	1,5	ND	6,1	ND	ND	ND	ND	ND
Rat gavé à l'ABA	4510,6	ND	23,1	128,8	ND	4003,9	30,7	148,7

¹ Concentrations atteintes après 30 minutes du gavage (pg/μL).

ABA, acide abscissique; DPA, acide dihydroxyphaséique; PA, acide phaséique; OH-ABA, hydroxy acide abscissique; ABA-GE, acide abscissique glucose ester; ABA-Glucu, acide abscissique glucuronide.

6.2. Composition phénolique des breuvages

Selon l'appartenance au groupe «expérimental» ou au groupe «contrôle», les sujets participant à l'étude ont consommé des breuvages qui contenaient différentes quantités de chacun des composés phénoliques. En effet, les analyses des breuvages expérimental (PFC) et contrôle ont permis de confirmer que la quantité des composés phénoliques était significativement différente entre les breuvages (Chapitre 4, tableau 4.1).

La caractérisation des breuvages a démontré que le breuvage contenait des proanthocyanidines (PACs) de différentes tailles notamment des monomères, dimères et polymères. Parmi ces trois tailles de molécules, les plus répandues dans les deux breuvages sont les polymères, suivis par les monomères et les dimères. Concernant le contenu total des PACs, il est environ quatre fois plus élevé dans le breuvage expérimental (PFC) par rapport au breuvage contrôle.

D'un autre côté, une dizaine d'acides phénoliques ont été également retrouvés dans les breuvages. Parmi ces dix acides, ceux retrouvés en plus grande quantité dans le breuvage expérimental sont les acides coumariques, plus spécifiquement l'acide *p*-coumarique (9095 µg/120 ml), l'acide *m*-coumarique (2051 µg/120 ml) et l'acide coumaroyl glucoside (5508 µg/120 ml). La concentration totale en acides phénoliques est environ cinq à six fois plus importante dans le breuvage expérimental par rapport au breuvage contrôle.

6.3. Composition en ABA des breuvages

Concernant la différence de la composition d'ABA de deux breuvages, les résultats de la caractérisation ont démontré que les valeurs de *p* calculées étaient toujours significatives. En effet, une différence significative a été vérifiée pour les sept composés retrouvés dans les deux breuvages (voir tableau 6.4). Ce qui permet de constater la validité de l'utilisation de ces breuvages.

Tableau 6. 4. Composition d'ABA des breuvages expérimentaux

Composition ABA ($\mu\text{g}/120\text{ml}$)	Contrôle ¹	PFC ¹
<i>cis</i> -ABA	ND	79,0 \pm 4,6*
PA	ND	14,7 \pm 1,3*
DPA	2,4 \pm 0,2	53,3 \pm 7,4*
7'-OH-ABA	ND	0,72 \pm 0,10*
ABA-GE	0,04 \pm 0,01	47,1 \pm 7,7*
<i>trans</i> -ABA	ND	6,6 \pm 0,4*
<i>neo</i> -PA	ND	0,09 \pm 0,08*
Total	2,4\pm0,2	201,6\pm10,8*

¹ Moyenne \pm écart type

ND, non-déecté/en-dessous du limit de détection; PFC, polyphénols de fraises et canneberges. * ($p < 0,05$)

ABA, acide abscissique; DPA, acide dihydroxyphaséique; PA, acide phaséique; OH-ABA, hydroxy acide abscissique; ABA-GE, acide abscissique glucose ester.

La quantité d'ABA totale retrouvée dans le breuvage expérimental (PFC) est très supérieure à celle contenue dans le breuvage contrôle. En fait, les molécules retrouvées dans le breuvage expérimental n'ont pas toujours été détectées dans le breuvage contrôle. Seulement l'acide dihydroxyphaséique (DPA) et l'ester de glucose de l'acide abscissique (ABA-GE) se trouvent dans les deux breuvages.

Du côté du breuvage expérimental, la molécule qui se trouve en plus grande quantité est l'acide abscissique sous la forme *cis*, suivie de l'acide dihydroxyphaséique et de l'ester de glucose de l'acide abscissique. La somme de la concentration de ces trois molécules constitue 89% du total des molécules retrouvées dans le breuvage expérimental.

6.4. Caractéristiques de base des participants

Les caractéristiques de base des participants à l'étude correspondent à ceux de l'étude Glucophérol (Chapitre 4. Sous-section 4.3.2. Subjects). En effet, le sous-groupe de 17 participants provenant de l'étude Glucophérol (8 femmes, 9 hommes) recrutés dans la ville de Québec présentait des caractéristiques homogènes. Le tableau 6.5 montre que l'âge ainsi que les mesures anthropométriques, telles que le poids corporel, l'IMC, le tour de taille et le tour de hanches ne présentent pas des différences intergroupes. Tous les sujets montraient une adiposité abdominale accrue avec un tour de taille de plus de 94 cm dans le cas des hommes et de plus de 80 cm pour les femmes. De même, les résultats pour le profil lipidique dans les deux groupes à l'étude sont semblables. La glycémie à jeun ainsi qu'à deux heures et l'insulinémie à jeun sont des variables qui ne montrent pas des variations intergroupes significatives (tableau 6.5). Il est à noter qu'au début de l'étude, tous les participants montraient un niveau d'insuline à jeun très élevé (>60 pmol/L) indiquant une résistance à l'insuline. En fait, la plupart des participants (14/17) ont présenté un niveau d'insuline à jeun ≥ 105 pmol/L.

Les résultats glycémiques (à jeun et à 2-heures) permettent de classer les participants selon leur tolérance ou intolérance au glucose. L'état d'anomalie de la glycémie à jeun (impaired fasting glucose – IFG) est définie par un niveau de 5,6 à 6,9 mmol/L de glucose à jeun, tandis que l'état d'intolérance au glucose (IGT) est défini par un niveau de 7,8 à 11,0 mmol/L du glucose plasmatique à 2-heures lors d'un test oral de tolérance au glucose (OGTT) (American Diabetes Association, 2014). Ainsi, du total des participants de l'étude de biodisponibilité, la plupart présentait une altération de la tolérance au glucose. En effet, neuf sujets montraient une anomalie de la glycémie à jeun (IFG), cinq sujets présentaient une intolérance au glucose (IGT) et trois sujets étaient atteints par les deux altérations (IFG et IGT). Seulement cinq sujets ont montré une tolérance normale au glucose (NGT).

Tableau 6.5. Caractéristiques de base des participants

Variables	Contrôle ¹ (n = 9)	PFC ¹ (n = 8)	valeur p
Âge (années)	58±2	55±2	0,14
Poids corporel (kg)	92,4±5,9	79,7±3,4	0,11
IMC (kg·m ⁻²)	32,7±1,5	29,7±1,3	0,24
Tour de taille (cm)	108,2±3,8	102,2±3,5	0,42
Tour de hanches (cm)	112,2±2,3	108,2±3,6	0,21
Cholestérol (mmol·L ⁻¹)			
Total	4,9±0,2	5,4±0,3	0,17
HDL	1,3±0,1	1,3±0,1	0,96
LDL	3,0±0,2	3,2±0,3	0,61
Total TG (mmol·L ⁻¹)	1,6±0,2	2,0±0,4	0,38
Total chol./HDL chol. ratio	4,1±0,3	4,5±5	0,56
Glycémie plasmatique à jeun (mmol·L ⁻¹)	5,8±0,2	5,8±0,2	0,75
Glycémie plasmatique à 2h (mmol·L ⁻¹)	7,4±0,6	7,2±0,5	0,91
Insuline plasmatique à jeun (pmol·L ⁻¹)	144,7±23,5	110,4±11,9	0,22
Sexe	n (%)	n (%)	
Femmes	4 (45)	4 (50)	-
Hommes	5 (55)	4 (50)	-

¹ Moyenne ± erreur-type

PFC, polyphénols de fraises et canneberges; n, nombre de sujets.

IMC, Indice de masse corporelle; HDL, lipoprotéines de haute densité; LDL, lipoprotéines de basse densité; chol., cholestérol.

6.5. Composition phénolique plasmatique.

Une procédure de chromatographie UHPLC couplée à MS/MS a permis de détecter les métabolites de polyphénols dans le plasma des participants de l'étude de biodisponibilité (tableau 6.6). Ainsi, les résultats présentés au tableau 6.6 correspondent aux moyennes des aires sous la courbe individuelle calculées en

considérant six points. Chaque point est défini par la concentration trouvée lors de prélèvements sanguins à 0, 30, 60, 120, 240 et 360 minutes.

L'analyse a permis de détecter 21 métabolites de polyphénols plasmatiques. Les molécules phénoliques retrouvées dans le plasma des participants ne correspondent pas forcément à celles retrouvées dans le breuvage de fraises et canneberges. En effet, une fois absorbées au niveau de l'intestin, les molécules natives (molécules consommées) sont soumises à un métabolisme de phase II très intense et sont fortement modifiées, ce qui signifie que les molécules sont glucuronidées, sulphatées ou méthylées afin de les rendre plus solubles et de les éliminer au niveau du rein. Ainsi, la présence des molécules plasmatiques est différente de celle des molécules phénoliques consommées (Scalbert & Williamson, 2000).

La concentration plasmatique des métabolites totaux présente une différence entre les deux groupes à l'étude ($p < 0,05$). Cependant, il est important de regarder les différences dans les concentrations individuelles des métabolites pour pouvoir identifier les molécules qui sont significativement différentes à l'intérieur de l'ensemble des métabolites.

Parmi les 21 molécules identifiées, la molécule la plus abondante dans le plasma est l'acide hydroxyphénylpropionique. En effet, l'acide hydroxyphénylpropionique retrouvé dans le plasma des sujets du groupe contrôle correspond à 80% de la quantité retrouvée dans le plasma des sujets appartenant au groupe expérimental. Cependant, la concentration de cet acide entre le groupe expérimental et le groupe contrôle n'est pas statistiquement différente ($p = 0,38$).

Du côté du groupe contrôle, les molécules les plus abondantes, après l'acide hydroxyphénylpropionique, sont l'acide vanillique et l'acide hydroxybenzoïque. Il est probable qu'aucun des deux acides ne provienne du breuvage, car le groupe expérimental montre des concentrations très similaires au groupe contrôle.

Des 21 molécules retrouvées dans le plasma, seulement quatre ont montré une concentration significativement plus élevée chez le groupe expérimental (PFC) par rapport au groupe contrôle ($p < 0,0001$) (tableau 6.6). Ces quatre molécules correspondent à la catégorie des acides phénoliques, dont l'acide hydroxyhippurique, l'acide *m*-coumarique, l'acide *p*-coumarique et l'acide férulique.

La concentration d'acide hydroxyhippurique dans le groupe traité est la deuxième plus abondante, après l'acide hydroxyphénylpropionique. Par contre, chez le groupe contrôle, seulement 19% de cette concentration a été mesurée. En ce qui concerne la concentration d'acide férulique, le groupe contrôle a atteint seulement 4,5% de la concentration trouvée chez le groupe expérimental. Même si les concentrations des acides coumariques sont faibles dans le groupe expérimental, nous retrouvons dans le groupe contrôle des pourcentages encore plus

faibles (<1%). Cette différence entre les deux groupes à l'étude suggère une bonne biodisponibilité des acides coumariques.

Tableau 6.6. Composition phénolique plasmatique

Métabolite	Concentration plasmatique AUC (nM · min)	
	Contrôle ¹	PFC ¹
Quercétine glucuronide	286 ± 232	416 ± 189
Quercétine sulfate	74 ± 36	152 ± 98
Isorhamnétine glucuronide sulfate	158 ± 27	160 ± 26
Méthyle catéchines glucuronide	44 ± 8	33 ± 4
Dihydroxyphényl-γ-valérolactone	107 ± 69	246 ± 93
Diméthyle ellagique acide glucuronide	363 ± 57	436 ± 109
Cyanidine	15 ± 4	19 ± 7
Pelargonidine	7 ± 2	7 ± 1
Cyanidine glucuronide	28 ± 7	39 ± 15
Acide dihydroxyphénylpropionique	458 ± 102	701 ± 91
Acide hydroxyphénylpropionique	1861 ± 770	2330 ± 744
Acide dihydroxyphénylacétique	551 ± 46	663 ± 105
Acide hydroxyphénylacétique	624 ± 97	602 ± 51
Acide hydroxybenzoïque	1077 ± 306	1378 ± 403
Acide hydroxyhippurique	386 ± 69	2046 ± 254 **
Acide benzoïque	623 ± 30	575 ± 31
Acide <i>m</i>-coumarique	7 ± 3	859 ± 53 **
Acide <i>p</i>-coumarique	-	174 ± 18 **
Acide caféique	307 ± 55	438 ± 71
Acide férulique	9 ± 4	203 ± 39 **
Acide vanillique	1621 ± 147	1903 ± 334
Métabolites totaux	8607 ± 852	13379 ± 2050 *

¹Moyenne ± écart-type. * p<0,05, ** p<0,0001

AUC, Aire sous la courbe; PFC, polyphénols de fraises et canneberges.

6.5.1. Évolution de la concentration plasmatique des acides *p*-coumarique, *m*-coumarique, férulique et hydroxyhippurique après l'ingestion du breuvage PFC

Après l'identification des molécules significativement différentes entre le groupe expérimental et le groupe contrôle, il est intéressant de faire une analyse de l'évolution de la concentration plasmatique de ces quatre molécules, les acides *p*-coumarique, férulique, *m*-coumarique et hydroxyhippurique. Dans le chapitre 4, figure 4.5, nous observons que les pics d'absorption maximale se présentent à 30 minutes, à partir de ce moment, la chute de la concentration débute. Cependant, une faible présence des acides coumariques s'observe encore jusqu'à six heures après la consommation du breuvage.

6.6. Composition en ABA plasmatique

La même procédure de chromatographie a permis d'extraire, d'identifier et de quantifier les molécules d'ABA et ses composés dans le plasma des participants de l'étude de biodisponibilité. Les données présentées au tableau 6.7 correspondent aussi aux aires sous la courbe, calculées exactement de la même façon que les aires de métabolites de polyphénols (décrit à la section méthodologie sous-section 5.5). Sept différentes molécules ont été observées lors de cette analyse dans les deux groupes à l'étude (tableau 6.7).

La concentration d'acide phaséique est semblable entre les deux groupes mais représente la plus importante en quantité par rapport aux autres métabolites. Dans le groupe expérimental, la deuxième molécule la plus abondante est l'ABA glucuronide. La différence dans les concentrations de cette molécule entre les deux groupes est très significative ($p < 0,0001$). De son côté, la concentration du *cis*-ABA chez le groupe PFC a quadruplé par rapport à celle du groupe contrôle ($p < 0,05$) et celle du DPA était onze fois plus élevée ($p < 0,05$). Bien que la différence de concentration du *cis*-ABA soit significative, il est important de noter qu'elle représente la molécule avec la concentration la plus faible dans le groupe expérimental.

Tableau 6. 7. Composition en ABA plasmatique

Métabolite	Concentration plasmatique AUC (nM · min)	
	Contrôle ¹	PFC ¹
<i>cis</i> -ABA	44,1 ± 11,6	174,7 ± 41,6*
PA	7818,2 ± 325,5	7156,9 ± 469,0
DPA	23,6 ± 11,5	262,6 ± 51,6*
7'-OH-ABA	328,3 ± 66,4	512,1 ± 40,0
ABA-GE	458,9 ± 33,2	512,5 ± 40,0
<i>neo</i> -PA	884,3 ± 60,7	984,2 ± 57,4
ABA-glucuronide	171,8 ± 27,5	1396,1 ± 244,8***

¹Moyenne ± écart-type. * $p < 0,05$, ** $p < 0,0001$

AUC, aire sous la courbe; PFC, Polyphénols de fraises et canneberges ; ABA, acide abscissique; DPA, acide dihydroxyphaséique; PA acide phaséique; 7-OH-ABA, 7-hydroxy acide abscissique; ABA-GE, acide abscissique glucose ester.

6.6.1. Évolution des concentrations plasmatiques de *cis*-ABA, de DPA et d'ABA glucuronide après ingestion du breuvage PFC

La mesure des cinétiques plasmatiques de *cis*-ABA, de DPA et d'ABA glucuronide permet de déterminer leur concentration à jeun et de comprendre leur degré de biodisponibilité post-absorptive (figure 6.1). Cette information fournit des hypothèses sur la provenance des molécules, notamment à savoir si elles sont produites de façon endogène ou exogène. Dans ce cas particulier, les valeurs moyennes au temps zéro de *cis*-ABA (0,1 nM), de DPA (0,0 nM) et d'ABA Glucuronide (0,0 nM) semblent être de provenance exogène considérant l'état à jeun des participants.

L'analyse statistique ANOVA à mesures répétées a révélé une interaction traitement x temps dans les cinétiques de *cis*-ABA ($p < 0,0001$), DPA ($p = 0,0007$) et d'ABA-glucuronide ($p < 0,0001$). En effet, la figure 6.1 permet d'observer que la réponse au traitement dans le temps est clairement différente entre les deux breuvages. Ainsi, l'évolution de la concentration de *cis*-ABA présente un pic à 30 minutes ($p < 0,001$) mais il n'y a pas de différence significative après 60 minutes. Concernant DPA, les concentrations dans le groupe expérimental (PFC) versus le groupe contrôle sont significativement différentes à 30 ($p < 0,001$), 60 ($p < 0,001$) et 120 ($p < 0,001$) minutes de la cinétique. Les concentrations aux temps 0, 240 et 360 minutes ne sont pas significativement différentes. Concernant la cinétique d'ABA glucuronide, les concentrations moyennes atteintes dans le groupe expérimental à 30, 60 et 120 minutes, ont des niveaux de signification par rapport au groupe contrôle de l'ordre de $p < 0,001$, ce qui est très significatif. De même, la concentration à 240 minutes est significativement différente ($p < 0,01$). Ainsi, nous observons des baisses moins prononcées de DPA et d'ABA glucuronide et un taux d'élimination de ces molécules plus lent. En fait, contrairement à ce qui est observé du côté de *cis*-ABA, les teneurs de DPA et d'ABA glucuronide sont demeurées significatives plus longtemps au cours de la cinétique (figure 6.1). Malgré que les concentrations atteintes à 360 minutes ne soient pas significativement différentes entre les deux groupes, il est à noter que les concentrations de DPA et d'ABA glucuronide ont maintenu des niveaux au-dessus de zéro, plus de six heures après avoir bu le breuvage expérimental. En effet, la concentration moyenne de DPA à 360 minutes est de 0.4 nM et celle d'ABA glucuronide est de 1.5 nM.

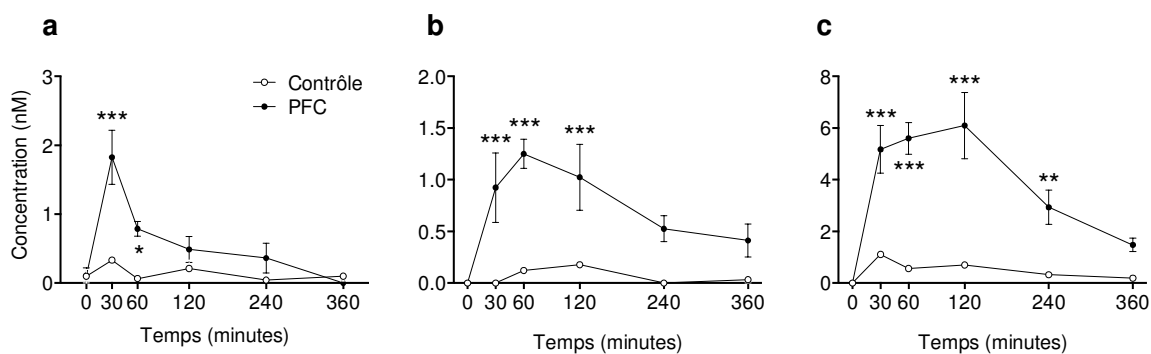


Figure 6. 1. Cinétiques plasmatiques de a) *cis*-ABA, b) de DPA et c) d'ABA glucuronide
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

6.7. Variation de la sensibilité à l'insuline (M/I)

Dans l'étude Glucophénol (Chapitre 4), des changements marqués ont été observés au niveau de la sensibilité à l'insuline (M/I) chez un échantillon de 39 participants. En effet, une amélioration de 14% de la sensibilité à l'insuline (M/I) a été observée chez le groupe expérimental (PFC) alors que le groupe contrôle a montré une

diminution de 7%, ceci a entraîné une différence significative entre les variations observées à l'intérieur des deux groupes ($+0,9 \pm 0,5 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{pmol}^{-1}$ vs $-0,5 \pm 0,5 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{pmol}^{-1}$, $p=0,03$).

Malgré les bénéfices atteints par la prise du breuvage de fraises et de canneberges au sein de cette cohorte de 39 sujets, dans la sous-population des 17 sujets ayant participé à l'étude de biodisponibilité, ces paramètres n'ont pas atteint le niveau de signification. Même si dans le groupe PFC nous observons une augmentation moyenne de 13% de la sensibilité à l'insuline (*M/I*) (voir tableau 6.8), cette augmentation n'est pas significative à l'intérieur du groupe PFC, selon la valeur de p obtenue pour le test de t des valeurs *M/I* pré vs *M/I* post intervention ($p=0,56$). Il est important de considérer que les valeurs pré-intervention de *M/I* étaient similaires entre les deux groupes à l'étude, ce qu'il faut considérer pour juger de la validité des observations suivantes, notamment les changements observés dans ce paramètre après l'intervention.

Tableau 6. 8. *M/I* en pré et post intervention

Variables	Contrôle (n 9)		PFC (n 6)		p*
	Pré ¹	Post ¹	Pré ¹	Post ¹	
<i>M/I</i> ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{pmol}^{-1}$)	0,006±0,001	0,006±0,001	0,005±0,001	0,006±0,001	-
<i>M/I</i>	Delta ² 0,00025±0,00052		Delta ² 0,00038±0,00058		0,88
<i>M/I</i>	% changement ³ 14,63±13,18		% changement ³ 13,04±13,56		0,83

*Valeur de p pour le % de changement entre les 2 groupes

¹ Moyenne \pm erreur-type.

² Delta (valeur post - pré). Moyenne \pm erreur-type.

³ Pourcentage de changement ((valeur post - pré)/pré) * 100). Valeur moyenne \pm erreur-type.
PFC, Polyphénols de fraises et canneberges; *M/I*, sensibilité à l'insuline.

6.8. Variation des paramètres inflammatoires et des lipides sanguins

Les pourcentages de changement observés pour les paramètres inflammatoires et lipidiques avant et après l'intervention sont faibles. Nous n'observons donc pas de différence dans ces pourcentages de changement entre les deux traitements (voir tableau 6.9).

Tableau 6. 9. Paramètres inflammatoires et lipides sanguins en pré et post intervention

Variables	Contrôle (n=9)				% changement ¹	PFC (n=8)				% changement ¹	p*
	Pré		Post			Pré		Post			
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM		Moyenne	SEM	Moyenne	SEM		
IL-6	4,3	0,5	4,1	0,7	-5,7	4,2	0,5	4,8	0,8	11,7	0,14
TNF-α	4,6	0,3	4,3	0,4	-5,3	4,2	0,7	4,0	0,7	-3,5	0,95
TG	1,6	0,2	1,5	0,2	0,6	2,0	0,4	1,9	0,3	-3,8	0,75
Chol Tot	4,9	0,2	5,0	0,1	2,4	5,4	0,3	5,6	0,4	2,2	0,54
Chol HDL	1,3	0,1	1,3	0,1	1,8	1,3	0,1	1,3	0,1	1,6	0,97
Chol LDL	3,0	0,2	3,1	0,3	4,1	3,2	0,3	3,4	0,4	6,5	0,76
Ratio ²	4,1	0,3	4,0	0,2	0,8	4,5	0,5	4,5	0,4	0,7	0,97

¹ Pourcentage de changement ((valeur post - pré)/pré) * 100.

² Ratio cholestérol total/HDL.

*Valeur de p pour les % de changement entre les 2 groupes.

PFC, Polyphénols de fraises et canneberges; IL-6, interleukine-6; TNF- α, facteur de nécrose tumorale alpha; TG, triglycérides; Chol Tot, cholestérol total, HDL lipoprotéines de haute densité; LDL, lipoprotéines de basse densité.

6.9. Paramètres du métabolisme du glucose mesurés lors de l'OGTT

L'application des critères d'inclusion bien spécifiques a permis d'obtenir des valeurs initiales de la glycémie, du C-peptide et d'insuline similaires entre les deux groupes de l'étude (tableau 6.10).

Tableau 6. 10. IAUC pré-intervention (0 à 30 minutes et 0 à 120 minutes)

	IAUC pré-intervention 0 à 30 min		p
	Contrôle ¹	PFC ¹	
Glycémie	66,58 ± 6	60,75 ± 6	0,98
Insuline	13958 ± 1434	9270 ± 1666	0,06
C-peptide	43719 ± 4355	33990 ± 5339	0,28
	IAUC pré-intervention 0 à 120 min		p
	Contrôle ¹	PFC ¹	
Glycémie	365,3 ± 50	382,2 ± 50	0,81
Insuline	103170 ± 18280	69866 ± 17791	0,32
C-peptide	426855 ± 28052	310365 ± 3778	0,14

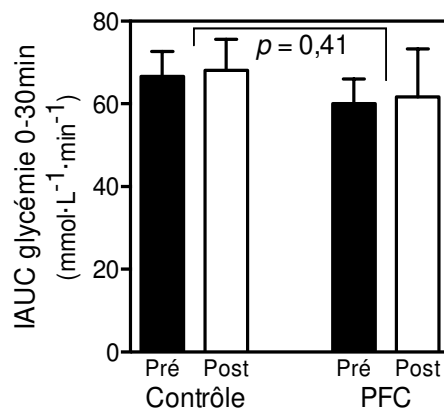
¹Moyenne ± erreur-type.

Test de Mann-Whitney. Valeur de p significative <0,05

IAUC, Incremental area under the curve; PFC, Polyphénols de fraises et canneberges.

6.9.1. IAUC de la glycémie 0 à 30min

Les valeurs d'IAUC de la glycémie obtenue de 0 à 30 minutes ont augmenté faiblement, de l'ordre de 2% ($p=0,29$) chez le groupe contrôle et de 10% ($p=0,47$) chez le groupe expérimental. Dans les deux groupes, ce pourcentage de changement de la glycémie est donc non significatif. De plus, la comparaison des pourcentages de changement des groupes contrôle et PFC ne correspond pas à un changement significatif ($p=0,41$) (figure 6.2).

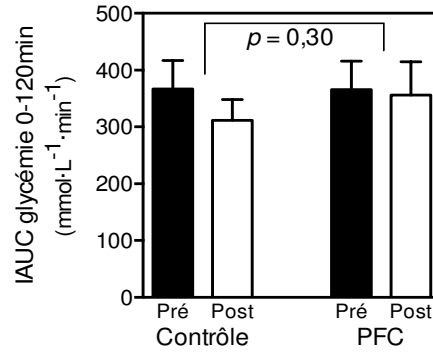


IAUC glycémie 0-30 min ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)		
	Contrôle	PFC
% du changement	2,00 ± 5,85	10,39 ± 22,92

Figure 6. 2. IAUC glycémie de 0 à 30 minutes
Moyenne par groupe \pm erreur-type. $n=17$

6.9.2. IAUC de la glycémie 0 à 120min

L'analyse de la glycémie tout au long de l'OGTT (IAUC de 120 minutes) n'a pas montré des résultats différents à ceux obtenus dans la courbe incrémentale de concentration de 0 à 30 minutes (IAUC de 30 minutes). Les pourcentages de changement à l'intérieur de chaque groupe ne sont pas différents entre les valeurs pré- et post-intervention, -10% dans le groupe contrôle ($p=0,10$) et 7% dans le groupe PFC ($p=0,47$). De plus, le pourcentage de changement n'est pas différent entre le groupe contrôle et le groupe PFC ($p=0,30$) (figure 6.3).



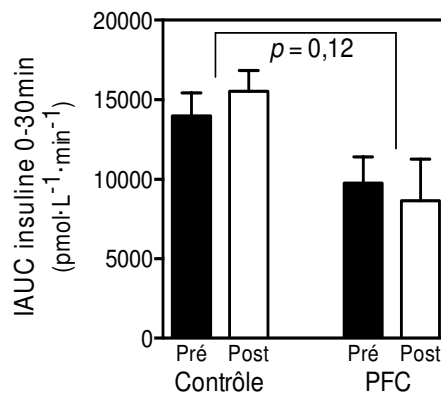
IAUC glycémie 0-120 min (mmol·L ⁻¹ ·min ⁻¹)		
	Contrôle	PFC
% du changement	-10,2 ± 11,1	7,35 ± 20,3

Figure 6. 3. IAUC glycémie

de 0 à 120 minutes
Moyenne par groupe ± erreur-type.
n=17

6.9.3. IAUC de l'insulinémie 0 à 30min

La réponse insulinémique pendant les 30 premières minutes de l'OGTT est présentée à la figure 6.4. Dans le groupe contrôle, l'IAUC a augmenté de 19 % de façon non significative ($p=0,10$) par rapport à une diminution non significative de 17% dans le groupe PFC ($p=0,37$). Malgré cette réponse attendue (diminution de l'insulinémie chez le groupe traité), la valeur de p résultante de la comparaison des pourcentages de changement entre les deux groupes à l'étude n'est pas significative ($p=0,12$) (figure 6.4). Cependant, ces résultats suggèrent une tendance vers la diminution de l'insulinémie après l'intervention par rapport au groupe contrôle.

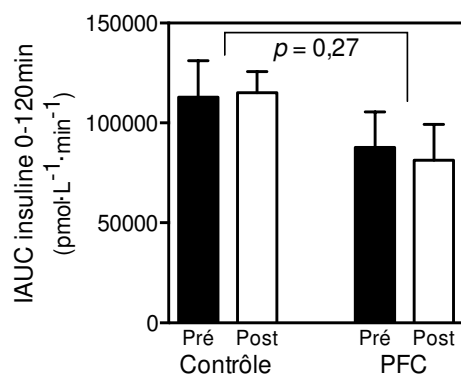


IAUC insuline 0-30 min (pmol·L ⁻¹ ·min ⁻¹)		
	Contrôle	PFC
% du changement	18,8 ± 11,8	-17,03 ± 19,25

Figure 6. 4. IAUC insuline de 0 à 30 minutes
Moyenne par groupe ± erreur-type. n=17

6.9.4. IAUC de l'insulinémie de 0 à 120 min

En ce qui concerne la concentration d'insuline tout au long de l'OGTT (120 minutes), nous retrouvons une réponse comparable à celle observée dans la période de 0 à 30 minutes. En effet, chez le groupe contrôle nous retrouvons une augmentation non significative de la concentration d'insuline de 13% ($p=0,33$) tandis que chez le groupe expérimental, il y a eu une diminution non significative de 4% ($p=0,47$) (figure 6.5). De même, les pourcentages de changement des deux groupes (contrôle vs PFC) ne sont pas différents ($p=0,27$) (figure 6.5).



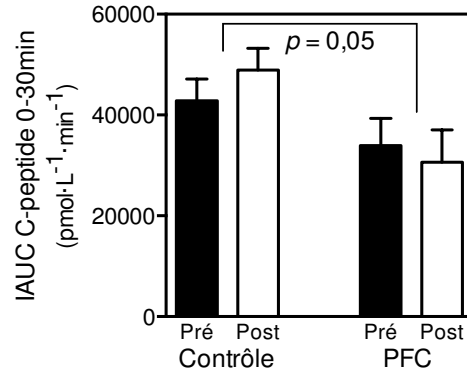
IAUC insuline 0-120 min (pmol·L ⁻¹ ·min ⁻¹)		
	Contrôle	PFC
% du changement	13,0 ± 10,9	-3,9 ± 14,1

Figure 6. 5. IAUC insuline de 0 à 120 minutes
Moyenne par groupe ± erreur-type. n=17

6.9.5. IAUC du C-peptide de 0 à 30min

Quant à la concentration de C-peptide 0 à 30 minutes de l'OGTT, nous observons une augmentation significative de la concentration du C-peptide chez le groupe contrôle de 18% ($p=0,03$), alors que chez le groupe expérimental nous observons une diminution non significative de 14% ($p=0,16$) de la concentration du C-peptide après l'intervention (figure 6.6).

La valeur de p obtenue entre les pourcentages de changement des deux groupes est de 0,046 (figure 6.6). Après correction de Bonferroni nécessaire à cause de la corrélation significative entre les niveaux d'insuline et de C-peptide ($r=0,80$, $p<0,001$), le seuil de p était défini à $p<0,008$, ce qui a entraîné la perte du niveau de significativité de la valeur de p.



IAUC C-peptide 0-30 min (pmol·L ⁻¹ ·min ⁻¹)		
	Contrôle	PFC
% du changement	17,8 ± 7,2	-13,8 ± 12,3

Figure 6. 6. IAUC C-peptide

de 0 à 30 minutes
Moyenne par groupe ± erreur-type. n=17

L'observation spécifique des individus à l'intérieur du groupe contrôle montre une réduction de la sécrétion de C-peptide chez seulement 2 des 9 individus (22,2%), tandis que 5 des 8 individus (62,5%) dans le groupe PFC montrent une telle diminution (figure 6.7). En moyenne, cette diminution du C-peptide est aussi plus importante chez les participants du groupe PFC (35,8%) par rapport à celle atteinte dans le groupe contrôle (9,4%). Ainsi, chez le groupe traité, une corrélation a été observée entre les valeurs individuelles de % de changement d'insuline et les valeurs individuelles de % de changement du C-peptide (test de Spearman) ($r = 0,857$; $p=0,0054$). Cela démontre que les individus présentant une diminution des concentrations d'insuline présentent aussi une diminution de la sécrétion de C-peptide.

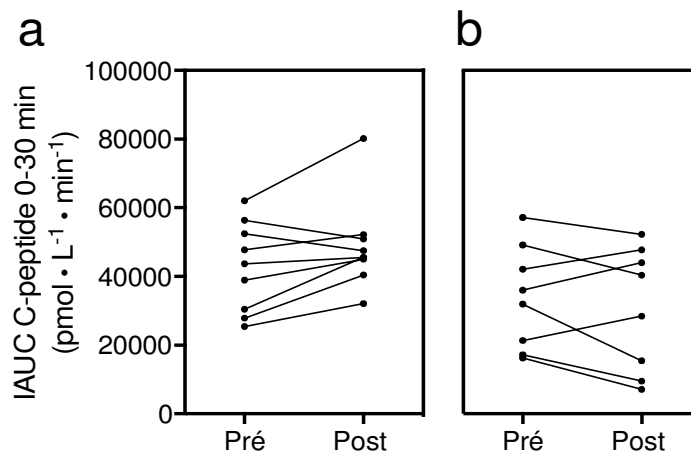
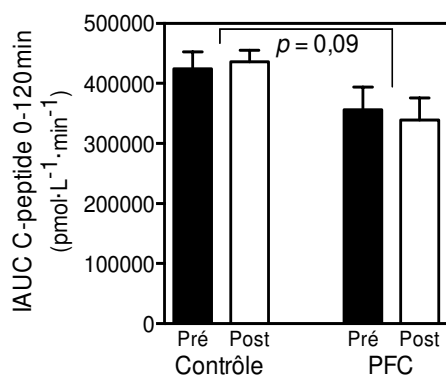


Figure 6. 7. 0-30 minutes IAUC individuelles C-peptide en pré et post intervention chez le groupe contrôle (a) et le groupe expérimental (PFC) (b). n= 9 (contrôle) et n=8 (PFC)

6.9.6. IAUC du C-peptide 0 à 120min

Dans le groupe contrôle, nous observons une augmentation non significative de 5% ($p=0,33$) de la concentration de C-peptide, tandis que chez le groupe expérimental une diminution non significative de 4% ($p=0,19$) a été atteinte (figure 6.8). Cependant, la comparaison des pourcentages de changement entre les deux groupes n'était pas significativement différente ($p=0,099$).



IAUC C-peptide 0-120 min (pmol·L ⁻¹ ·min ⁻¹)		
	Contrôle	PFC
% du changement	4,7 ± 4,9	-4,2 ± 4,4

Figure 6. 8. IAUC C-peptide de 0 à 120 minutes
Moyennes par groupe ± erreur-type. n=17

6.10. Relation de la teneur en PP et en ABA avec des paramètres du métabolisme du glucose et de lipides plasmatiques

La consommation du breuvage de fraises et de canneberges a entraîné une augmentation des teneurs plasmatiques de certains métabolites des polyphénols et de l'acide abscissique (voir tableau 6.6 et tableau 6.7). Ainsi, une analyse de corrélation a été faite entre ces teneurs individuelles plasmatiques avec différents paramètres du métabolisme du glucose et des lipides plasmatiques.

Le calcul d'une régression linéaire multiple robuste a permis d'observer les relations entre les différentes molécules étudiées (provenant de PP et d'ABA) et plusieurs variables dépendantes c'est-à-dire les changements de la sensibilité à l'insuline, des lipides et des marqueurs inflammatoires plasmatiques ainsi que des pourcentages de changement de la glycémie, l'insulinémie et du C-peptide avant et après l'OGTT. Les résultats ont indiqué une absence de relation entre la sensibilité à l'insuline, les lipides et les marqueurs inflammatoires sanguins et la présence des différents métabolites polyphénoliques et de l'ABA (tableau 6.11 et 6.12). Dans le cas des pourcentages de changements des IAUC de la glycémie et de l'insulinémie, il y a aussi

absence de relation avec la présence des métabolites des polyphénols et de l'ABA (tableau 6.13 et 6.14). Cependant nous observons une relation négative entre la présence d'acide *p*-coumarique (acide -4-hydroxycinnamique) plasmatique et le pourcentage de changement de l'IAUC du C-peptide de 0 à 30 minutes (tableau 6.13). L'équation obtenue suggère que l'augmentation d'une unité de la teneur d'acide *p*-coumarique provoque une diminution de 16 unités de C-peptide dans les 30 premières minutes de l'OGTT après la consommation des breuvages ($\beta=-16,07$). La valeur de *p* pour cette relation est de 0,0046, ce qui est significatif, car après correction de Bonferroni le niveau déterminé comme étant significatif est $<0,017$.

Tableau 6. 11. Résultats de la régression linéaire multiple robuste de la concentration plasmatique de métabolites de PP avec la sensibilité à l'insuline, les lipides et les marqueurs inflammatoires sanguins

Molécule ¹	Variables (valeur delta) ²	Valeur de p
acide <i>m</i> -coumarique	Sensibilité à l'insuline (<i>M/I</i>)	0,90
acide hydroxyhippurique	Triglycérides	0,60
acide férulique	Cholestérol total	0,36
acide <i>m</i> -coumarique	Cholestérol HDL	0,88
acide hydroxyhippurique	Cholestérol LDL	0,08
acide hydroxyhippurique	Ratio Chol total/HDL	0,27
acide <i>p</i> -coumarique	IL-6	0,29
acide <i>m</i> -coumarique	TNF- α	0,75

¹ La molécule qui figure dans le tableau appartient au meilleur modèle obtenu lors de la régression linéaire multiple robuste.

² Valeur delta = valeur post- valeur pré * Valeur significative ($p < 0,05$); *M/I*, sensibilité à l'insuline; HDL lipoprotéines de haute densité; HDL lipoprotéines de basse densité.

Tableau 6. 12. Résultats de la régression linéaire multiple robuste de la concentration plasmatique de métabolites d'ABA avec la sensibilité à l'insuline, les lipides et les marqueurs inflammatoires sanguins

Molécule ¹	Variables (valeur delta) ²	Valeur de p
<i>cis</i> -ABA	Sensibilité à l'insuline (<i>M/I</i>)	0,91
<i>cis</i> -ABA	Triglycerides	0,70
ABA-Glucuronide	Cholestérol total	0,56
Dihydroxy acide phaséique	Cholestérol HDL	0,42
ABA-Glucuronide	Cholestérol LDL	0,53
<i>cis</i> -ABA	Ratio Chol total/HDL	0,81
<i>cis</i> -ABA	IL-6	0,81
Dihydroxy acide phaséique	TNF- α	0,52

¹ La molécule qui figure dans le tableau appartient au meilleur modèle obtenu lors de la régression linéaire multiple robuste

² Valeur delta = valeur post- valeur pré

* Valeur significative ($p < 0,05$); *M/I*, sensibilité à l'insuline; HDL lipoprotéines de haute densité; HDL lipoprotéines de basse densité.

Tableau 6. 13. Résultats de la régression linéaire multiple robuste de la concentration plasmatique de métabolites de PP avec les pourcentages de changements des IAUC de la glycémie, de l'insulinémie et du C-peptide au cours de l'OGTT

Molécule ^{1,2}	Variable de l'OGTT (% du changement) ³	Valeur de p
acide férulique	Glycémie (0 à 30 min)	0,91
acide <i>m</i> -coumarique	Insulinémie (0 à 30 min)	0,22
acide <i>p</i> -coumarique	C-peptide (0 à 30 min)	0,0046*
acide férulique	Glycémie (0 à 120 min)	0,64
acide <i>m</i> -coumarique	Insulinémie (0 à 120 min)	0,25
acide <i>m</i> -coumarique	C-peptide (0 à 120 min)	0,17

¹ La molécule qui figure dans le tableau appartient au meilleur modèle obtenu lors de la régression linéaire multiple robuste

² Concentration plasmatique obtenue dans les premiers 30 minutes du test de biodisponibilité

³% du changement = ((valeur post intervention – valeur pré intervention) / valeur pré intervention) * 100

* Valeur significative (p < 0,017); OGTT, test oral de tolérance au glucose.

Tableau 6. 14. Résultats de la régression linéaire multiple robuste de la concentration plasmatique de métabolites d'ABA avec les pourcentages de changements des IAUC de la glycémie, de l'insulinémie et du C-peptide au cours de l'OGTT

Molécule ^{1,2}	Variable de l'OGTT (% du changement) ³	Valeur de p
ABA-Glucuronide	Glycémie (0 à 30 min)	0,43
<i>cis</i> -ABA	Insulinémie (0 à 30 min)	0,28
ABA-Glucuronide	C-peptide (0 à 30 min)	0,11
<i>cis</i> -ABA	Glycémie (0 à 120 min)	0,77
Dihydroxy acide phaséique	Insulinémie (0 à 120 min)	0,35
ABA-Glucuronide	C-peptide (0 à 120 min)	0,25

¹ La molécule qui figure dans le tableau appartient au meilleur modèle obtenu lors de la régression linéaire multiple robuste

² Concentration plasmatique obtenue lors du test de biodisponibilité (360 minutes après la consommation du breuvage; OGTT, test oral de tolérance au glucose.

³% du changement = ((valeur post intervention – valeur pré intervention) / valeur pré intervention) * 100

Chapitre 7 : Discussion

Les connaissances actuelles sur le diabète permettent la mise en place des programmes efficaces pour prévenir et traiter cette maladie ainsi que les complications et les décès prématurés qui en résultent. Néanmoins, le diabète constitue un problème de santé publique majeur encore en 2017. La recherche de moyens préventifs efficaces contre le développement de cette maladie devient donc une priorité en recherche.

Plusieurs travaux de recherche ont été entrepris pour évaluer l'action des aliments sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline dans la prévention du diabète. Les résultats de ces travaux scientifiques indiquent que la consommation de petits fruits, et notamment ceux qui sont riches en polyphénols et acide abscissique (Del Río et al, 2013; Magnone et al, 2015), est bénéfique pour la santé. En effet, la consommation de ces composés phytochimiques, très répandus dans les aliments d'origine végétale, pourrait entraîner des effets positifs sur le métabolisme du glucose, tel que la réduction des niveaux de glucose plasmatique (Cherniack et al., 2011; Magnone et al., 2015) et de l'hyperinsulinémie (Anhê et al., 2013; Bruzzone et al., 2012a). C'est ainsi que grâce à leur contenu riche en polyphénols, la consommation de certains fruits, plus spécifiquement de fraises et de canneberges, peut représenter un bon choix pour améliorer l'homéostasie du glucose et prévenir le diabète de type 2 (Pareiman et al., 2012; Dudonné et al., 2014; Anhê et al., 2015). En effet, les résultats principaux de l'étude préalable Glucophénol confirment que la prise quotidienne d'un extrait de fraises Authentique Orléans et de canneberges riche en polyphénols favorise l'amélioration de la sensibilité à l'insuline périphérique (14%), ainsi que la prévention d'une hausse de l'hypersécrétion d'insuline compensatoire chez des sujets humains résistants à l'insuline (Paquette et al., accepté pour publication, chapitre 4).

Or, l'objectif général de la présente étude était de déterminer le niveau de biodisponibilité de métabolites de polyphénols (PP) et d'acide abscissique (ABA) chez des sujets humains résistants à l'insuline consommant un breuvage à base d'un extrait polyphénolique de fraises Authentique Orléans et de canneberges du Québec et de déterminer si la pharmacocinétique permettait d'expliquer l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. Pour atteindre l'objectif mentionné, la teneur en métabolites de PP et d'ABA a été mesurée dans des échantillons plasmatiques chez des sujets humains qui ont consommé un breuvage à base d'extraits riches en polyphénols provenant de fraises et de canneberges. Les échantillons sanguins avaient été prélevés à différents temps, avant (à jeun, T = 0 min) et après la consommation du breuvage (T = 30, 60, 120, 240 et 360 minutes), pour pouvoir déterminer l'évolution de la teneur des molécules dans le plasma. Les extractions des métabolites de PP et d'ABA ont été réalisées par chromatographie liquide à ultra haute performance couplé à spectrométrie de masse (UHPLC-MS/MS).

Il est important de préciser que les 17 sujets ont été recrutés à partir d'un échantillon de 41 sujets participant à une étude sur les effets d'extraits de fraises et de canneberges riches en polyphénols sur la sensibilité à l'insuline

(étude Glucophérol). Nos sujets répondaient donc aux critères d'inclusion et d'exclusion de l'étude Glucophérol: être âgés de 40 à 65 ans, présenter un surpoids (IMC \geq 25) et être résistants à l'insuline.

7.1. Premier objectif spécifique

Objectif spécifique : Mise au point et validation d'un procédé d'extraction d'ABA et ses métabolites à partir du plasma de sujets humains.

Au sein de notre équipe de recherche, deux méthodes d'extraction d'ABA adaptées de celle d'Owens et Abrams (2009) étaient déjà considérées comme des méthodes faisables pour extraire l'ABA et ses métabolites à partir d'échantillons de sources végétaux, notamment de jus de fruits (extraction totale) et de sirop d'érable (extraction partielle). Cependant, ces méthodes n'avaient jamais été employées pour extraire l'ABA du plasma sanguin. Une troisième méthode utilisée dans notre laboratoire pour extraire des métabolites de PP à partir du plasma de rats a également été testée pour extraire l'ABA et ses métabolites à partir du plasma humain (Dudonné et al., 2014). Il y a deux raisons pour lesquelles cette troisième méthode a été considérée comme une méthode appropriée pour mesurer l'ABA plasmatique. La première concerne la similarité des échantillons, en effet, l'extraction de métabolites de PP ainsi que les extractions d'ABA ont été faites sur des échantillons du plasma. La deuxième raison est la similarité de cette troisième méthode avec les méthodes d'extraction d'ABA habituelles, en ce qui concerne l'utilisation des cartouches HLB pour procéder à l'extraction.

La mise au point du procédé d'extraction d'ABA et ses métabolites à partir du plasma de sujets humains a été faite en testant les trois méthodes décrites ci-dessus. Nous avons obtenu les meilleurs pourcentages de récupération d'ABA avec la méthode d'extraction partielle. En effet, dans les extractions de faibles quantités d'ABA, la méthode d'extraction totale a atteint de pourcentages de récupération de l'ordre de 70%, tandis que celle d'extraction partielle était en moyenne de 90%. Quant aux pourcentages de récupération des extractions faites avec quantités plus importantes d'ABA, les résultats ont été semblables avec les deux méthodes. Il faut souligner que la méthode d'extraction de PP (troisième méthode testée) n'a pas donné des résultats intéressants pour l'ABA et ses métabolites sur le plasma humain, car les pourcentages de récupération étaient de 0%.

Concernant le processus de validation, la méthode partielle a permis de bien extraire l'ABA et ses métabolites à partir des échantillons du plasma de rats gavés à l'ABA. Compte tenu du succès du processus de la mise au point et de la validation, nous avons conclu que la méthode d'extraction partielle d'ABA permet d'obtenir de bons niveaux de récupération à partir du plasma humain pour les six molécules ciblées : le *cis*-ABA, l'acide phaséique (PA), l'acide dihydroxyphaséique (DPA), le 7'-hydroxy acide abscissique (7'-OH-ABA), l'acide abscissique glucose ester (ABA-GE) et le néo-PA.

Il est à noter que l'identification de ces six molécules plasmatiques constitue une contribution scientifique importante de la présente étude, car les autres travaux antérieurs publiés concernant l'ABA chez les mammifères portaient seulement sur l'ABA sous la forme *cis*. Cependant, afin d'obtenir un profil plus exhaustif des métabolites d'ABA dans le plasma des sujets humains, dans la présente étude de biodisponibilité, nous avons réalisé une analyse plus complète qui comprenait l'identification d'ABA sous la forme *cis*, mais aussi l'identification de ses métabolites végétaux nommés ci-haut. En effet, historiquement, la première extraction d'ABA était effectuée en 1986 à partir d'échantillons de cerveaux de mammifères (rats et porcs) (Le Page-Degivry et al, 1986). Cependant, cette méthode d'extraction était limitée à l'extraction de *cis*-ABA en plus d'être longue et coûteuse. Les méthodes plus récentes d'extraction d'ABA à partir de tissus de mammifères sont moins laborieuses, mais n'identifient uniquement que la molécule de *cis*-ABA (Gómez-Cadenas et al., 2002; Lopez-Carbonelle et Jáuregui, 2005; Trapp et al., 2014).

En outre, il faut mentionner que l'identification de l'ABA glucuronide constitue aussi une contribution nouvelle et très importante du présent projet. Premièrement, parce que cette molécule n'avait jamais été identifiée auparavant dans le plasma, mais surtout, parce que la molécule d'ABA a été décrite par plusieurs auteurs comme une molécule produite de manière endogène (Ameri et al., 2015; Bassaganya-Riera et al., 2010; Hai-Hang et al., 2011; Magnone et al., 2015). En tant que molécule endogène, elle ne devrait pas être glucuronidée pour son élimination. Cependant, il a été démontré que la glucuronidation ne se fait pas exclusivement pour éliminer des molécules exogènes (xénobiotiques), sinon pour inactiver des molécules synthétisées par l'organisme, telles que les hormones stéroïdiennes, la bilirubine et l'acide biliaire (Hum et al., 1999). Dans le même manuscrit, Hum et al. (1999) mentionnent que la conjugaison des molécules peut se passer à plusieurs organes autres que le foie, selon soit l'exposition de ses molécules aux différents organes. Par exemple dans le rein, l'intestin, le poumon, la peau, le cerveau, le tissu adipeux, le thymus, la prostate ainsi que dans les seins. Cependant, tenant en compte la grande quantité d'ABA glucuronide, nous pourrions spéculer sur la glucuronidation de l'ABA dans le foie qui est l'organe le plus puissant dans la glucuronidation des molécules. Cependant, bien que les masses de l'ABA et de son métabolite correspondent à la forme glucuronide de la molécule, l'identification d'ABA glucuronide doit être confirmée, car nous ne disposons pas d'un standard pour comparer les temps de rétention de cette molécule.

7.2. Deuxième objectif spécifique

Objectif spécifique: Mesurer la composition en PP et ABA des breuvages expérimentaux.

Pour atteindre le deuxième objectif spécifique, des extractions ont été effectuées séparément pour la quantification des PP et d'ABA. À partir des résultats obtenus, nous pouvons souligner que l'identification de toutes ces molécules dans le breuvage expérimental correspond à la composition des mêmes composés phytochimiques identifiés auparavant par d'autres auteurs qui ont aussi étudié les fraises et les canneberges.

En effet, les fraises constituent une source importante de polyphénols et d'ABA. En ce qui concerne les polyphénols, les fraises contiennent une grande quantité de proanthocyanidine (PAC) et d'anthocyanes. En moins grande quantité, les fraises contiennent des ellagitannines, de l'acide *p*-coumarique, des flavonoles et de l'acide ellagique (Buendía et al, 2010; Aaby et al, 2012). Cette importante concentration de PAC dans le breuvage expérimental est en accord avec les résultats rapportés par Buendía et al. (2010) qui ont montré que les PAC représentent le composé phénolique plus abondant dans 15 cultivars de fraises. En termes d'ABA, les fraises contiennent encore plus d'ABA (2900 pmol/g poids frais) (résultats non publiés) que les figues (2812 pmol/g poids frais), qui ont déjà été rapportées comme étant l'une des sources plus importantes d'ABA (Magnone et al., 2015).

Les canneberges, quant à elles, sont considérées comme étant particulièrement riches en plusieurs composés phytochimiques, dont les flavonoïdes et les acides hydroxybenzoïques sont les plus abondants. Ainsi, dans les canneberges, différentes molécules ont été identifiées, telles que les anthocyanes (responsables de la coloration rouge brillant), les flavonoles (responsables de la pigmentation jaunâtre) et les catéchines (qui contribuent à la saveur astringente) (Pappas et al., 2009). Mais surtout, les canneberges sont considérées comme une excellente source de proanthocyanidines (en moyenne 4188 mg/kg) (Carpenter et al., 2014; Gu et al., 2004). Du côté des acides phénoliques, Feliciano et al. (2016) mentionnent que la molécule la plus abondante dans la canneberge est l'acide benzoïque, suivi des autres acides tel que l'acide *p*-coumarique et l'acide férulique. Cela est en accord avec nos résultats sur la composition du breuvage expérimental (PFC), car ces trois acides ont été trouvés en quantités significativement supérieures dans le breuvage PFC par rapport au breuvage contrôle. En plus, tous les acides phénoliques rapportés par Feliciano et al. (2016), sauf l'acide cinnamique et l'acide protocatéchique, ont été aussi retrouvés dans notre breuvage de fraises et canneberges. Comme Feliciano et al. (2016), nous n'avons pas retrouvé l'acide hydroxyhippurique dans la caractérisation des breuvages. Néanmoins, nous avons retrouvé cet acide dans le plasma de nos participants dans le même ordre de concentration que ces auteurs (Feliciano et al., 2016). En effet, l'acide hydroxyhippurique représente le métabolite plus abondant dans le plasma des participants dans les deux études. En ce qui concerne le contenu en ABA des canneberges, il n'y a pas d'information disponible à ce jour.

Bref, dans notre étude de biodisponibilité, la dose de polyphénols totaux fournie par notre breuvage expérimental correspondait à 333 mg/j. Cependant, nous trouvons différentes doses de polyphénols totaux dans la littérature,

notamment dans les études de la biodisponibilité de ces molécules chez l'humain. Par exemple, Feliciano et al. ont utilisé une dose journalière de polyphénols totaux de 726 mg provenant d'une poudre de bleuets (Feliciano et al., 2016b) ainsi qu'une autre dose journalière de 787 mg provenant d'un jus de canneberges (Feliciano et al., 2016a). Ces doses sont plus élevées que celle utilisée dans notre étude, néanmoins d'autres auteurs ont réussi à mesurer les métabolites des polyphénols dans le sang en employant des doses plus faibles que la nôtre. Par exemple, Stalmach et al. (2012) ont fourni aux participants une dose de polyphénols totaux de l'ordre de 528 $\mu\text{mol/l}$ (polyphénols provenant de jus de raisins Concord) et de son côté, McKay et al. (2015) ont utilisé 188,5mg de polyphénols provenant d'un jus commercial de canneberge.

7.3. Troisième objectif spécifique

Objectif spécifique: Mesurer les teneurs sanguines en métabolites de polyphénols et en ABA à différents temps pendant 6 heures suite à une consommation aiguë d'un breuvage riche en polyphénols provenant d'extraits de fraises et canneberges.

Hypothèse reliée à cet objectif: La consommation d'un breuvage riche en polyphénols de fraises et de canneberges augmente la teneur plasmatique en acide abscissique et en métabolites des polyphénols chez des humains résistants à l'insuline.

La présente étude s'est attardée à mesurer la biodisponibilité des polyphénols et d'ABA de fraises et de canneberges dans une cohorte de 17 sujets humains résistants à l'insuline. Elle est une sous-étude de l'étude Glucophérol (Paquette et al., accepté pour publication, chapitre 4) qui a démontré une amélioration de la sensibilité à l'insuline suite à la consommation quotidienne d'un breuvage riche en polyphénols de fraises et canneberges chez des sujets humains résistants à l'insuline pendant six semaines. Pour quantifier les métabolites circulants de PP, nous avons adapté la méthode de Marti et al. (2010) et celle d'Owens & Abrams (2009) pour mesurer l'ABA plasmatique.

7.3.1. Métabolites de PP

Bien que nous ayons réussi à mesurer 21 métabolites de PP dans le plasma des sujets, seulement quatre ont été retrouvés en quantités significativement différentes dans le groupe expérimental par rapport au groupe contrôle: l'acide *p*-coumarique ($p < 0,0001$), l'acide *m*-coumarique ($p < 0,0001$), l'acide férulique ($p < 0,0001$) et l'acide hydroxyhippurique ($p < 0,0001$).

L'article de Dudonné et al. (2014) constitue l'une des références plus importantes pour discuter de la biodisponibilité des composés phénoliques. En effet, bien que cet article porte sur une étude chez le rat, l'un des traitements employés était le même breuvage expérimental que le nôtre, à base de fraises et de canneberges. Ceci permet d'affirmer que les composés phénoliques natifs consommés sont largement métabolisés après l'ingestion, autant chez les sujets humains que chez les rats. En effet, la plupart des composés phénoliques retrouvés dans le plasma des humains et des souris sont des produits de dégradation microbienne et des métabolites conjugués.

*7.3.1.1. Acide *p*-coumarique*

Concernant l'acide *p*-coumarique, la concentration que nous avons mesurée dans le plasma des sujets humains au cours de notre étude est en accord avec celle mesurée par Dudonné et al. (2014) dans le plasma de rats. En effet, dans les deux études, cette molécule a été détectée en quantités significativement différentes par rapport au groupe contrôle. De plus, elle s'est distinguée comme l'une des molécules les mieux absorbées parmi les acides phénoliques contenus dans le breuvage de fraises et canneberges.

Le profil cinétique de l'acide *p*-coumarique observé dans notre étude chez l'humain est aussi très semblable à celui chez les rats. Ainsi, dans la présente étude et dans l'étude de Dudonné et al. (2014), les pics maximaux de concentration d'acide *p*-coumarique après la consommation du breuvage se retrouvent à 30 minutes. Également, le taux de dégradation d'acide *p*-coumarique est progressif dans les deux études (rats et sujets humains), avec les concentrations minimales se trouvant à 360 minutes. D'autre part, malgré la détection de l'acide chlorogénique dans le breuvage consommé, il n'est plus détecté dans le plasma. Cette absence d'acide chlorogénique plasmatique pourrait être expliquée par son métabolisme microbien en acide *p*-coumarique (Dudonné et al., 2014; Stalmach et al., 2009), ce qui participerait à l'augmentation des taux d'acide *p*-coumarique dans le plasma.

Des études réalisées avec du jus de cassis (Rechner et al., 2002) et du jus de raisins Concord (Stalmach et al., 2012) ont permis de déterminer les pics d'absorption de l'acide *p*-coumarique provenant de sources autres que le breuvage de fraises et canneberges mentionné ci-haut. Les résultats obtenus de ces études sont semblables à ceux rapportés par Dudonné et al. (2014) et aux nôtres. En effet, le pic d'absorption de l'acide *p*-coumarique provenant du jus de cassis a été retrouvé à 60 minutes après consommation chez des sujets humains. Tout en considérant que cette mesure provienne de la première prise sanguine, il est probable que le pic ait été atteint aussi autour de 30 minutes après la prise du jus, comme dans les études ci-haut mentionnées. Quant aux résultats de l'étude de Stalmach et al. (2012), le pic d'absorption de l'acide *p*-coumarique a été atteint à 40 minutes après la consommation du jus de raisins Concord chez des sujets humains. Concernant le taux de

dégradation, les concentrations plus faibles sont trouvées à 360 minutes, comme avec le jus de cassis (Rechner et al., 2002).

Quant à la présence d'acide *p*-coumarique plasmatique, les études de Rechner et al. (2014), Dudonné et al. (2014) et la présente étude s'accordent à dire qu'il est un des acides hydroxycinnamiques les mieux absorbés par rapport aux autres polyphénols consommés dans les breuvages de fruits. En fait, dans l'étude de Rechner et al. (2002), on porte une attention spéciale sur le fait de retrouver des quantités plus importantes d'acides hydroxycinnamiques plasmatiques, dont l'acide *p*-coumarique, que d'anthocyanes, même si la teneur d'anthocyanes est plus importante dans le jus par rapport aux acides hydroxycinnamiques.

Somme toute, l'absorption efficace de l'acide *p*-coumarique rapportée par quelques auteurs (Rechner et al., 2002; Stalmach et al., 2012) suggère une biodisponibilité élevée de cette molécule par rapport aux autres polyphénols. En plus, les courts temps nécessaires pour atteindre les pics maximaux de concentration suggèrent que l'acide *p*-coumarique est rapidement absorbé et libéré dans le tube digestif proximal, comme discuté par Stalmach et al. (2012) et par Dudonné et al. (2014).

7.3.1.2. Acide m-coumarique

Concernant la cinétique de l'acide *m*-coumarique, nos résultats suggèrent une absorption rapide semblable à celle observée avec l'acide *p*-coumarique, c'est-à-dire, un pic d'absorption à temps 30 minutes après la prise du breuvage. Cependant, la teneur d'acide *m*-coumarique a présenté des niveaux plus élevés pendant plus longtemps et son taux de dégradation a été plus progressif par rapport à celui de l'acide *p*-coumarique. Ceci pourrait être interprété comme une absorption en deux étapes: une première étape d'absorption rapide, qui provient probablement de la molécule native identifiée dans le breuvage et une deuxième étape d'absorption à long terme qui provient probablement de la transformation de différents composés en acide *m*-coumarique, notamment composés qui provient du métabolisme microbien (Dudonné et al., 2015; Gonthier et al., 2003).

En effet, dans l'article de Dudonné et al. (2015) les auteurs ont observé que la supplémentation avec un composant probiotique pouvait favoriser la biodisponibilité de composés phénoliques provenant d'un breuvage de canneberges, plus particulièrement à l'augmentation de produits de dégradation microbienne plasmatiques, tels que l'acide *m*-coumarique. Ces résultats suggèrent le rôle des bactéries intestinales dans le métabolisme des composés phénoliques.

Outre le métabolisme microbien, le métabolisme de type II au niveau du foie (conjugation avec des enzymes qui forment composés méthoxylés, glucuronidés et sulfatés) se trouve parmi les processus possiblement impliqués dans la transformation des acides phénoliques comme par exemple, la transformation de l'acide vanillique et d'acide hydroxyphénylpropionique (retrouvé dans le plasma de nos participants) en acide *m*-

coumarique au niveau du foie (Dudonné et al., 2015). Cette conversion de l'acide hydroxyphénylpropionique en acide *m*-coumarique pourrait être aussi expliquée par la dégradation des catéchines contenues dans le breuvage, comme discuté par Gonthier et al. (2003). Cependant, il faut toujours considérer que le niveau de polymérisation de catéchines, telles que les proanthocyanidines de la canneberge pourraient représenter un défi pour ce qui est des processus de dégradation (Gonthier et al., 2003).

Du côté de la biodisponibilité de l'acide *m*-coumarique rapporté dans la littérature, il n'y a pas beaucoup d'information pour discuter nos résultats. Même si l'acide *m*-coumarique a été détecté parfois dans le plasma de sujets, les auteurs soulignent plutôt l'absorption de l'acide *p*-coumarique que celle de l'acide *m*-coumarique comme marqueur de la biodisponibilité des acides hydroxycinnamiques (Feliciano et al., 2016; Gonthier et al., 2003 ; Rechner et al., 2002).

7.3.1.3. Acide férulique

Quant à l'acide férulique, son identification au niveau plasmatique est largement répandue chez les sujets humains, selon les résultats rapportés par plusieurs auteurs (Feliciano et al., 2016; Rechner et al., 2002; Stalmach et al., 2012; Farah et al., 2008) de même que les résultats du présent projet de recherche. Même si notre breuvage contenait une quantité d'acide férulique plus faible ($65 \pm 7 \mu\text{g}/120\text{ml}$) par rapport à la quantité retrouvée d'acide *p*-coumarique ($9095 \pm 171 \mu\text{g}/120 \text{ ml}$), l'AUC plasmatique après la consommation du breuvage est similaire pour les deux acides hydroxycinnamiques ci-haut nommés ($p=0,64$). Ainsi, la cinétique plasmatique de l'acide férulique que nous avons obtenue est semblable à celle de l'acide *p*-coumarique en termes de quantité et de taux de dégradation (Chapitre 4, figure 4.5).

Une même augmentation de la concentration de l'acide férulique plasmatique a été atteinte dans l'étude de Stalmach et al. (2012). En effet, dans le plasma des sujets, les auteurs ont observé des concentrations maximales similaires pour l'acide *p*-coumarique et pour l'acide férulique: 64 nmol/L (acide *p*-coumarique) et 63 nmol/L (acide férulique) même si dans le jus de raisins Concord, se trouve une quantité trois fois plus faible d'acide férulique ($0,4 \mu\text{mol}/350 \text{ ml}$) par rapport à la quantité d'acide *p*-coumarique ($1,9 \mu\text{mol}/350 \text{ ml}$). Les résultats suggèrent donc, une transformation de plusieurs molécules en acide férulique. En effet, quelques études s'accordent à montrer que certains acides phénoliques, tels que l'acide caféique et l'acide *p*-coumarique, peuvent être transformés en acide férulique (Dudonné et al., 2015; Rechner et al., 2002; Stalmach et al., 2012), permettant de considérer l'acide férulique comme un marqueur de la consommation de PP (Monagas et al., 2010; Mosele et al., 2015).

Cependant, chez nos participants, il y a une différence en ce qui concerne le temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale de l'acide férulique par rapport aux temps retrouvés dans la littérature. Le pic d'acide

férulique retrouvé à 30 minutes post-ingestion dans notre étude ne correspond pas aux Tmax des pics retrouvés ailleurs dans la littérature. Par exemple, dans l'étude de Stalmach et al. (2012) le pic de concentration a été trouvé à 1,8 heures après la consommation de 0,4 μmol d'acide férulique/350 ml. Stalmach et al. (2012) considèrent que ce temps correspond à un taux rapide d'apparition dans le système circulatoire. En bref, l'acide férulique a été rapporté comme une molécule d'absorption rapide provenant des molécules natives, mais aussi provenant des produits de dégradation de l'acide caféique (Feliciano et al., 2016; Rechner et al., 2002; Stalmach et al., 2012).

La comparaison de l'acide férulique et l'acide *p*-coumarique provient du fait que ces molécules sont fréquemment mentionnées ensemble pour indiquer qu'elles sont rapidement absorbées sous leur forme native au niveau de l'entérocyte (Ziegler et al., 2016) et que leurs molécules résiduelles sont conjuguées au côlon (Stalmach et al., 2012; Rechner et al., 2002).

7.3.1.4. Acide hydroxyhippurique

Parmi les quatre molécules plasmatiques qui ont été retrouvées en quantités significativement supérieures par rapport au contrôle (Chapitre 4, figure 4.5), seulement l'acide hydroxyhippurique ne se retrouvait pas dans le breuvage. Cette molécule proviendrait vraisemblablement de la dégradation d'autres molécules natives contenues dans le breuvage comme les catéchines, l'acide hydroxybenzoïque, l'acide caféique, l'acide vanillique et l'acide chlorogénique (Feliciano et al., 2016; Scalbert et Williamson, 2000).

Il est à noter qu'après tous ces procédés de dégradation, les concentrations plasmatiques les plus élevées retrouvées dans le plasma de nos participants correspondent justement à celles de l'acide hydroxyhippurique. En effet, la concentration moyenne maximale d'acide hydroxyhippurique est de 9809,7 $\mu\text{g/l}$, tandis que les concentrations moyennes maximales d'acide *p*-coumarique, *m*-coumarique et d'acide férulique sont plus faibles (1347 $\mu\text{g/l}$, 3253 $\mu\text{g/l}$ et 1319 $\mu\text{g/l}$). Ceci est en accord avec les résultats de Feliciano et al., 2016. Dans cette étude chez l'humain, les auteurs ont aussi employé les canneberges comme source de polyphénols et ils ont rapporté une prédominance au plasma de composés phénoliques de petite taille, tel que l'acide alpha-hydroxyhippurique.

De son côté, la cinétique de l'acide hydroxyhippurique présente un pic qui se retrouve aussi tôt qu'à 30 minutes après l'ingestion du breuvage expérimental, ce qui suggère une fois de plus une absorption et un métabolisme rapides de cette molécule, comme pour les acides phénoliques mentionnés ci-dessus. Cependant, contrairement à ce qui se passe avec l'acide *p*-coumarique et l'acide férulique, la cinétique de l'acide hydroxyhippurique s'étire sur une période de temps plus longue. Il est à noter que ces résultats sont en accord

avec ceux observés par l'équipe de Feliciano (Feliciano et al., 2016a). Ces auteurs ont observé que la cinétique des acides hippuriques présente un pic de concentration rapide avec un taux de dégradation peu prononcé.

Le taux de dégradation progressif suggère une transformation continue d'autres molécules plasmatiques en acide hydroxyhippurique, par exemple à partir d'acide dihydroxyphénylpropionique, d'acide hydroxyphénylpropionique, d'acide dihydroxyphénylacétique, d'acide hydroxyphénylacétique et d'acide benzoïque (Dudonné et al., 2015; Rechner et al., 2002; Feliciano et al., 2016a).

D'ailleurs, en supposant que la dégradation de ces acides en acide hydroxyhippurique se fait par les microorganismes du côlon (Rechner et al., 2002; Clifford et al., 2000), il est possible aussi que la disparité de la teneur en acide hydroxyhippurique provienne d'une différente composition du microbiote intestinal chez les participants qui avaient pris le breuvage expérimental depuis 30 jours. Des résultats semblables ont été rapportés par Feliciano et al. (2016b) qui ont comparé la concentration plasmatique des métabolites de polyphénols deux heures après avoir consommé 11g de poudre lyophilisée de bleuets (consommation aiguë) par rapport à la concentration plasmatique résultante d'une consommation quotidienne pendant 30 jours de la même poudre (consommation chronique). Ainsi, après avoir comparé les concentrations d'acides hippuriques lors de la consommation aiguë (4,8%) versus la concentration lors de la consommation chronique (85,5%), les auteurs mentionnent que la consommation chronique de bleuets semble avoir mené à un changement modéré de la composition du microbiote intestinal et de la capacité métabolique de certains enzymes.

Malgré la grande quantité et la variété de flavonoïdes contenus dans l'extrait de fraises et de canneberges, ce sont les acides phénoliques qui se trouvent en plus grande concentration dans le plasma après la consommation du breuvage. Dans la présente étude, nous avons observé chez nos participants un pourcentage moyen d'absorption de polyphénols de 8,1% après la prise orale du breuvage de fraises et canneberges. Ce faible taux d'absorption est en accord avec les pourcentages d'absorption rapportés par d'autres auteurs qui estiment que seulement 5 à 10% du total de la consommation de polyphénols est absorbé dans l'intestin grêle et le reste (90-95%) s'accumule dans le gros intestin (Cardona et al., 2013; Saura-Calixto et al., 2007). En effet, les polyphénols ont une faible biodisponibilité (Dudonné et al., 2014; Scheepens et al., 2010), car le degré de biodisponibilité dépend largement du niveau de polymérisation de la molécule consommée (Cardona et al., 2013; Gonthier et al., 2003). C'est la raison pour laquelle ce sont les molécules moins grandes qui se retrouvent en plus grande quantité dans le plasma des sujets participant dans la présente étude.

Plusieurs travaux de recherche ont démontré des effets bénéfiques des polyphénols obtenus par l'action de ses métabolites *in vitro* ou par injection. Cependant, il est plus rare de pouvoir démontrer des effets bénéfiques obtenus par la prise orale de ces molécules puisqu'elles ont une faible biodisponibilité (Dudonné et al., 2014;

Scheepens et al., 2010). Ceci a suscité l'étude de l'effet bénéfique des polyphénols grâce aux transformations qu'ils provoquent dans le microbiote intestinal (Anhê et al., 2015; Cardona et al., 2013; Marin et al., 2015).

7.3.2. Métabolites d'ABA

En termes de biodisponibilité de l'ABA, très peu de résultats ont été publiés. Les résultats publiés concernant la biodisponibilité de l'ABA comprennent uniquement l'extraction et le dosage du *cis*-ABA (Magnone et al., 2016). En fait, la présente étude représente la seule étude qui considère les métabolites d'ABA pour l'analyse de leur biodisponibilité. Cependant, parmi les sept molécules d'ABA détectées dans le plasma, seulement trois ont été retrouvées en quantités significativement supérieures chez le groupe traité par rapport au groupe contrôle. Ce sont le *cis*-ABA, l'acide dihydroxyphaséique (DPA) et l'ABA glucuronide.

7.3.2.1. *cis*-ABA

Il est à noter que le breuvage contrôle n'a pas présenté une concentration détectable d'ABA (tableau 6.4). Nous en retrouvons cependant dans le plasma des sujets qui ont pris le breuvage contrôle (tableau 6.7). Il est peu probable que ces molécules d'ABA proviennent d'une consommation antérieure puisque nos résultats révèlent que la concentration plasmatique d'ABA était de 0 nM à 360 minutes après avoir consommé le breuvage PFC (source exogène d'ABA) (Figure 6.1). De plus, nos participants étaient à jeun depuis 12 heures le jour de l'intervention. Il est à noter que la cinétique plasmatique de l'ABA provenant de sources exogènes n'a pas été encore étudiée à ce jour.

Ce résultat pourrait être plutôt expliqué par une sécrétion endogène d'ABA chez ces sujets, car une sécrétion endogène d'ABA a été déjà rapportée dans deux études (Ameri et al., 2015; Bruzzone et al., 2012a) en réponse à une stimulation orale exogène, plus spécifiquement, en réponse au test oral de tolérance au glucose (OGTT).

Il est important de souligner que le pic de *cis*-ABA trouvé après la consommation du breuvage n'est pas en accord avec la littérature. En effet, nous avons rapporté un pic de concentration 30 minutes après consommation du breuvage de fraises et canneberges (2,5 µg d'ABA), tandis que Magnone et al. (2015) ont observé le pic de concentration plutôt 60 minutes après la consommation de 135 g d'apricots frais (43,5 µg d'ABA). Ceci suggère que le taux d'absorption et les pics d'ABA varient en fonction de la matrice alimentaire. Ainsi l'ABA provenant d'un aliment liquide est absorbée plus rapidement que l'ABA provenant d'un aliment solide. Ils ont également observé des pics plus rapides en consommant la source d'ABA toute seule (à 60 minutes) et des pics d'ABA retardés avec l'inclusion d'autres aliments avec la source d'ABA (120 et 240 minutes). Étant donné la faible dose d'ABA fournie à nos participants par rapport à la dose de Magnone, il n'y a pas des comparaisons possibles entre les taux atteints d'ABA.

7.3.2.2. Acide phaséique

En ce qui concerne la concentration plasmatique d'acide phaséique (PA), il n'y a pas une différence entre les deux groupes à l'étude ($p=0,27$). De plus, la concentration de cette molécule au temps zéro (avant la consommation du breuvage) était de 0,0 nM, tandis que le pic de concentration était trouvé à 240 minutes après la consommation du breuvage et finalement, les valeurs moyennes trouvées à 360 minutes étaient encore élevées (26,2 nM groupe SCP et 23,3 nM groupe contrôle). Le manque de différence dans la concentration retrouvée entre les deux groupes ainsi que dans les cinétiques obtenues font spéculer sur l'origine de ce PA. Néanmoins, il est évident qu'il ne provient pas de la diète, car les sujets étaient à jeun et les concentrations initiales de PA étaient de 0,0 nM. Donc, il reste à penser qu'il provient du métabolisme de quelques ingrédients contenus dans les deux breuvages, malgré le fait que le PA proviendrait uniquement du catabolisme d'ABA (Cutler et Krochko, 1999; Nambara et al., 2005). Ainsi, il reste à comprendre pour quelle raison nous retrouvons des quantités significativement différentes d'ABA plasmatique en même temps que des quantités non significativement différentes de PA plasmatique.

7.3.2.3. Acide dihydroxyphaséique

Par contre, la concentration plasmatique de l'acide dihydroxyphaséique (DPA) est significativement différente entre les deux groupes ($p=0,002$). Ce résultat est intéressant tout en considérant les voies de conversion d'ABA à PA à DPA. En effet, une des principales voies du catabolisme d'ABA est l'hydroxylation par l'action d'une enzyme cytochrome P450 monooxygénase qui agit sur la position 8'. Cette réaction transforme l'ABA en un composé instable : le 8' hydroxy-acide abscissique (8'-OH-ABA). Le manque de stabilité provoque que le 8'-OH-ABA soit réarrangé spontanément en acide phaséique (PA). Cette molécule est métabolisée ultérieurement par l'action d'une réductase soluble (enzyme cytoplasmique) en acide dihydroxyphaséique (DPA) (Cutler et Krochko, 1999; Zeevaart, 1999; Nambara et al., 2005; Piotrowska et al., 2011). Il serait intéressant de comprendre la probable participation du microbiote intestinal dans la transformation d'ABA en DPA au niveau du côlon. Les arguments qui pourraient soutenir cette hypothèse concernent la différence significative retrouvée aux concentrations d'ABA et de DPA en contraste avec l'absence de différence significative dans les produits intermédiaires de cette réaction (PA, $p=0,27$), de même que les récentes évidences de la modulation du microbiote intestinal par la consommation de polyphénols (Anhê et al., 2015; Cardona et al., 2013; Marín et al., 2015).

Bref, nos cinétiques d'ABA et de DPA permettent d'observer que lorsque la concentration d'ABA diminue, le niveau de concentration de DPA augmente, notamment à cause du catabolisme d'ABA. Il faut dire qu'une même tendance s'observe chez les plantes; en effet, lors de l'imbibition de la graine il y a une diminution des niveaux d'ABA ainsi qu'une augmentation concomitante de la concentration du PA et de DPA (Nambara et al., 2005). Il faut considérer que l'hydroxylation de la molécule à la position 8' constitue le mécanisme d'inactivation plus

importante de l'ABA chez les plantes (Zheng et al., 2015). Donc, le DPA qui en résulte est considéré comme un catabolite inactif de l'ABA.

7.3.2.4. Autres métabolites de l'ABA

Malgré que le PA, le 7'-OH-ABA, l'ABA-GE et le néo-PA n'aient pas été retrouvés en concentrations significativement différentes entre les deux groupes à l'étude, l'identification de ces molécules reste intéressante, car elles ont été identifiées chez l'humain pour la première fois dans notre projet. Ainsi, il importe de décrire les molécules identifiées dans le plasma, tout en considérant que l'information disponible fait référence aux processus de transformation de la molécule d'ABA chez les organismes végétaux, notamment les plantes.

La littérature s'accorde à dire que le glucosyl ester d'acide abscissique (ABA-GE) est considéré comme le conjugué d'ABA plus répandu; il a été de même impliqué dans le transport de l'ABA et sa conjugaison est irréversible. De son côté, le 7'-hydroxy ABA est l'un de catabolites mineurs de l'ABA chez les plantes, il est produit à partir du (+)-ABA par l'action d'une enzyme 7'-hydroxylase (Cutler et al., 1999; Zeevaart, 1999). Finalement, le *néo*-acide phaséique (*néo*-PA) est un produit du catabolisme de l'ABA. Il est l'isomère du 9'-hydroxy ABA, néanmoins il manque encore des études pour connaître sa voie de transformation (Nambara et al., 2005; Zeevaart, 1999). Il faut ajouter que le PA et le 7'-hydroxy ABA ont démontré une activité hormonale semblable à celle du *cis*-ABA.

7.4. Quatrième objectif spécifique

Objectif spécifique: Établir des relations entre les teneurs en métabolites des PP et d'ABA avec différents paramètres du métabolisme du glucose (GDR, M/I, glycémie, insulinémie, C-peptide, lipides, marqueurs inflammatoires).

Hypothèse liée à cet objectif: Il y a une relation positive entre les teneurs sanguines en certains métabolites des polyphénols et en acide abscissique et l'amélioration de la sensibilité à l'insuline de ces sujets.

Des études *in vitro*, chez l'animal et chez l'humain ont montré une amélioration de la sensibilité à l'insuline par la consommation des aliments riches en polyphénols (Anhê et al., 2015; Hokayem et al., 2013; Stull et al., 2010). Cependant, il reste encore à comprendre les divers mécanismes d'action des polyphénols. Ainsi, nous nous sommes attardés à étudier la relation entre la biodisponibilité des métabolites de PP et d'ABA avec amélioration de la sensibilité à l'insuline observée lors de l'étude Glucophéno (Paquette et al., accepté pour publication, chapitre 4). En examinant cette relation, nous avons tenté de détecter des molécules contenues dans l'extrait

de fraises et canneberges responsables de ces bénéfices chez un sous-groupe de cette étude. Cependant, il est nécessaire de préciser que les effets significatifs retrouvés dans la grande étude sur le *M/I* n'étaient pas observés lors de la sous-étude de biodisponibilité. Cela pourrait être expliqué par le manque de puissance de l'échantillon dans la sous-étude par rapport à l'étude Glucophénol.

Du côté des bénéfices à la santé et la prévention du diabète, il est bien connu que les fraises comme les canneberges y jouent un rôle. En effet, différentes études confirment les propriétés antidiabétiques obtenues par la consommation de fraises, plus particulièrement la diminution de la glycémie chez un groupe de souris supplémentées avec une poudre de fraises par rapport au groupe non supplémenté (Pareiman et al., 2012). Également, Giampieri et al. (2015) ont rapporté un effet anti-inflammatoire par la diminution du NF- κ B (diminution de la réponse au stress cellulaire). D'autres effets ont été observés, tels que la régulation de l'état d'hyperglycémie postprandiale par le contrôle des enzymes digestives des glucides et des lipides (Giampieri et al., 2015).

En ce qui concerne les canneberges, un travail chez des souris a corroboré que la consommation de polyphénols de ce fruit peut avoir un effet pour réduire la glycémie grâce à une modulation de la sensibilité à l'insuline et non pas à une stimulation de la sécrétion d'insuline (Kim et al., 2013). D'ailleurs, un travail récent d'Anhê et ses collaborateurs a confirmé aussi que la consommation de polyphénols issus de canneberges contribue à améliorer la sensibilité à l'insuline de souris nourries avec une diète riche en gras et riche en saccharose (mesurée par HOMA-IR) ainsi qu'à diminuer les niveaux d'hyperinsulinémie lors d'un OGTT. De plus, l'apport de canneberges a contribué aussi à réduire l'inflammation des tissus hépatiques et intestinaux (Anhê et al., 2015). Les auteurs ont corroboré que les métabolites de PP qui s'accumulent dans le côlon comprennent spécialement les formes polymériques telles que les proanthocyanidines (métabolites de polyphénols de grande taille qui proviennent du flavan-3-ols). Ces molécules ont montré leur capacité à réagir avec les protéines et les polysaccharides une fois qu'elles sont accumulées dans l'intestin. Ainsi, le mode d'action qui occupe la place de choix en ce qui concerne l'amélioration de la sensibilité à l'insuline est la modulation du microbiote, comme le citent Anhê et al. (2015).

De même, une étude chez l'humain a permis de corroborer l'effet antidiabétique de la canneberge. Novotny et al. (2015) ont observé que la consommation quotidienne pendant 8 semaines de 346 mg de PP (provenant du jus de canneberge) favorise la réduction des niveaux de glycémie à jeun (Novotny et al., 2015). Dans la même étude, il a été observé une diminution de la résistance à l'insuline selon les résultats du modèle d'évaluation de l'homéostasie (HOMA-IR) et ce, uniquement chez les sujets avec un niveau élevé de résistance à l'insuline au début de l'étude (Novotny et al., 2015).

Au début de la présente étude, nous avons détecté les molécules plasmatiques plus abondantes provenant de la consommation du breuvage de fraises et canneberges. Nous avons effectué une étude de biodisponibilité révélant que les PP les plus abondants dans le plasma après la consommation du breuvage sont l'acide *p*-coumarique, l'acide *m*-coumarique, l'acide férulique et l'acide hydroxyhippurique. Concernant l'ABA, l'étude a démontré que le *cis*-ABA, le DPA et l'ABA glucuronide sont les métabolites de l'ABA retrouvés en plus grande quantité dans le plasma.

Ensuite, nous avons effectué une régression robuste pour étudier la relation entre les métabolites des PP et d'ABA avec différents paramètres du métabolisme du glucose. Ceci nous a permis d'évaluer le degré d'association entre les changements observés de la sensibilité à l'insuline et des paramètres associés avec la présence de certains métabolites de PP et d'ABA, notamment les métabolites montrant une teneur significativement différente entre les sujets du groupe expérimental et ceux du groupe contrôle.

Les résultats de la présente étude de biodisponibilité suggèrent que la concentration d'acide *p*-coumarique atteinte durant les 30 premières minutes après la consommation du breuvage pourrait être reliée avec la prévention d'une augmentation de la sécrétion de C-peptide pendant la première phase de la réponse à l'OGTT ($p=0,0046$, $r=0,34$). Ces résultats sont en accord avec ceux de Yoon et al. (2013) qui ont trouvé une amélioration du métabolisme du glucose des cellules L6 (*in vitro*) grâce à la stimulation de la phosphorylation de la protéine adénosine monophosphate kinase activée AMP (AMPK) en présence de l'acide *p*-coumarique.

En effet, l'AMPK a été récemment identifiée comme l'un des principaux régulateurs métaboliques capables de promouvoir l'utilisation du glucose par les muscles, la sensibilité à l'insuline et l'oxydation des acides gras dans le muscle et le cœur aussi. De même, l'AMPK a montré des propriétés à inhiber la synthèse d'acides gras (Coughlan et al., 2014). D'ailleurs, l'étude de Prabhakar et al. (2011) a suggéré que l'acide *p*-coumarique contribue aussi à améliorer l'utilisation du glucose *in vitro* en interaction avec un médicament hypoglycémiant commercial (thiazolidinedione) (Prabhakar et al., 2011).

Ainsi, l'hypothèse correspondant à cet objectif a été partiellement confirmée, car, selon les résultats de notre régression, l'acide *p*-coumarique pourrait être relié à la prévention de l'état d'hyperinsulinémie compensatoire. Tout en considérant que l'acide *m*-coumarique, l'acide férulique et l'acide hydroxyhippurique ont été retrouvés en quantités significativement différentes dans le plasma de nos sujets traités par rapport aux sujets contrôle, il est intéressant de chercher dans la littérature des liens concernant la consommation de ces acides et les bénéfices du métabolisme du glucose qui en résultent.

Du côté de l'acide férulique, nous n'avons retrouvé aucune relation entre sa concentration dans le plasma et les paramètres mesurés du métabolisme du glucose. Ces résultats sont surprenants puisque des études ont

observé une participation de cette molécule pour améliorer la sensibilité à l'insuline, par exemple, chez un groupe de rats diabétiques nourris à une diète riche en gras et en glucides (Narasimhan et al., 2015; Senaphan et al., 2015). De même, dans une étude *in vitro*, l'acide férulique a contribué à prévenir la résistance à l'insuline induite par une consommation de lipides (Gogoi et al., 2014). L'étude de Prabhakar et al. (2011) suggère que l'acide férulique favorise l'utilisation du glucose *in vitro* et chez un groupe de rats diabétiques grâce à une interaction synergique avec des médicaments hypoglycémifiants (Prabhakar et al., 2011). Une autre étude chez des souris a montré que l'administration orale d'acide férulique pendant 17 jours favorisait la diminution des niveaux du glucose plasmatique ainsi que l'augmentation des niveaux d'insuline. Concernant la diminution du risque cardiométabolique, ce groupe de souris a également montré une diminution de la concentration de cholestérol total et de lipoprotéines de basse densité (Jung et al., 2007). Cependant, les études mentionnées ont été réalisées *in vitro* ou suite à une supplémentation d'acide férulique, ce qui n'est pas le cas de notre étude.

Pour les autres acides plasmatiques, nous n'avons pas observé de relations suggérant leur rôle dans l'homéostasie du glucose. En effet, du côté de l'acide hydroxyhypurique, l'information disponible dans la littérature concerne plutôt son taux d'élimination, qui est considéré comme un marqueur de la présence d'une maladie comme le diabète (Lees et al., 2013), alors que l'information disponible sur l'acide *m*-coumarique porte sur son effet inhibiteur de la lipogenèse dans les adipocytes 3T3-L1.

Quant aux paramètres lipidiques et inflammatoires, nous considérons que le manque d'effet observé sur ceux-ci dans notre étude pourrait être expliqué soit par l'absence de fibres fermentescibles dans notre source de polyphénols ou par la faible quantité de polyphénols fournie aux participants par rapport aux autres études ici mentionnées (Basu et al., 2009; Ellis et al., 2011; Lee et al., 2008; Moazen et al., 2013; Ruel et al., 2008; Simão et al., 2013; Zunino et al., 2012).

Chapitre 8 : Conclusion générale

La consommation d'un breuvage riche en PP et en ABA formulé à partir d'un extrait provenant de fraises Authentique Orléans et de canneberges du Québec favorise une hausse plasmatique de la teneur en métabolites de PP et d'ABA. De son côté, les PAC sont les molécules plus abondantes contenues dans les deux fruits employés pour la formulation du breuvage expérimental (SCP), cependant ces molécules ne possèdent pas un niveau élevé de biodisponibilité à cause de leur grande taille. Ainsi, les molécules qui apparaissent dans le plasma des participants sont principalement des produits de dégradation microbienne et des métabolites de polyphénols conjugués. Ceci suggère que les molécules consommées sont fortement métabolisées pour les rendre disponibles. D'un autre côté, il est intéressant de noter que l'acide *p*-coumarique est la molécule native retrouvée en quantités importantes autant dans le breuvage que dans le plasma. Du côté de l'ABA, ce sont plutôt les formes *cis*-ABA, DPA et ABA glucuronide qui sont retrouvées dans le plasma, dont les deux dernières sont reconnues comme produits de dégradation de l'ABA (catabolites inactifs de l'ABA). Ceci suggère qu'une bonne quantité d'ABA est utilisée et inactivée par la suite.

Suite à la réalisation de l'étude de corrélation, nous avons observé que seule la teneur plasmatique en acide *p*-coumarique pourrait être associée avec la prévention de l'hyperinsulinémie compensatoire à la première phase de sécrétion d'insuline. Ainsi, la relation négative entre la présence de l'acide *p*-coumarique et la sécrétion d'insuline suggère que cet acide organique serait impliqué dans le métabolisme du glucose chez des sujets résistants à l'insuline qui n'utilisent pas des médicaments affectant le métabolisme du glucose ou des lipides.

À partir de ces résultats, il est opportun d'entreprendre plusieurs études sur le domaine de la biodisponibilité de PP et d'ABA de sources exogènes en relation avec la prévention du diabète de type 2 grâce à la consommation des molécules spécifiques contenues dans les matrices alimentaires, notamment des études avec une approche méthodologique qui permet d'étudier les mécanismes précis d'action des PP et d'ABA (*foodomics*).

8.1. Forces et limites de l'étude

8.1.1. Forces de l'étude

La présente étude de biodisponibilité fait partie d'une plus grande étude dont les conditions expérimentales sont bien décrites, ce qui représente une force majeure de l'étude, de même que le fait d'être une étude chez l'humain. De plus, le caractère novateur de la recherche constitue aussi une force de la présente étude, notamment le volet qui porte sur la biodisponibilité de l'ABA de sources exogènes et l'étude des métabolites de PP spécifiques pour agir sur le métabolisme du glucose.

Il est important de mentionner que la première étude qui a analysé la biodisponibilité de l'ABA chez l'humain consistait à mesurer les niveaux plasmatiques seulement d'ABA après la consommation orale de 135 g d'abricot (fruit riche en ABA). Quant à la présente étude, elle est la première à étudier la biodisponibilité des métabolites d'ABA chez l'humain. D'ailleurs, la méthode d'extraction et de quantification de toutes les molécules a été faite en employant des standards spécifiques pour chaque molécule (sauf l'ABA Glucuronide) ainsi que de technologie à hauts niveaux de performance, ce qui a permis de faire des identifications plus précises.

Il est important d'employer des doses facilement atteignables dans l'alimentation humaine dans le cadre des études qui mesurent les effets santé de la consommation des aliments. Ainsi, l'une des forces de la présente étude est la quantité accessible de fruits employés (environ 112g de fruits frais) pour produire l'extrait riche en polyphénols. Concernant les fruits inclus dans la préparation du breuvage, le mélange de fraises et canneberges a été employé pour tirer profit des combinaisons originale et synergique des polyphénols contenus dans chaque fruit. Enfin, comme autre force de l'étude, le breuvage de fraises et canneberges pourrait constituer un moyen accessible pour améliorer le profil métabolique d'individus à risque de DT2.

8.1.2. Limites de l'étude

La limite la plus importante de l'étude concerne la prise des échantillons sanguins. En effet, il aurait été préférable de rapprocher les périodes de prélèvements sanguins de l'étude de biodisponibilité avec ceux des clamps et des OGTT pour mieux corréliser la présence des métabolites de PP et d'ABA avec les changements physiologiques observés. Cependant, compte tenu de la grande quantité de sang nécessaire pour toutes les analyses et les enjeux éthiques qui en résultent, les échantillons sanguins n'ont pas pu être prélevés à des intervalles plus rapprochés.

Il faut mentionner que la petite taille de l'échantillon constitue aussi une limite de l'étude. L'inclusion de seulement 17 sujets restreint la puissance statistique de l'étude en nous empêchant d'observer plus d'effets significatifs entre la teneur en métabolites de PP et d'ABA avec les différents paramètres reliés au métabolisme du glucose, la concentration de lipides et de paramètres inflammatoires. Ainsi cette approche méthodologique est de caractère exploratoire étant donné la taille de l'échantillon et le moment de la prise des prélèvements sanguins. De plus, le fait de ne pas pouvoir étudier les effets directs des métabolites de PP et d'ABA plasmatiques sur le métabolisme de glucose provient du manque de spécificité de l'approche. En effet, la présente étude représente une étude métabolomique non ciblée, qui a été employée aussi par d'autres auteurs tels qu'Aaby et al. (2012), Giampieri et al. (2015) et Karlund et al. (2015). Cette approche sert à identifier

plusieurs métabolites (des polyphénols et de l'ABA) en simultané dans le plasma et par la suite, à élaborer des hypothèses et à préciser des avenues de recherche plus ciblées.

8.1.3. Perspectives

La présente étude constitue une analyse pour établir des corrélations entre les différents métabolites de PP et d'ABA circulantes avec une réponse physiologique, notamment l'amélioration de l'homéostasie du glucose. Ainsi, à l'avenir, à la lumière des pistes obtenues dans la présente étude sur la biodisponibilité des polyphénols et de l'ABA provenant d'un extrait de fraises et de canneberges, il serait judicieux d'entreprendre des études pour étudier les mécanismes d'action des métabolites spécifiques des PP et de l'ABA sur divers paramètres du métabolisme du glucose. En effet, la présente étude a suggéré une participation de l'acide *p*-coumarique dans la prévention de l'hyperinsulinémie compensatoire. Afin de confirmer cet effet de l'acide *p*-coumarique, on pourrait donner des capsules de cette molécule à des sujets humains selon la même dose que dans la présente étude, et étudier l'action spécifique de cet acide sur la sécrétion d'insuline.

Outre l'acide *p*-coumarique, il est possible que certains métabolites de PP et d'ABA participent favorablement au métabolisme du glucose, notamment les métabolites trouvés en plus grandes concentrations: l'acide férulique, l'acide *m*-coumarique, l'acide hydroxyhippurique, l'acide dihydroxyphaséique (DPA) et l'ABA glucuronid . Il faudrait donc considérer ces molécules pour des études de cause à effet.

Compte tenu du manque de standard pour valider sa quantification dans la présente étude et aussi pour confirmer si la molécule d'ABA subit une glucuronidation, il est important d'envisager, pour l'avenir, des études qui permettent de confirmer l'identification de cette molécule, même si elle est une molécule produite de forme endogène chez les mammifères. Concernant l'importante concentration d'acide abscissique glucuronid  retrouvée dans le plasma, il pourrait s'agir d'un mode d'inactivation de l'hormone autocrine dans l'organisme humain. De même, il faudrait continuer à développer des études qui permettent d'approfondir la connaissance de l'ABA chez les mammifères, autant du côté de l'ABA endogène que d'ABA exogène. Par exemple, il pourrait être intéressant d'étudier la différence de la concentration d'ABA plasmatique chez les sujets qui ont répondu au traitement par rapport à ceux qui n'ont pas répondu et vérifier s'il existe un modèle spécifique de réponse.

Il serait intéressant aussi d'envisager des études avec une approche métabolomique ciblée, c'est-à-dire étudier plusieurs classes ou plusieurs composés d'une même classe de métabolites en relation avec des paramètres du métabolisme du glucose, tel que Iba ez et al. (2012) ont fait pour évaluer la participation de polyphénols contre le cancer de côlon (Iba ez et al., 2012).

Finalement, on pourrait évaluer l'impact de l'extrait de fraises et canneberges sur le métabolisme du glucose chez des sujets atteints de diabète de type 2. Même si ces personnes produisent une faible quantité d'insuline, il serait utile de vérifier si cet extrait riche en polyphénols peut améliorer la sensibilité des cellules à l'insuline et favoriser une hausse de la première phase de sécrétion d'insuline.

Références des chapitres 1, 2, 3, 5, 6, 7 et 8

Aaby K, Ekeberg D, Skrede G. (2007) Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.* 55(11): 4395-406.

Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. (2006) Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care.* 29(5): 1130-9.

Adams LS, Zhang Y, Seeram NP, Heber D, Chen S. (2010) Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro. *Cancer Prev Res.* 3(1): 108-14.

Aguiree F, Brown A, Cho NH, Dahlquist G, Dodd S, Dunning T. (2013) *IDF Diabetes Atlas: sixth edition.* International Diabetes Federation (Basel, Switzerland).

Ahmed N. (2005) Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 67(1): 3-21.

Ahrén B, Pacini G. (2004) Importance of quantifying insulin secretion in relation to insulin sensitivity to accurately assess beta cell function in clinical studies. *Eur J Endocrinol.* 150(2): 97-104.

Akula R, Ravishankar GA. (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav.* 6(11): 1720-31.

Al-Shalmani S, Suri S, Hughes DA, Kroon PA, Needs PW, Taylor MA, et al. (2011) Quercetin and its principal metabolites, but not myricetin, oppose lipopolysaccharide-induced hyporesponsiveness of the porcine isolated coronary artery. *Br J Pharmacol.* 162(7): 1485-97.

Alberti KG, Zimmet PZ. (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 15(7): 539-53.

Ameri P, Bruzzone S, Mannino E, Sociali G, Andraghetti G, Salis A, et al. (2015) Impaired increase of plasma abscisic acid in response to oral glucose load in type 2 diabetes and in gestational diabetes. *PloS One*. 10(2):e0115992.

American Diabetes Association. (2012) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 35(S1): S64-71.

Andersson S, Ekman I, Friberg F, Bog-Hansen E, Lindblad U. (2013) The association between self-reported lack of sleep, low vitality and impaired glucose tolerance: a Swedish cross-sectional study. *BMC Public Health*. 13(1): 1-8.

Anhê FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, Varin T V, et al. (2015). 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.

Antuna-Puente B, Disse E, Rabasa-Lhoret R, Laville M, Capeau J, Bastard JP. (2011) How can we measure insulin sensitivity/resistance? *Diabetes Metab*. 37(3):179-88.

Appeldoorn MM, Vincken JP, Aura AM, Hollman PC, Gruppen H. (2009) Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl) acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone as the major metabolites. *J Agric Food Chem*. 57(3): 1084-92.

Aronoff S, Berkowitz K, Shreiner B, Want L. (2004) Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectr*. 17(3): 183-90.

Ashton Acton A. (2013) *Advances in proinsulin research and application: 2013 edition*. Scholarly Editions. (Atlanta, USA).

Baggio LL, Drucker DJ. (2007) Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 132(6): 2131-57.

Balasubashini MS, Rukkumani R, Menon VP. (2003) Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats. *Acta diabetol*. 40(3): 118-22.

Balzer J, Rassaf T, Heiss C, Kleinbongard P, Lauer T, Merx M, et al. (2008) Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients: a double-masked, randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol.* 51(22): 2141-9.

Bassaganya-Riera J, Skoneczka J, Kingston DJ, Krishnan A, Misyak SA, Guri AJ, et al. (2010) Mechanisms of action and medicinal applications of abscisic acid. *Curr Med Chem.* 17(5): 467-78.

Basu A, Nguyen A, Betts NM, Lyons TJ. (2014) Strawberry as a functional food: an evidence-based review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 54(6): 790-806.

Basu A, Wilkinson M, Penugonda K, Simmons B, Betts NM, Lyons TJ. (2009) Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. *Nutr J.* 8: 43.

Bergman, M. (2013) Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine.* 43(3): 504-13.

Bermúdez V, Bermúdez F, Arraiz N, Leal E, Linares S, Mengual E, et al. (2007) Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos venezolanos de Farmacología y Terapéutica.* 26(2): 76-86.

Bertoncelj J, Polak T, Kropf Uka, Koroslec M, Golob T. (2011) LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. *Food Chem.* 127(1): 296-302.

Bialonska D, Kasimsetty SG, Khan SI, Ferreira D. (2009) Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *J Agric Food Chem.* 57(21): 10181-86.

Bodrato N, Franco L, Fresia C, Guida L, Usai C, Salis A, et al. (2009) Abscisic acid activates the murine microglial cell line N9 through the second messenger cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem.* 284(22): 14777-787.

Boesch-Saadatmandi C, Loboda A, Wagner AE, Stachurska A, Jozkowicz A, Dulak J, et al. (2011) Effect of quercetin and its metabolites iso-rhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. *J Nutr Biochem.* 22(3): 293–99.

Borges G, Degeneve A, Mullen W, Crozier A. (2010) Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in blackcurrants, blue-berries, raspberries, redcurrants and cranberries. *J Agric Food Chem.* 58(7): 3901-09.

Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, et al. (2011) Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr.* 106(3): 383-9.

Brown AL, Lane J, Coverly J, Stocks J, Jackson S, Stephen A, et al. (2009) Effects of dietary supplementation with the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on insulin resistance and associated metabolic risk factors: randomized controlled trial. *Br J Nutr.* 101(6): 886-94.

Bruzzone S, Ameri P, Briatore L, Mannino E, Basile G, Andraghetti G, et al. (2012a) The plant hormone abscisic acid increases in human plasma after hyperglycemia and stimulates glucose consumption by adipocytes and myoblasts. *FASEB J.* 26(3): 1251–60.

Bruzzone S, Basile G, Mannino E, Sturla L, Magnone M, Grozio A, et al. (2012b) Autocrine abscisic acid mediates the UV-B-induced inflammatory response in human granulocytes and keratinocytes. *J Cell Physiol.* 227(6): 2502-10.

Bruzzone S, Battaglia F, Mannino E, Parodi A, Fruscione F, Basile G, et al. (2012c) Abscisic acid ameliorates the systemic sclerosis fibroblast phenotype *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 422(1): 70–4.

Bruzzone S, Bodrato N, Usai C, Guida L, Moreschi I, Nano R, et al. (2008) Abscisic acid is an endogenous stimulator of insulin release from human pancreatic islets with cyclic ADP ribose as second messenger. *J Biol Chem.* 283(47): 32188-97.

Bruzzone S, Magnone M, Mannino E, Sociali G, Sturla L, Fresia C, et al. (2015) Abscisic acid stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from I-cells and its oral administration increases plasma glucagon-like peptide-1 levels in rats. *PLoS One.* 10(10): e0140588.

Bruzzone S, Moreschi I, Usai C, Guida L, Damonte G, Salis A, et al. (2007). Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(14): 5759–64.

Buijsse B, Weikert C, Drogan D, Bergmann M, Boeing H. (2010) Chocolate consumption in relation to blood pressure and risk of cardiovascular disease in German adults. *Eur Heart J*. 31(13): 1616-23.

Buran TJ, Sandhu AK, Azeredo AM, Bent AH, Williamson JG, Gu L. (2012) Effects of exogenous abscisic acid on fruit quality, antioxidant capacities, and phytochemical contents of southern high bush blueberries. *Food Chem*. 132(3): 1375-81.

Burton-Freeman B, Linares A, Hyson D, Kappagoda T. (2010) Strawberry modulates LDL oxidation and postprandial lipemia in response to high-fat meal in overweight hyperlipidemic men and women. *J Am Coll Nutr*. 29(1): 46-54.

Cerdá B, Tomás-Barberán FA, Espín JC. (2005) 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(2): 227–35.

Chen L, Tuo B, Dong H. (2016) Regulation of intestinal glucose absorption by ion channels and transporters. *Nutrients*. 8(1): 43.

Clifford M N, Copeland E L, Bloxside J P, Mitchell L A. (2000) Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. *Xenobiotica*. 50: 317–326.

Conn PM. (2013) *Animal models for the study of human disease* (first edition). Academic Press. (Beaverton, USA)

Corcoran M, McKay D, Blumberg J. (2012) Flavonoid basics: chemistry, sources, mechanisms of action, and safety. *J Nutr Gerontol Geriatr*. 31(3): 176-89.

Coughlan K A, Valentine R J, Ruderman N B, Saha A K. (2014) AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes Metab Syndr Obes*. 7: 241-253.

Crandall JP, Oram V, Trandafirescu G, Reid M, Kishore P, Hawkins M, et al. (2012) Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance. *J Gerontol (A Biol Sci Med Sci)*. 67(12): 1307-12.

Creus E. Compuestos fenólicos. (2004) Un análisis de sus beneficios para la salud. *Ambito farmacéutico*. 23(6): 80-4.

Cueva C, Sánchez-Patán F, Monagas M, Walton G E, Gibson G R, Martín-Álvarez P J, et al. (2013) In vitro fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83: 792–805.

Cutler A J, Krochko J E. (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci.* 4(12): 472-478.

Cutler GJ, Nettleton JA, Ross JA, Harnack LJ, Jacobs DR, Scrafford CG, et al. (2008) Dietary flavonoid intake and risk of cancer in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Int J Cancer*. 123(3): 664-71.

DeFronzo R, Ferrannini E, Zimmet P, George M, Alberti G. (2015) International textbook of diabetes mellitus (fourth edition). Wiley-Blackwell (Hoboken, USA).

DeFronzo R, Tobin J, Andres R. (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 237(3): E214-23.

Del Rio D, Borges G, Crozier A. (2010) Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *Br J Nutr*. 104(S3): S67-90.

Del Rio D, Rodríguez-Mateos A, Spencer J, Tognolini M, Borges G, Crozier A. (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*. 18(14): 1818-92.

Denti P, Toffolo GM, Cobelli C. (2012) The disposition index: from individual to population approach. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 303(5): E576-86.

Derks TGJ, van Rijn M. (2015) Lipids in hepatic glycogen storage diseases: pathophysiology, monitoring of dietary management and future directions. *J Inherit Metab Dis*. 38(3): 537-43.

Disse E, Elisha B, Fellahi S, Rabasa-Lhoret R, Laville M, Bastard J-P. (2013) Estimer la sensibilité à l'insuline: trop d'outils tuent-ils l'outil? Insulin sensitivity assessment: Too much tools kills the tool? *Obesity*. 8(2): 141-49.

Dods RF. (2013) *Understanding diabetes: a biochemical perspective*. Wiley-Blackwell (Hoboken, USA).

Dohadwala MM, Vita JA. (2009) Grapes and cardiovascular disease. *J Nutr*. 139: S1788-93.

Donovan J, Meyer A, Waterhouse A. (1998) Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). *J Agric Food Chem*. 46(4): 1247-52.

Dorenkott MR, Griffin LE, Goodrich KM, Thompson-Witrick KA, Fundaro G, Ye L, *et al.* (2014) Oligomeric cocoa procyanidins possess enhanced bioactivity compared to monomeric and polymeric cocoa procyanidins for preventing the development of obesity, insulin resistance, and impaired glucose tolerance during high-fat feeding. *J Agric Food Chem*. 62(10): 2216-27.

Dudonné S, Dubé P, Pilon G, Marette A, Jacques H, Weisnagel SJ, Desjardins Y. (2014) Modulation of strawberry/cranberry phenolic compounds glucuronidation by co-supplementation with onion: characterization of phenolic metabolites in rat plasma using an optimized μ SPE-UHPLC-MS/MS method. *J Agric Food Chem*. 62(14): 3244-56.

Edirisinghe I, Banaszewski K, Cappozzo J, Sandhya K, Ellis CL, Tadapaneni R, *et al.* (2011) Strawberry anthocyanin and its association with postprandial inflammation and insulin. *Br J Nutr*. 106(06): 913-22.

Ellis CL, Edirisinghe I, Kappagoda T, Burton-Freeman B. (2011). Attenuation of meal-induced inflammatory and thrombotic responses in overweight men and women after 6-week daily strawberry (*Fragaria*) intake – A randomized placebo-controlled trial. *J Atheroscler Thromb*. 18: 318-327

Erlejtman AG, Fraga CG, Oteiza PI. (2006) Procyanidins protect Caco-2 cells from bile acid-and oxidant-induced damage. *Free Radical Biol Med*. 41(8): 1247-56.

Espín JC, González-Barrio R, Cerdá B, López-Bote C, Rey AI, Tomás-Barberán FA. (2007) Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *J Agric Food Chem*. 55(25): 10476-85.

Espley RV, Butts CA, Laing WA, Martell S, Smith H, McGhie TK, et al. (2014) Dietary flavonoids from modified apple reduce inflammation markers and modulate gut microbiota in mice. *J Nutr.* 144(2): 146-54.

Feliciano RP, Boeres A, Massacessi L, Istaş G, Ventura MR, Nunes dos Santos C, et al. (2016) Identification and quantification of novel cranberry-derived plasma and urinary (poly)phenols. *Arch Biochem Biophys.* 599: 31-41.

Forester SC, Waterhouse AL. (2010) Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2, 4, 6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell proliferation of Caco-2 cells. *J Agric Food Chem.* 58(9): 5320-27.

Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. (2007) Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haemat.* 137(6): 491-502.

Fraga C, Oteiza P. (2011) Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 51(4): 813-23.

Gardner D, Shoback D. (2011) Greenspan's basic & clinical endocrinology (ninth edition). Appendix: normal hormone reference ranges. McGraw-Hill Medical (New York, USA).

Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. (2011) Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J Med Plants Res.* 5(31): 6697-703.

Giampieri F, Forbes-Hernandez T Y, Gasparri M, Alvarez-Suarez J M, Afrin S, Bompadre S, Battino M. (2015) Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food Funct.* 6(5): 1386-1398.

Giampieri F, Tulipani S, Alvarez-Suarez J M, Quiles J L, Mezzetti B, Battino M. (2012) The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition.* 28(1): 9-19.

Gogoi B, Chatterjee P, Mukherjee S, Buragohain A K, Bhattacharya S, Dasgupta S. (2014) A polyphenol rescues lipid induced insulin resistance in skeletal muscle cells and adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 452(3): 382-88.

Gómez-Ruiz JA, Leake DS, Ames JM. (2007) *In vitro* antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *J Agric Food Chem.* 55(17): 6962-69.

Gómez-Cadenas A, Pozo OJ, García-Augustín P, Sancho JV. (2002) Direct analysis of abscisic acid in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray/tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal.* 13(4): 228-34.

Gonthier M P, Donovan J L, Texier O, Felgines C, Rémésy C, Scalbert A. (2003) Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic Biol Med.* 35(8): 837-44.

González CA, Malanco HLM, Sánchez ZMJ, Elizondo AS, Navarro ZJE, Rosillo RS. (2006) Inflamación y resistencia a la insulina: mecanismos para el desarrollo de la disfunción endotelial y aterosclerosis. *Rev Mex Cardiol.* 17(2): 71-82.

González-Barrio R, Borges G, Mullen W, Crozier A. (2010) Bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with ileostomy. *J Agric Food Chem.* 58(7): 3933-39.

González-Sarrías A, Espín JC, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT. (2009) Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signaling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins. *Mol Nutr Food Res.* 53(6): 686-98.

González-Sarrías A, Larrosa M, Tomás-Barberán F, Dolaro P. (2010) NF- κ B-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts. *Br J Nutr.* 104(4): 503-12.

Gorboulev V, Schürmann A, Vallon V, Kipp H, Jaschke A, Klessen D, et al. (2012) Na⁺-d-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes.* 61(1): 187-96.

Grassi D, Desideri G, Di Giosia P, De Feo M, Fellini E, Cheli P, et al. (2013) Tea, flavonoids, and cardiovascular health: endothelial protection. *Am J Clin Nutr.* 98(6): 1660S-66.

Groop L C, Widén E, Ferrannini E. (1993) Insulin resistance and insulin deficiency in the pathogenesis of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: errors of metabolism or of methods? *Diabetologia.* 36(12): 1326-31.

Gropper SS, Smith JL. (2012) *Advanced nutrition and human metabolism* (sixth edition). Wadsworth Cengage Learning (Belmont, USA).

Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, et al. (2004) Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr.* 134(3): 613-17.

Guilbert JJ. (2003). *The world health report 2002-reducing risks, promoting healthy life*. Education for Health (Abingdon, England).

Guri A J, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. (2010a) Abscisic acid ameliorates experimental IBD by downregulating cellular adhesion molecule expression and suppressing immune cell infiltration. *Clin Nutr.* 29(6): 824-31.

Guri A J, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. (2010b) Abscisic acid synergizes with rosiglitazone to improve glucose tolerance and down-modulate macrophage accumulation in adipose tissue: Possible action of the cAMP/PKA/PPAR γ axis. *Clin Nutr.* 29: 646-53.

Guri A J, Misyak SA, Hontecillas R, Hasty A, Liu D, Si H, Bassaganya-Riera J. (2010c) Abscisic acid ameliorates atherosclerosis by suppressing macrophage and CD4⁺ T cell recruitment into the aortic wall. *J Nutr Biochem.* 21(12): 1178-85.

Guri A J, Hontecillas R, Si H, Liu D, Bassaganya-Riera J. (2007). Dietary abscisic acid ameliorates glucose tolerance and obesity-related inflammation in db/db mice fed high-fat diets. *Clin Nutr.* 26: 107-16.

Hager TJ, Howard LR, Liyanage R. (2008) Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *J Agric Food Chem.* 56(3): 661-69.

Halvorsen B, Carlsen MH, Phillips KM, Bohn SK, Holte K, Jacobs DR Jr, Blomhoff R. (2006) Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in food consumed in the United States. *Am J Clin Nutr.* 84(1): 95-135.

Han X, Shen T, Lou H. (2007) Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci.* 8(9): 950-88.

Hanhineva K, Torronen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, Poutanen K. (2010) Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci.* 11(4): 1365-402.

Heiss C, Keen C L, Kelm M. (2010) Flavanols and cardiovascular disease prevention. *Eur Heart J.* 31: 2583-92.

Hills C, Brunskill N. (2008) Intracellular signalling by C-peptide. *Exp Diabetes Res.* 635158: 1-8.

Hokayem M, Blond E, Vidal H, Lambert K, Meugnier E, Feillet-Coudray C, et al. (2013) Grape polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 36(6): 1454-61.

Hsu C L, Yen G C. (2007) Effects of flavonoids and phenolic acids on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *J Agric Food Chem.* 55(21): 8404-10.

Huddart H, Smith R J, Langton P D, Hetherington A M, Mansfield T A. (1986) Is abscisic acid a universally active calcium agonist? *New Phytologist.* 104(2): 161-73.

Hum D W, Bélanger A, Lévesque E, Barbier O, Beaulieu M, Albert C, Vallée M, Guillemette C, Tchernof A, Turgeon D, et al. (1999) Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69: 413–23.

Ibáñez C, Valdés A, García-Cañas V, Simó C, Celebier M, Rocamora-Reverte L, Gómez-Martínez A, Herrero M, Castro-Puyana M, Segura-Carretero A, Ibáñez E, Ferragut J A, Cifuentes A. (2012) Global Foodomics strategy to investigate the health benefits of dietary constituents. *J Chromatogr A.* 1248: 139–53.

Ignat I, Volf I, Popa V. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 126: 1821-35.

Jung EH, Kim SR, Hwang IK, Ha TY. (2007) Hypoglycemic effects of a phenolic acid fraction of rice bran and ferulic acid in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Agric Food Chem.* 55(24): 9800-804.

Kahn S, Hull R, Utzschneider K. (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 444(7121): 840-46.

Karlund A, Hanhineva K, Lehtonen M, Karjalainen R, Sandell M. (2015) Nontargeted metabolite profiles and sensory properties of strawberry cultivars grown both organically and conventionally. *J Agric Food Chem.* 63(3): 1010-19.

Kikuzaki H, Kayano S, Fukutsuka N, Aoki A, Kasamatsu K, Yamasaki Y, et al. (2004) Abscisic acid related compounds and lignans in prunes (*Prunus domestica* L.) and their oxygen radical absorbance capacity (ORAC). *J Agric Food Chem.* 52(2): 344-49.

Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, et al. (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 76(3): 560-68.

Konishi Y, Hitomi Y, Yoshioka E. (2004) Intestinal absorption of *p*-coumaric and gallic acids in rats after oral administration. *J Agric Food Chem.* 52(9): 2527-32.

Kruger DF, Martin CL, Sadler CE. (2006) New insights into glucose regulation. *Diabetes Educ.* 32(2): 221-28.

Kurotobi T, Fukuhara K, Inage H, Kimura S. (2010) Glycemic index and postprandial blood glucose response to japanese strawberry jam in normal adults. *J Nutr Sci Vitaminol.* 56(3): 198-202.

Lacampagne S, Gagné S, Gény L. (2010) Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. *J Plant Growth Regul.* 29(1): 81-90.

Le Floch J-P, Escuyer P, Baudin E, Baudon D, Perlemuter L. (1990) Blood glucose area under the curve: methodological aspects. *Diabetes Care.* 13(2): 172-75.

Le Page-Degivry MT, Bidard JN, Rouvier E, Bulard C, Lazdunski M. (1986) Presence of abscisic acid, a phytohormone, in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci.* 83(4): 1155-58.

Lee I T, Chan Y C, Lin C W, Lee W J, Sheu W. (2008). Effect of cranberry extracts on lipid profiles in subjects with Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 25(12): 1473-77.

Lee BH, Eskandari R, Jones K, Reddy KR, Quezada-Calvillo R, Nichols BL, et al. (2012) Modulation of starch digestion for slow glucose release through “togglng” of activities of mucosal α -glucosidases. *J Biol Chem.* 287(38): 31929-38.

Lees H J, Swann J R, Wilson I D, Nicholson J K, Holmes E. (2013) Hippurate: the natural history of a mammalian–microbial cometabolite. *J Proteome Res.* 12(4): 1527-46.

Li HH, Hao RL, Wu SS, Guo PC, Chen CJ, Pan LP, Ni H. (2011) Occurrence, function and potential medicinal applications of the phytohormone abscisic acid in animals and humans. *Biochem Pharmacol.* 82(7): 701-12.

Li Z, Zhao X, Sandhu AK, Gu L. (2010) Effects of exogenous abscisic acid on yield, antioxidant capacities, and phytochemical contents of greenhouse grown lettuces. *J Agric Food Chem.* 58(10): 6503-09.

Licinio-Paixao J, Polonsky KS, Given BD, Pugh W, Ostrega D, Frank BF, Rubenstein AH. (1986) Ingestion of a mixed meal does not affect the metabolic clearance rate of biosynthetic human C-peptide. *J Clin Endocrinol Metab.* 63(2): 401-03.

Liu RH. (2013) Dietary bioactive compounds and their health implications. *J Food Sci.* 78(s1): A18-25.

López-Carbonell M, Jáuregui O. (2005) A rapid method for analysis of abscisic acid (ABA) in crude extracts of water stressed *Arabidopsis thaliana* plants by liquid chromatography—mass spectrometry in tandem mode. *Plant Physiol Biochem.* 43(4): 407-11.

Lorenzo C, Wagenkecht L, Rewers M, Karter A, Bergman R, Hanley A. (2010). Disposition index, glucose effectiveness, and conversion to type 2 diabetes the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes Care.* 33(9): 2098-99.

Määttä KR, Kamal-Eldin A, Torronen AR. (2003) High performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionisation mass spectrometric (MS) detection: *Ribes* species. *J Agric Food Chem.* 51(23): 6736–44.

Magnone M, Bruzzone S, Guida L, Damonte G, Millo E, Scarfi S, et al. (2009) Abscisic acid released by human monocytes activates monocytes and vascular smooth muscle cells responses involved in atherogenesis. *J Biol Chem.* 284(26): 17808-18.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79(5): 727-47.

Manzano S, Williamson G. (2010) Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res*. 54(12): 1773-80.

Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. (2015) Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Res Int*. 905215: 1-18.

Martí MP, Pantaleón A, Rozek A, Soler A, Valls J, Macià A, et al. (2010) Rapid analysis of procyanidins and anthocyanins in plasma by microelution SPE and ultra-HPLC. *J Sep Sci*. 33(17-18): 2841-53.

Martínez-Micaelo N, González-Abuín N, Ardèvol A, Pinent M, Blay M. (2012) Procyanidins and inflammation: molecular targets and health implications. *BioFactors*. 38(4): 257-65.

Mather KJ, Hunt AE, Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, Katz A, et al. (2001) Repeatability characteristics of simple indices of insulin resistance: implications for research applications. *J Clin Endocrinol Metab*. 86(11): 5457-64.

Matsuda M, DeFronzo R. (1999) Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. Comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*. 22(9): 1462-70.

McDougall G, Shapiro F, Dobson P, Blake A, Stewart D. (2005) Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *J Agric Food Chem*. 53(7): 2760-6.

Ming H, Xiaoling L. (2011) Oral bioavailability: basic principles, advanced concepts, and applications. 16(33): 519-21. Wiley-Blackwell (Hoboken, USA).

Ming-Feng L, Zheng-Tao X, Hong-Yu Z. (2013) Where do health benefits of flavonoids come from insights from flavonoid targets and their evolutionary history. *Biochem Biophys Res Commun*. 434(4): 701-4.

Minihane AM, Vinoy S, Russell WR, Baka A, Roche HM, Tuohy KM, et al. (2015). Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br J Nutr*. 114: 999–1012.

Mink PJ, Scrafford CG, Barraj LM, Harnack L, Hong CP, Nettleton JA, Jacobs DR. (2007) Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 85(3): 895-909.

Moazen S, Amani R, Homayouni Rad A, Shahbazian H, Ahmadi K, Taha Jalali M. (2013). Effects of freeze-dried strawberry supplementation on metabolic biomarkers of atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes: a randomized double-blind controlled trial. *Ann Nutr Metab.* 63(3): 256-64.

Monagas M, Urpi-Sarda M, Sánchez-Patán F, Llorach R, Garrido I, Gómez-Cordovés C, et al. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct.* 1(3): 233-53.

Mosele JI, Macià A, Motilva MJ. (2015). Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: A review. *Molecules.* 20(9): 17429-68.

Mukhtar Q, Brody E, Mehna P, Camponeschi J, Clark C, Desai J, et al. (2005). An innovative approach to enhancing the surveillance capacity of state-based diabetes prevention and control programs: The Diabetes Indicators and Data Sources Internet Tool (DIDIT). *Prev Chronic Dis.* 2(3): 1-7.

Mullen W, Archeveque M-A, Edwards C, Matsumoto H, Crozier A. (2008) Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: impact of a full-fat yogurt. *J Agric Food Chem.* 56(23): 11157-64.

Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon M. (2008) Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294(1): E15-26.

Nagamune K, Hicks LM, Fux B, Brossier F, Chini EN, Sibley LD. (2008) Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 451(7175): 207-10.

Nakatani N, Kayano S, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. (2000) Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *J Agric Food Chem.* 48(11): 5512-16.

Nambara E, Marion-Poll A. (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol.* 56: 165-85.

Narasimhan A, Chinnaiyan M, Karundevi B. (2015) Ferulic acid exerts its antidiabetic effect by modulating insulin-signalling molecules in the liver of high-fat diet and fructose-induced type-2 diabetic adult male rat. *Appl Physiol Nutr Metab.* 40(8): 769-81.

Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA, Heine RJ, Henry RR, Pratley R, Zinman B. (2007). Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*. 30(3): 753-59.

Nizamutdinova IT, Jin YC, Chung JI, Shin SC, Lee SJ, Seo HG, et al. (2009) The anti-diabetic effect of anthocyanins in streptozotocin-induced diabetic rats through glucose transporter 4 regulation and prevention of insulin resistance and pancreatic apoptosis. *Mol Nutr Food Res*. 53(11): 1419–29.

Novotny J A, Baer D J, Khoo C, Gebauer S K, Charron C S. (2015) Cranberry juice consumption lowers markers of cardiometabolic risk, including blood pressure and circulating C-reactive protein, triglyceride, and glucose concentrations in adults. *J Nutr*. 145: 1185–1193.

Owen SJ, Abrams SR. (2009) Measurement of plant hormones by liquid chromatography–mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. 495: 39-51.

Palmer J, Fleming A, Greenbaum C, Herold K, Jansa L, Kolb H, et al. (2001) C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trial to preserve beta-cell function. ADA workshop. *Diabetes*. 53(1): 250-264.

Palmer N, Langefeld C, Campbell J, Williams A, Saad M, Norris J, et al. (2006) Genetic mapping of disposition index and acute insulin response loci on chromosome 11q. *Diabetes*. 55(4): 911-18.

Paquette M, Weisnagel SJ, Desjardins Y, Marois J, Marette A, Pilon G, et al. (2014) Beneficial effects of a polyphenol-rich supplement from strawberry and cranberry on glucose metabolism in free-living insulin resistant men and women. *Can J Diabetes*. 5(38): S68-9.

Paquette M. (2015) Effets bénéfiques d'un supplément riche en polyphénols de fraises et de canneberges sur la sensibilité à l'insuline et le profil de risque cardiométabolique chez des hommes et des femmes résistants à l'insuline. Mémoire de maîtrise. Université Laval.

Paredes-Lopez O, Cervantes-Ceja M, Vigna-Pérez M, Hernandez-Pérez T. (2010) Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life-a review. *Plant Foods Hum Nutr*. 65(3): 299-308.

Peters A. (2010) Incretin-based therapies: review of current clinical trial data. *Am J Med*. 123(3): S28-37.

Piché ME, Weisnagel SJ, Corneau L, Nadeau A, Bergeron J, Lemieux S. (2005) Contribution of abdominal visceral obesity and insulin resistance to the cardiovascular risk profile of postmenopausal women. *Diabetes*. 54(3): 770-77.

Piotrowska A, Bajguz A. (2011) Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry*. 72(17): 2097-2112.

Polonsky KS, Licinio-Paixao J, Given BD, Pugh W, Rue P, Galloway J, et al. (1986) Use of biosynthetic human C-peptide in the measurement of insulin secretion rates in normal volunteers and type I diabetic patients. *J Clin Invest*; 77(1): 98-105.

Prabhakar P K, Doble M. (2011) Interaction of cinnamic acid derivatives with commercial hypoglycemic drugs on 2-deoxyglucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *J Agric Food Chem*. 59(18): 9835-9844.

Prabhakar P K, Prasad R, Ali S, Doble M. (2013) Synergistic interaction of ferulic acid with commercial hypoglycemic drugs in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 20(6): 488-494.

Pu F, Mishima K, Irie K, Motohashi K, Tanaka Y, Orito K, et al. (2007) Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *J Pharmacol Sci*. 104(4): 329-34.

Rao S, Disraeli P, Mcgregor T. (2004) Impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Am Fam Physician*. 69(8): 1961-68.

Reaven GM. (2005). The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Annu Rev Nutr*. 25: 391-406.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 20(7): 933-56.

Rios LY, Bennett RN, Lazarus SA, Rémésy C, Scalbert A, Williamson G. (2002) Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr*. 76(5): 1106-110.

Rizkalla SW, Taghrid L, Laromiquiere M, Huet D, Boillot J, Rigoir A, et al. (2004) Improved plasma glucose control, whole-body glucose utilization, and lipid profile on a low-glycemic index diet in type 2 diabetic men a randomized controlled trial. *Diabetes Care*. 27(8): 1866-72.

Roden, Michael. (2007) *Clinical diabetes research: methods and techniques*. Wiley-Blackwell (Hoboken, USA).

Röder PV, Geillinger KE, Zietek TS, Thorens B, Koepsell H, Daniel H. (2014) The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLoS One*. 9(2): e89977.

Rodriguez-Mateos A, Vauzour D, Krueger C, Shanmuganayagam D, Reed J, Calani L, et al. (2014) Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Arch Toxicol*. 88(10): 1803-53.

Rossi M, Negri E, Parpinel M, Lagiou P, Bosetti C, Talamini R, et al. (2010) Proanthocyanidins and the risk of colorectal cancer in Italy. *Cancer Causes Control*. 21(2): 243-50.

Ruel G, Pomerleau S, Couture P, Lemieux S, Lamarche B, Couillard C. (2008). Low-calorie cranberry juice supplementation reduces plasma oxidized LDL and cell adhesion molecule concentrations in men. *Br J Nutr*. 99(02): 352-359.

Sabán-Ruiz J, Abregate-Fuente RM. (2012) *Insulinresistencia e inflexibilidad metabólica*. Díaz de Santos (Madrid, Spain).

Sanches JR, França LM, Chagas VT, Gaspar RS, dos Santos KA, Gonçalves LM, et al. (2016) Polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaf dually improves peripheral insulin sensitivity and pancreatic islet function in monosodium L-glutamate-induced obese rats. *Front Pharmacol*. 7(48): 1-16.

Sandhu AK, Gray DJ, Jiang L, Liwei G. (2011) Effects of exogenous abscisic acid on antioxidant capacities, anthocyanins, and flavonol contents of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) skins. *Food Chem*. 126(3): 982-88.

Sandoval DA, D'Alessio DA. (2015) Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. *Physiol Rev*. 95(2): 513-48.

Scarfì S, Ferraris C, Fruscione F, Fresia C, Guida L, Bruzzone S, et al. (2008) Cyclic ADP-ribose-mediated expansion and stimulation of human mesenchymal stem cells by the plant hormone abscisic acid. *Stem Cells*. 26(11): 2855-64.

Scarfì S, Fresia C, Ferraris C, Bruzzone S, Fruscione F, Usai C, et al. (2009) The plant hormone abscisic acid stimulates the proliferation of human hemopoietic progenitors through the second messenger cyclic ADP-ribose. *Stem Cells*. 27(10): 2469-77.

Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, et al. (2006) (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(4): 1024-29.

Schroeter H, Heiss C, Spencer JP, Keen CL, Lupton JR, Schmitz HH. (2010) Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: current knowledge and future needs. *Mol Aspects Med*. 31(6): 546-57.

Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, 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(10): 2481-85.

Seeram NP. (2008). Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J Agric Food Chem*. 56(3): 627-9.

Senaphan K, Kukongviriyapan U, Sangartit W, Pakdeechote P, Pannangpetch P, Prachaney P, et al. (2015) Ferulic acid alleviates changes in a rat model of metabolic syndrome induced by high-carbohydrate, high-fat diet. *Nutrients*. 7(8): 6446-64.

Serra A, Macia A, Romero MP, Valls J, Bladé C, Arola L, Motilva MJ. (2010) Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in *in vitro* and *in vivo* models. *Br J Nutr*. 103(07): 944-52.

Sheth DB. (2012) Investigation into pharmacological profile and mechanism of action of abscisic acid with reference to its possible therapeutic usefulness. Doctoral dissertation. Saurashtra University (India).

Shimodaira M, Muroya Y, Kumagai N, Tsuzawa K, Honda K. (2013) Effects of short-term intensive glycemic control on insulin, glucagon, and glucagon-like peptide-1 secretion in patients with type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest*. 36(9): 734-38.

Shpakov AO, Granstrem AO. (2013) C-peptide structure, functions and molecular mechanisms of action. *Tsitologija*. 55(1): 16-27.

Sima A. Diabetes & C-peptide: scientific and clinical aspects. (Chapter 1. Steiner DF. C-peptide and insulin: a happy marriage). Humana Press (New York, USA) Springer. 2012.

Simão TN, Lozovoy MA, Simão AN, Oliveira SR, Venturini D, Morimoto HK, et al. (2013) Reduced-energy cranberry juice increases folic acid and adiponectin and reduces homocysteine and oxidative stress in patients with the metabolic syndrome. *Br J Nutr*. 110: 1885-94.

St-Pierre P, Pilon G, Dumais V, Dion C, Dubois MJ, Dubé P, et al. (2014) Comparative analysis of maple syrup to other natural sweeteners and evaluation of their metabolic responses in healthy rats. *J Funct Foods*. 11: 460-471.

Stalikas C. (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*. 30: 3268-95.

Stalmach A, Edwards C A, Wightman J D, Crozier A (2012). Gastrointestinal stability and bioavailability of (poly) phenolic compounds following ingestion of Concord grape juice by humans. *Mol Nutr Food Res*. 56 (3): 497-509.

Stalmach A, Mullen W, Barron D, Uchida K, Yokota T, Cavin C, et al. (2009) Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: identification of biomarkers of coffee consumption. *Drug Metab Dispos*. 37: 1749–58.

Stalmach A, Steiling H, Williamson G, Crozier A. (2010) Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. *Arch Biochem Biophys*. 501(1): 98–105.

Stettner AI, Segrè D. (2013) The cost of efficiency in energy metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(24): 9629-30.

Stoupi S, Williamson G, Viton F, Barron D, King LJ, Brown JE, Clifford MN. (2010) In vivo bioavailability, absorption, excretion, and pharmacokinetics of [14C] procyanidin B2 in male rats. *Drug Metab Dispos*. 38(2): 287-91.

Stull AJ, Cash KC, Johnson WD, Champagne CM, Cefalu WT. (2010). Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women. *J Nutr.* 140: 1764-1768.

Sturla L, Fresia C, Guida L, Bruzzone S, Scarfi S, Usai C, et al. (2009) LANCL2 is necessary for abscisic acid binding and signaling in human granulocytes and in rat insulinoma cells. *J Biol Chem.* 284(41): 28045-57.

Tam CS, Xie W, Johnson WD, Cefalu WT, Redman LM, Ravussin E. (2012) Defining insulin resistance from hyperinsulinemic-euglycemic clamps. *Diabetes Care.* 35(7): 1605-10.

Thompson J, Manore M, Vaughan L. (2013) *The Science of Nutrition* (3rd edition). Pearson Benjamin Cummings (San Francisco, USA).

Thorens B. (2015) GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia.* 58 (2): 221-32.

Törrönen R, Sarkkinen E, Tapola N, Hautaniemi E, Kilpi K, Niskanen L. (2010) Berries modify the postprandial plasma glucose response to sucrose in healthy subjects. *Br J Nutr.* 103(08): 1094-97.

Tossi V, Cassia R, Bruzzone S, Zocchi E, Lamattina L. (2012) ABA says NO to UV-B: a universal response? *Trends Plant Sci.* 17(9): 510-517.

Trapp MA, De Souza GD, Rodrigues-Filho E, Boland W, Mithöfer A. (2014) Validated method for phytohormone quantification in plants. *Front Plant Sci.* 5(417): 1-11.

Tzounis X, Vulevic J, Kuhnle GG, George T, Leonczak J, Gibson GR, et al. (2008) Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *Br J Nutr.* 99(04): 782-92.

Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti K. (2002) Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. *Diabet Med.* 19(9): 708-23.

Usarek M, Bryla J. (2012) Pleiotropic action of proinsulin C-peptide. *Postepy Hig Med Dosw.* 14(66): 135-45.

USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28. (2015) US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory. Basic Report 09316, Strawberries, raw.

Versantvoort CH, Oomen AG, Vande K amp E, Rompelberg CJ, Sips AJ. (2005) Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem Toxicol.* 43(1): 31-40.

Verstraeten SV, Jagers GK, Fraga CG, Oteiza PI. (2013) Procyanidins can interact with Caco-2 cell membrane lipid rafts: involvement of cholesterol. *BBA-Biomembranes.* 1828(11): 2646-53.

Verzelloni E, Pellacani C, Tagliazucchi D, Tagliaferri S, Calani L, Costa LG, et al. (2011) Antiglycative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites. *Mol Nutr Food Res.* 55(S1): S35-43.

Vijayakumar M, Bhat M. (2012) Real time qualitative and quantitative GLUT4 translocation assay. *Methods Enzymol.* 505(14): 257-71.

Walle T, Hsieh F, DeLegge M, Oatis JE, Walle UK. (2004) High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos.* 32(12): 1377-82.

Wang D, Wei X, Yan X, Jin T, Ling W. (2010) Protocatechuic acid, a metabolite of anthocyanins, inhibits monocyte adhesion and reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Agric Food Chem.* 58(24): 12722-28.

Wedick NM, Pan A, Cassidy A, Rimm EB, Sampson L, Rosner B, et al. (2012) Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Am J Clin Nutr.* 95(4): 925-33.

Wilson T, Singh AP, Vorsa N, Goettl CD, Kittleson KM, Roe CM, et al. (2008) Human glycemic response and phenolic content of unsweetened cranberry juice. *J Med Food.* 11(1): 46-54.

World Health Organisation (WHO). (1999) Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO consultation. Part 1. Geneva. 1-59.

World Health Organisation (WHO). (2016) Global report on diabetes. Executive Summary. Geneva. 1-88.

World Health Organisation (WHO). (2002) The World Health Report. Reducing risks and promoting healthy life. Geneva. 2-247.

Wright EM, Loo D, Hirayama BA. (2011) Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev.* 91: 733-94.

Yeh SL, Yeh CL, Chan ST, Chuang CH. (2011) Plasma rich in quercetin metabolites induces G2/M arrest by upregulating PPAR-c expression in human A549 lung cancer cells. *Planta Med.* 77(10): 992–98.

Zamora-Ros R, Forouhi NG, Sharp SJ, Gonzalez CA, Buijssse B, Guevara M, et al. (2014) Dietary intakes of individual flavanols and flavonols are inversely associated with incident type 2 diabetes in European populations. *J Nutr.* 144(3): 335-43.

Zeevaart J D. (1999) Abscisic acid metabolism and its regulation. *New Compr Biochem.* 33: 189-207.

Zeevaart J, Creelman R. (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 39: 439-73.

Zhang HY, Chen LL, Li XJ, Zhang J. (2010) Evolutionary inspirations for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 31(10): 443-48.

Zhang WY, Liu HQ, Xie KQ, Yin LL, Li Y, Kwik-Urbe CL. (2006) Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] suppresses the expression of cyclooxygenase-2 in endotoxin-treated monocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 345(1): 508-15.

Zheng C, Halaly T, Acheampong A K, Takebayashi Y, Jikumaru Y, Kamiya Y, Or E. (2015) Abscisic acid (ABA) regulates grape bud dormancy, and dormancy release stimuli may act through modification of ABA metabolism. *J Exp Bot.* 66(5): 1527-42.

Zhou R, Squires T, Ambrose S, Abrams S, Ross A, Cutler A. (2003) Rapid extraction of abscisic acid and its metabolites for liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1010(1): 75-85.

Ziegler K, Kerimi A, Poquet L, Williamson G. (2016). Butyric acid increases transepithelial transport of ferulic acid through upregulation of the monocarboxylate transporters SLC16A1 (MCT1) and SLC16A3 (MCT4). *Arch Biochem Biophys.* 599: 3-12.

Zierler K. (1999) Whole body glucose metabolism. *Endocrinol Metab.* 276(39): E409-26.

Zocchi E, Basile G, Cerrano C, Bavestrello G, Giovine M, Bruzzone S, et al. (2003) ABA-and cADPR-mediated effects on respiration and filtration downstream of the temperature-signaling cascade in sponges. *J Cell Sci.* 116(4): 629-36.

Zocchi E, Carpaneto A, Cerrano C, Bavestrello G, Giovine M, Bruzzone S, et al. (2001) The temperature-signaling cascade in sponges involves a heat-gated cation channel, abscisic acid, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(26): 14859-64.

Zunino S J, Parelman M A, Freytag T L, Stephensen C B, Kelley D S, Mackey B E, et al. (2012) Effects of dietary strawberry powder on blood lipids and inflammatory markers in obese human subjects. *Br J Nutr.* 108 : 900-9.