



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :
Navin SRENG

le vendredi 1er juillet 2016

Titre :

Etude de l'effet de l'association du Resvératrol et de la Curcumine sur
l'amélioration de la tolérance au glucose

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Physiopathologie

Unité de recherche :

INSERM UMR 1048, Equipe2

Directeur/trice(s) de Thèse :

Pr. Rémy BURCELIN

Dr. Eric SEREE

Jury :

Dr. Catherine RIVA, rapporteur
Pr. Evelyne OLLIVIER, rapporteur
Pr. Philippe PICCERELLE, rapporteur
Pr. Gérard CAMPISTRON, examinateur
Pr. Serge CHAMPION, membre invité
Dr. Eric SEREE, co-directeur
Pr. Rémy BURCELIN, directeur



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Navin SRENG

le vendredi 1er juillet 2016

Titre :

Etude de l'effet de l'association du Resvératrol et de la Curcumine sur
l'amélioration de la tolérance au glucose

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Physiopathologie

Unité de recherche :

INSERM UMR 1048, Equipe2

Directeur/trice(s) de Thèse :

Pr. Rémy BURCELIN

Dr. Eric SEREE

Jury :

Dr. Catherine RIVA, rapporteur

Pr. Evelyne OLLIVIER, rapporteur

Pr. Philippe PICCERELLE, rapporteur

Pr. Gérard CAMPISTRON, examinateur

Pr. Serge CHAMPION, membre invité

Dr. Eric SEREE, co-directeur

Pr. Rémy BURCELIN, directeur

REMERCIEMENTS

Voici mes 3 années de thèse qui s'achèvent. C'est maintenant le moment de rédiger une partie très importante: les remerciements. La rédaction de cette partie a commencé dans mon coeur dès les premiers jours de mon arrivée en France, séparée de mon aimable pays, le Cambodge.

J'adresse tout d'abord ma très sincère reconnaissance à mon directeur de thèse, **Monsieur le Professeur Rémy Burcelin** (INSERM 1048), qui m'a accueillie chaleureusement au sein de son équipe et m'a guidée tout au long de ce travail. C'est dans ce labo, que j'ai découvert de nouvelles techniques et où j'ai obtenu les premiers résultats. Je le remercie profondément pour ses conseils éclairés, ses corrections précieuses pour nos articles et pour cette thèse. Je garderai beaucoup de considération pour sa force de travail.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à mon co-directeur de thèse **Monsieur le Docteur Eric Serée** (INSERM 1062 / INRA 1260) qui m'a invitée à travailler dans son équipe et m'a proposé ce sujet de thèse très intéressant. Du fond du coeur, je voudrais lui adresser, mes plus sincères remerciements. Je le remercie également pour sa confiance, son soutien, et pour sa présence dans tous les moments difficiles de cette thèse.

Je n'aurais pu avoir la possibilité de réaliser ce travail de thèse sans mon encadrant **Monsieur le Professeur Serge Champion** (CNRS 7263 – IMBE) qui m'a partagé ses connaissances et ses compétences en Biochimie et Biologie Moléculaire et qui m'a donné de nombreux conseils pour mener à bien ce travail. Je le remercie sincèrement pour son aide précieuse dans la préparation de cette revue de thèse ainsi que des différentes communications réalisées lors de cette thèse.

Je tiens à remercier également à **Monsieur le Professeur Yves Barra** qui m'a accepté dans son laboratoire. Je le remercie tout particulièrement pour sa gentillesse, son soutien et ses conseils précieux.

Je voudrais remercier **Madame le Docteur Catherine Riva**, **Madame le Professeur Evelyne Ollivier** et **Monsieur le Professeur Philippe Piccerelle** de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je suis très honorée de leur investissement dans la lecture et les corrections de cette thèse. Je vous prie, Mesdames, Monsieur, de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens à remercier infiniment à **Madame le docteur Béatrice Cousin** qui a accepté d'être une des membres de mon comité de thèse. Je la remercie pour sa participation et ses conseils précieux.

Tous mes remerciements vont également à **Madame le Professeur Marie-Christine Alessi**, la Directrice de l'UMR INRA 1260, pour m'avoir accueillie dans son unité et m'avoir assuré des conditions de travail de bonne qualité. Je vous prie, Madame, de trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

Les résultats que j'ai la chance de présenter dans cette thèse sont le fruit d'un travail d'équipes. Je voudrais adresser mes remerciements sincères à tous les personnels et collègues des équipes ci-dessous:

- L'équipe 2 "Facteurs de Risques Intestinaux, Diabète, Dyslipidémie", INSERM U1048, I2MC, Institut de Recherche sur les Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires de l'Hôpital Rangueil, Toulouse.
- L'équipe IMBE de Mutagénèse environnementale de l'UMR CNRS 7263, Faculté de Pharmacie, Aix Marseille Université.
- L'équipe 2 "Micronutriments, Tissu adipeux et Résistance à l'insuline", l'UMR INSERM 1062 / INRA 1260, "Nutrition Obésité et Risque Thrombotique", Faculté de Médecine, Aix Marseille Université.
- L'équipe de la Zootechnie, I2MC, Institut de Recherche sur les Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires de l'Hôpital Rangueil, Toulouse.
- La plateforme d'imagerie, I2MC, Institut de Recherche sur les Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires de l'Hôpital Rangueil, Toulouse.
- Le plateau de Génomique Get-Purpan, IFR150, Institut Fédératif de Recherche Bio-Médicale de Toulouse (IFR-BMT) de l'Hôpital Purpan, Toulouse.
- L'équipe de Vaiomer, Labège, Toulouse.

Merci à toutes celles et ceux qui m'ont acceptée dans une ambiance agréable, merci pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur soutien permanent souvent technique, parfois moral:

Pascale Loubières: je te remercie infiniment pour ton accueil chaleureux au laboratoire. Je ne me sens jamais seule avec toi. Merci énormément d'être à mes côtés pour m'écouter, me rassurer et partager des bons moments. J'aime te raconter des choses et discuter avec toi et

partager des connaissances sur le monde des bactéries. Je remercie également à toute ta famille pour leur accueil chaleureux pendant mon séjour à la montagne. J'ai passé une merveille randonnée avec eux.

Jean-Charles Martin: je vous remercie beaucoup pour les données GC-MS.

Patricia Bremond: sans toi, je n'aurai pas pu apprendre et réussir toutes les cultures de cellules qui ont été nécessaires. Je te remercie beaucoup.

Vincent Azalbert: merci de m'avoir appris à faire le DGGE qui est une technique compliquée à réaliser. Je n'aurai pas pu le réussir sans ton aide.

Céline Pomié et Estelle Grasset: je vous remercie de m'avoir partagé vos échantillons pour mener à bien mes expériences sur les cytochromes.

François Tercé: merci beaucoup pour ton soutien chaleureux et tes conseils précieux concernant les expériences sur les lipides.

Vincent Blasco: je te remercie de m'avoir appris à faire l'analyse des résultats.

Céline Garret: merci de m'avoir appris les extractions d'ARN.

Matteo Serino: merci beaucoup pour tes conseils et pour m'avoir appris à réaliser l'extraction d'ADN.

Aurélié Waget: je te remercie pour m'avoir appris les manipulations des souris.

Jean François-Landrier et Frank Peiretti: merci pour votre aide technique.

Mes remerciements vont également à **Monsieur le Professeur Philippe Valet** et son équipe du service de l'Ecole doctorale de Biologies Santé et Biotechnologies pour leur sympathie et leur aide pour surmonter les processus administratifs lors de la soutenance de cette thèse.

Je tiens de remercier l'Université Toulouse III – Paul Sabatier et le coordinateur du Projet Techno II – Erasmus Mundus pour m'avoir octroyé une bourse afin de réaliser cette thèse. Je remercie infiniment **Monsieur Jean-Michel Baleynaud, Monsieur le Professeur Sovan Lek, Mademoiselle Laura Verheyleweghen** et leur équipe du Projet Techno II.

Je remercie énormément **Madame Sophie BOCHET** et son équipe du Service d'accueil des étudiants étrangers du CROUS Aix-Marseille pour leur sympathie et pour les efforts qu'ils ont consacré à me trouver un logement à Marseille.

Je voudrais adresser mes sincères remerciements au Doyen de la Faculté de Pharmacie du Cambodge pour son soutien et à **Monsieur le Docteur Rothmony Eang** pour son aide administrative pour ma demande de bourse.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Monsieur Hot Bun** et sa famille et **Monsieur Chhan Siv** et son épouse pour leurs conseils précieux, leur soutien et leurs encouragements.

Je voudrais remercier également à l'AEPK (Amicale des étudiants en Pharmacie et des Pharmaciens Khmer) qui aide techniquement et financièrement les étudiants cambodgiens.

Je remercie spécialement mes deux très bonnes amies, **Hanna Ilchmann** et **Mardy Long** qui sont toujours à mes côtés. Hanna, je te remercie pour m'avoir partagé ta chambre durant chacun de mes séjours à Toulouse. Merci à toutes les deux pour votre soutien et votre encouragement. Pour moi, vous êtes comme mes sœurs.

Mes 3 années de thèse en France ont été marquées par l'enthousiasme, la joie, les surprises et aussi quelquefois les doutes, l'angoisse, la démotivation...Je voudrais remercier tous mes amis cambodgiens et étrangers d'avoir partagé avec moi ces sentiments. Je vous remercie profondément pour votre présence, votre patience, votre soutien et votre encouragement.

Du fond du coeur, je tiens à remercier toute ma famille: Papa, Maman, ma grande mère, mes sœurs, mon petit frère, mon parrain et ma marraine, mon beau frère, mes tantes, mes oncles, mes cousins, cousines, mon neveu Lin Moon Votre amour, votre soutien, vos encouragements permanents m'ont permis d'aller jusqu'au bout de ce long chemin.

Enfin, merci à toi, mon prince, **Sopheap Oeng**, de m'avoir assuré que tu es toujours là, pour moi. Ces années passées en France ont été, pour nous deux, une épreuve à surmonter afin d'atteindre une relation éternelle. Merci de m'aimer si fort tous les jours.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----|
| REMERCIEMENTS | 1 |
| TABLE DES MATIERES | 5 |
| RESUME | 8 |
| LISTE DES ABBREVIATIONS..... | 9 |
| LISTE DES TABLEAUX | 14 |
| LISTE DES FIGURES..... | 15 |
| AVANT PROPOS..... | 17 |
| INTRODUCTION | 18 |
| I. Le diabète de type 2 | 19 |
| 1. Généralités..... | 19 |
| 2. Un bref rappel de la physiologie de l'homéostasie glucidique..... | 19 |
| 2.1. L'Insuline | 20 |
| 2.1.1. Le récepteur à l'insuline..... | 20 |
| 2.1.2. Les facteurs IRS et l'induction de cascades de signalisation | 21 |
| 2.2. L'Insuline et homéostasie glucidique..... | 23 |
| 2.2.1. La régulation de la synthèse du glycogène..... | 23 |
| 2.2.2. La régulation de la glycogénolyse et de la gluconéogenèse..... | 24 |
| 2.2.3. La régulation de la synthèse et de la dégradation des lipides | 24 |
| 3. Pathophysiologie diabétique | 25 |
| 3.1. Evolution du DT2 | 25 |
| 3.1.1. L'insulino-résistance..... | 26 |
| 3.1.1.1. Les mécanismes moléculaires de l'insulino-résistance | 26 |
| 3.1.1.2. Les mécanismes cellulaires de l'insulino-résistance..... | 32 |
| 3.2. Compensation et défaillance des cellules β du pancréas..... | 56 |
| 3.2.1. Compensation par l'expansion de la masse de cellules β | 56 |
| 3.2.2. Compensation par l'augmentation de la fonction des cellules β | 57 |
| 3.2.3. Défaillance des cellules β | 58 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.3. | Origine de la pathologie | 60 |
| 3.3.1. | Le facteur génétique..... | 60 |
| 3.3.1.1. | Le DT2 monogène..... | 60 |
| 3.3.1.2. | Le DT2 polygène..... | 62 |
| 3.3.2. | Les facteurs environnementaux | 64 |
| 3.3.2.1. | Excès en nutriments et obésité..... | 64 |
| 3.3.2.2. | Rôle des polluants et de AhR (aryl hydrocarbure receptor) . | 65 |
| 3.3.3. | La flore intestinale | 66 |
| 3.3.3.1. | Les fonctions de la flore intestinale..... | 67 |
| 3.3.3.2. | La flore intestinale et DT2 | 69 |
| 3.3.3.3. | La flore intestinale et métabolome | 71 |
| II. | Les polyphénols | 73 |
| 1. | Le resvératrol (RSV) | 73 |
| 1.1. | Généralités..... | 73 |
| 1.2. | Pharmacocinétique du RSV | 75 |
| 1.3. | Pharmacologie du RSV..... | 77 |
| 1.3.1. | Effet anti-inflammatoire du RSV | 78 |
| 1.3.2. | Effets du RSV sur AhR | 80 |
| 1.3.3. | Effet antibiotique du RSV..... | 81 |
| 1.3.4. | Le RSV et le DT2..... | 82 |
| 2. | La Curcumine (Cur) | 82 |
| 2.1. | Généralités..... | 82 |
| 2.2. | Pharmacocinétique de la Cur..... | 83 |
| 2.3. | Pharmacologie de la Cur..... | 86 |
| 2.3.1. | Effet anti-inflammatoire de Cur | 87 |
| 2.3.2. | Effet de la Cur sur AhR..... | 89 |
| 2.3.3. | Effet antibiotique de la Cur | 90 |
| 2.3.4. | La Cur et le DT2..... | 90 |

| | |
|---|-----|
| OBJECTIFS DU TRAVAIL | 92 |
| RESULTATS | 95 |
| I. L'article | 96 |
| II. Les résultats supplémentaires..... | 157 |
| 1. Résultats des cytochromes | 157 |
| 1.1. Expression des Cyps dans l'intestin..... | 158 |
| 1.2. Expression des Cyps dans le foie | 160 |
| 1.3. Expression du Cyp2c55 dans l'iléon de différents phénotypes de souris | 161 |
| 2. Discussion | 162 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... | 164 |
| BIBLIOGRAPHIE | 175 |
| ANNEXES | 210 |

RESUME

Le diabète de type 2 (DT2) progresse dans le monde entier de manière alarmante. Les complications sont graves et les traitements sont souvent inefficaces et sont la cause de nombreux effets indésirables. Le resvératrol (RSV) et la curcumine (Cur), deux polyphénols naturels, sont connus pour leurs différentes activités pharmacologiques, y compris antidiabétiques. Les objectifs de cette étude ont été d'évaluer les effets de la combinaison de ces deux polyphénols sur l'amélioration de la tolérance au glucose. Nos résultats montrent que chez des souris soumises à un régime riche en graisse (HFD), le RSV améliore la tolérance au glucose alors que la Cur n'a pas d'effet significatif. De manière surprenante, lorsque les deux polyphénols sont administrés simultanément, la Cur inhibe l'effet du RSV sur l'amélioration de la tolérance au glucose. Pour expliquer cet antagonisme, nous avons évalué l'effet de ces polyphénols associés ou pas sur le métagénome. Nos résultats indiquent que la Cur et le RSV normalisent la flore intestinale altérée par le HFD. Lors d'une association de ces polyphénols, la Cur inhibe aussi l'effet du RSV sur la croissance de certaines espèces bactériennes. Ainsi, la Cur bloque l'effet inhibiteur du RSV sur *Alistipes putredinis*. Nos données indiquent que ces polyphénols sont en général anti-inflammatoires mais leur association peut être synergique *in vitro* ou bien, à l'opposé, antagoniste *in vivo* pour l'expression de certaines cytokines. Afin d'évaluer l'effet physiologique de la modification de la flore intestinale par les polyphénols, nous avons étudié le métabolome. Parallèlement au métagénome, chacun des polyphénols améliore le profil métabolomique altéré par le HFD. Cependant, la Cur s'oppose à l'effet du RSV. Les données de ce travail indiquent que la Cur n'est pas associable au RSV pour améliorer la tolérance au glucose.

LISTE DES ABBREVIATIONS

| | | |
|-------|---|---|
| Abhd5 | : | α/β hydrolase domain-containing protein 5 |
| AGCCs | : | Acides gras à chaîne courte |
| AGs | : | Acides gras |
| AGSs | : | Acides gras saturés |
| AhR | : | Aryl hydrocarbure receptor |
| AMPK | : | AMP-activated protein kinase |
| APC | : | Cellules présentatrices de l'antigène |
| AP-1 | : | Activator protein-1 |
| aPKC | : | PKCs atypiques |
| APL | : | Alkaline phosphatase |
| APS | : | Adapter protein with a pleckstrin homology and an Src homology 2 domain |
| Arnt | : | AhR nuclear translocator |
| ASC | : | Apoptotic speck protein containing a caspase recruitment domain |
| ATF-6 | : | Activating transcription factor 6 |
| ATGL | : | Adipose triglyceride lipase |
| BAD | : | Bcl-2-associated death promoter |
| BaP | : | Benzo(a)pyrene |
| C3G | : | Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor |
| CCR2 | : | Récepteur de MCP-1 |
| CD36 | : | Cluster of differentiation 36 |
| CGS | : | Cibling glycogène subunit |
| Cmax | : | Concentration maximale |
| CMB | : | Concentration minimale bactéricide |
| CMI | : | Concentration minimale inhibitrice |
| CoA | : | Coenzyme A |
| COX | : | Cyclooxygenase |
| cPKC | : | PKCs conventionnelles |
| CPT-1 | : | Carnitine-palmitoyl transferase-1 |
| CREB | : | cAMP response element-binding protein |
| CRKII | : | CT10 (chicken tumor virus number 10) regulator of kinase II |
| CRP | : | C-reactive protein |

| | | |
|-----------------|---|---|
| Cur | : | Curcumine |
| Cyp | : | Cytochrome P450 |
| C/EBP- α | : | CCAAT/enhancer-binding protein |
| DAG | : | Diacylglycérol |
| DGAT | : | Diacylglycérol acyltransferase |
| DGKs | : | Diacylglycérol kinases |
| DMBA | : | Dimethylbenzanthracene |
| DMSO | : | Dimethyl sulfoxide |
| DN | : | Diabète néonatal |
| DNCB | : | 2,4 dinitrochlorobenzene |
| DT2 | : | Diabète de type 2 |
| EGFR | : | Epidermal growth factor receptor |
| ELAM-1 | : | Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 |
| Elk-1 | : | ETS transcription factor |
| ERK | : | Extracellular signal-regulated kinase |
| FFAR-1 | : | Récepteurs des AGs |
| FOXO | : | Forkhead box protein O |
| FSP27 | : | Fat-specific protein 27 |
| G0S2 | : | G0/G1 switch gene2 |
| G-6-P | : | Glucose 6-phosphate |
| Gab-1 | : | Grb2-associated binder-1 |
| GLP-1 | : | Glucagon-like peptide-1 |
| GLUT | : | Glucose transporter |
| GPR | : | G protein-coupled receptor |
| Grb2 | : | Growth factor receptor binding protein |
| GSIS | : | Glucose-stimulated insulin secretion |
| GSK | : | Glycogen synthase kinase |
| GWAS | : | Genome-wide association studies |
| HbA1c | : | Glycated haemoglobin |
| HFD | : | High fat diet |
| HMGA1 | : | High mobility group AT-hook 1 |
| HMGB1 | : | High mobility group box 1 protein |
| HMG-CoA | : | 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A |
| HNF | : | Hepatocyte nuclear factor |

| | | |
|---------------|---|--|
| HSL | : | Hormone-sensitive lipase |
| IAPP | : | Islet amyloïde polypeptide |
| ICAM-1 | : | Inter-cellular adhesion molecule 1 |
| IFN γ | : | Interferon gamma |
| IGF | : | Insulin-like growth factor |
| IL | : | Interleukin |
| IKK | : | I κ B kinase |
| iNOS | : | Inducible nitric oxide synthase |
| IR | : | Récepteur à l'insuline |
| IR-A | : | Récepteur à l'insuline isoforme A |
| IR-B | : | Récepteur à l'insuline isoforme B |
| IRE-1 | : | Inositol-requiring enzyme1 |
| IRF-3 | : | Interferon regulatory factor-3 |
| IRS | : | Insulin receptor substrate |
| JNK | : | c-Jun NH ₂ -terminal kinase |
| LDL | : | Low-density lipoprotein |
| LPO | : | Lipidperoxidation |
| LPS | : | Lipopolysaccharides |
| MC | : | Mastocytes |
| MCC | : | Mastocytes présence de Chymase |
| MCP-1 | : | Monocyte chemoattractant protein 1 |
| MCT | : | Mastocytes présence de Tryptase |
| MCTC | : | Mastocytes présence de Tryptase et Chymase |
| MAP kinase | : | Mitogen-activated protein kinase |
| MEF2 | : | Myocyte enhancer factor-2 |
| MEK | : | Mitogen-activated protein kinase kinases |
| MIP1 α | : | Monocyte inflammatory proteine-1 |
| MMPs | : | Métalloprotéinases |
| MODY | : | Diabète de maturité |
| mPGES-1 | : | Microsomal prostaglandin E synthase-1 |
| mPLK | : | Mouse pelle-like kinase |
| MPO | : | Myeloperoxidase |
| MRSA | : | Methicillin-résistant Staphylococcus |
| MTA | : | Macrophages du tissu adipeux |

| | | |
|--------|---|--|
| mtGPAT | : | Acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase |
| mTOR | : | Mammalian target of rapamycin |
| NF-AT | : | Nuclear factor of activated T cells |
| NF-κB | : | Nuclear factor kappa B |
| NKT | : | Natural killer T |
| NLRP3 | : | Nuclotide-binding domain, leucine-rich repeats containing family, pyrin domain-containing 3 |
| nPKC | : | PKCs nouvelles |
| Nrf2 | : | Nuclear factor like-2 |
| PAGE | : | Parametric analysis of gene set enrichment |
| PAI-1 | : | Plasminogen activator inhibitor-1 |
| PAMPs | : | Pathogen-associated molecular patterns |
| Pax | : | Pair box protein |
| PC | : | Pyruvate carboxylase |
| PCBs | : | Polychlorinated biphenyls |
| PCR | : | Polymerase chain reaction |
| PDK-1 | : | Phosphoinositide-dependent kinase |
| PERK | : | PKR-like eukaryotic initiation factor 2α kinase |
| PGD2 | : | Prostaglandin D2 |
| PGE2 | : | Prostaglandin E2 |
| PH | : | Pleckstrine homology |
| PI3K | : | Phosphatidyl inositol 3 kinase |
| PKA | : | Protéine kinase A |
| PKB | : | Protéine kinase B |
| PKC | : | Protéine kinase C |
| PKR | : | Proteine kinase R |
| PP1 | : | Protéine phosphatase 1 |
| PP2A | : | Proteine phosphatase 2A |
| PPARα | : | Peroxisome proliferator-activated receptor-α |
| PPARγ | : | Peroxisome proliferator-activated receptor-γ |
| PTB | : | Phosphotyrosine-binding |
| PTPase | : | Proteine Tyrosine phosphatase |
| PYY | : | Peptide YY |
| RE | : | Réticulum endoplasmique |

| | | |
|--------------|---|--|
| RI β | : | Sous-unité β de l'RI |
| ROS | : | Reactive oxygen species |
| RSV | : | Resvératrol |
| RTK | : | Récepteur à l'activité tyrosine kinase |
| S6K1 | : | p70 ribosomal protéine S6 kinase |
| Ser/Thr | : | Résidus Sérine/Thréonine |
| SH | : | Src-homology |
| SHC | : | Src-homology 2 domain containing |
| SNPs | : | Single-nucleotide polymorphisms |
| SIRT | : | Sirtuine |
| SOCS | : | Suppressor of cytokine signaling |
| SOS | : | Son of sevenless |
| SRC-1 | : | Steroid receptor coactivator-1 |
| STAT | : | Signal transducer and activator of transcription |
| SULT1A1 | : | Sulfotransferase |
| TCDD | : | 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine |
| TCF7L2 | : | Facteur de transcription 7-like 2 |
| TG | : | Triacyglycérol/Triglycéride |
| TGR5 | : | Récepteur membranaire des acides biliaires |
| TLRs | : | Toll like receptor |
| TNBS | : | Trinitrobenzenesulphonic acid |
| TNF α | : | Tumor necrosis factor α |
| TRAF2 | : | TNF receptor-associated factor 2 |
| UGT1A1 | : | UDP-glycosyltransferase 1 polypeptide A1 |
| UCP2 | : | Uncoupling protein 2 |
| UPR | : | Unfolded protein response |
| UV | : | Radiations ultraviolettes |
| VCAM-1 | : | Vascular cell adhesion molecule 1 |
| VLDL | : | Very low density lipoprotein |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1: Sous-type du diabète monogénique..... | 61 |
| Tableau 2: Gènes et locus les plus répliqués DT2 susceptibilité | 62 |
| Tableau 3: Contenu de RSV dans différentes sources | 74 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1: Voies de signalisation Cbl/CAP de IR..... | 22 |
| Figure 2: Voies de signalisation PI3K et MAP kinase de IRS..... | 23 |
| Figure 3: Effet d'insuline sur l'homéostasie glucidique | 25 |
| Figure 4: Les conséquences potentielles des phosphorylations des protéines IRS sur les Ser/Thr..... | 27 |
| Figure 5: Structure et partenaires d'interaction des IRS..... | 28 |
| Figure 6: L'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline par le SOCS-1 et SOCS-3.. | 30 |
| Figure 7: Les voies impliquées dans l'insulino-resistance dans le muscle. | 39 |
| Figure 8: Les voies du stress du réticulum endoplasmique conduisant à une inflammation..... | 41 |
| Figure 9: L'inflammation et la résistance à l'insuline: voies de signalisation impliquées. | 43 |
| Figure 10: La réponse immunitaire dans le tissu adipeux obèses. | 50 |
| Figure 11: L'évolution de cellules β dans la compensation de l'insulino-résistance. | 56 |
| Figure 12: La flore intestinale et le métabolisme de l'hôte. | 72 |
| Figure 13: Les deux isomères du RSV..... | 75 |
| Figure 14: La voie métabolique du Resvératrol dans l'intestine par les enzymes UGTs. | 76 |
| Figure 15: La voie métabolique du Resvératrol dans le foie par les enzymes SULTs..... | 77 |
| Figure 16: Les effets biologiques du Resvératrol. | 78 |
| Figure 17: Les cibles biologiques moléculaires supposées du Resvératrol dans les processus anti-inflammatoires et anti-oxydantes..... | 80 |
| Figure 18: Les deux isomères de Curcumine..... | 83 |
| Figure 19: Les structures de la Curcumine et ses métabolites | 85 |
| Figure 20: Modulation par la Curcumine de l'expression de différentes molécules de signalisation cellulaire..... | 86 |

| | |
|--|-----|
| Figure 21: Mécanisme d'action de la Curcumine sur la voie de signalisation de NF- κ B.. | 88 |
| Figure 22: Expression de Cyps dans le colon. | 159 |
| Figure 23: Expression de Cyps dans l'iléon..... | 160 |
| Figure 24: Expression de Cyps dans le foie..... | 161 |
| Figure 25: Expression de Cyp2c55 et Cyp2e1 dans différents types de souris..... | 162 |
| Figure 26: Sites d'action possibles du HFD et des polyphénols | 165 |
| Figure 27: Hypothèse concernant les sites d'action possibles du HFD et des polyphénols et leurs relations hiérarchiques..... | 173 |

AVANT PROPOS

Le diabète de type 2 est actuellement une préoccupation majeure en santé publique. En effet, nous assistons à une augmentation de cette pathologie au niveau planétaire. De nombreuses causes ont été identifiées comme l'alimentation, la pollution, les modifications de flore intestinale

Nous aborderons dans ce manuscrit les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance à l'insuline. Puis, nous tenterons de décrire de façon exhaustive les différentes causes mises en jeu dans l'apparition de cette pathologie. Etant donné que cette maladie est complexe, la plupart de traitements médicamenteux sont un échec associé à de nombreux effets indésirables. Certaines molécules naturelles comme les polyphénols ont été décrites comme efficaces dans l'amélioration de la tolérance au glucose. Nous porterons un intérêt particulier à deux polyphénols: le resvératrol et la curcumine. Aucune donnée actuelle portant sur l'association de ces deux molécules dans le traitement du diabète n'est à ce jour disponible. Aussi, dans ce travail, nous étudierons l'association de ces deux molécules et leur impact sur l'inflammation intestinale, le microbiote et le métabolome.

Introduction

I. Le diabète de type 2

1. Généralités

Le diabète de type 2 (DT2), appelé également 'diabète non insulino-dépendant', constitue une maladie métabolique caractérisée par une concentration sanguine en glucose supérieure à celle normalement observée durant l'état de jeûne. Cette augmentation est la conséquence d'un défaut d'activité de l'insuline ou/et d'un dysfonctionnement des cellules β pancréatiques présentant un défaut de sécrétion de l'insuline. Le DT2 pose actuellement un problème crucial de santé publique au niveau mondial car il touche plus de 170 millions d'individus et cette pandémie devrait s'étendre à 366 millions de personnes en 2030. Le DT2 représente 90% des diabètes totaux et ses conséquences en termes de pathologies associées peuvent s'avérer graves. Parmi elles, citons la rétinopathie, la néphropathie, la neuropathie périphérique et centrale, l'angiopathie, et les maladies cardiovasculaires.

2. Un bref rappel de la physiologie de l'homéostasie glucidique

Les hétérotrophes ont besoin de se nourrir pour obtenir, entre autres, l'énergie nécessaire au fonctionnement de leur organisme. Au quotidien, la variabilité de la disponibilité des différents nutriments et de leur contenu en carbohydrates requiert que les hétérotrophes possèdent un système permettant de régler l'équilibre entre le taux de carbohydrates circulant (glucose) et celui stocké (glycogène). Ces sucres sont stockés lors de la prise alimentaire et transférés dans la circulation lors du jeûne. Ce système est appelé 'Homéostasie glucidique'. Chez l'homme, la glycémie est ainsi maintenue en toutes circonstances à une valeur comprise entre 0,8 et 1,2 g/L (1).

Dès l'absorption des nutriments, des cellules intestinales spéciales appelées 'glucostat' ou bien 'senseur de glucose' sont capables d'évaluer le taux de glucose. Elles envoient, via le nerf vague, des signaux destinés à l'hypothalamus, ce qui constitue l'axe 'intestin-cerveau'. Ces cellules glucostats sont également trouvées dans la veine porte, le pancréas, les corps carotidiens, et le cerveau lui-même. En réponse à ces signaux soit d'augmentation soit de diminution de la glycémie, l'hypothalamus envoie des signaux en retour destinés aux organes métaboliques principaux tels que le foie, le tissu adipeux, le muscle. Ainsi lors d'une hyperglycémie, ces tissus vont capter le glucose sanguin afin de rétablir une glycémie normale. Dans le cas inverse, le foie sécrètera du glucose, tandis que le tissu adipeux fera de la lipolyse. Placées sous le contrôle du système nerveux,

deux hormones fondamentales participent à la régulation de l'homéostasie glucidique: l'insuline et le glucagon.

2.1. L'Insuline

L'insuline est une hormone polypeptidique constituée d'un hétérodimère d'une masse moléculaire de 6 kDa. Cette hormone hypoglycémisante dérive d'un précurseur de 11,5 kDa (la pré-pro-insuline) qui est synthétisé par les cellules β du pancréas. Lors d'une augmentation du glucose plasmatique, le transporteur de glucose membranaire des cellules β (GLUT1 chez l'homme et GLUT2 chez les rongeurs) prend en charge le glucose. Celui-ci pénètre dans la cellule β . Cette augmentation de la teneur intracellulaire en glucose conduit à la sécrétion des granules d'insuline dans le sang. L'insuline sécrétée se distribue dans la circulation générale pour atteindre ses tissus cibles où le glucose sera utilisé ou stocké.

2.1.1. Le récepteur à l'insuline

L'insuline est captée par les organes effecteurs via son récepteur appelé 'récepteur à l'insuline'.

Le récepteur à l'insuline (IR) appartient à une superfamille de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Il existe deux isoformes du IR, IR-A et IR-B qui se différencient par respectivement l'absence ou la présence de l'exon 11 dans leur séquence d'ADN. IR-B amplifie plus fortement les signaux délivrés par l'insuline par rapport à IR-A et ce malgré une affinité plus faible pour l'insuline. Notons que IR-A possède une haute affinité pour l'IGF-2 (Insulin-like growth factor 2) qui est un facteur ayant une séquence et une structure semblable à celle de l'insuline. L'IR est constitué d'un hétérotétramère, composé de deux sous-unités α orientées vers l'extérieur de la cellule et de deux sous-unités transmembranaires β . L'insuline, en se fixant aux sous-unités α externes, induit sur celles-ci une transconformation qui influence, à travers la membrane plasmique, les sous-unités β , activant ainsi leur domaine tyrosine kinase intracellulaire. La sous-unité β peut s'associer du côté cytosol de la cellule à des partenaires et ainsi elle est capable, grâce à son activité kinasique, de phosphoryler certains résidus tyrosine spécifiques de ces partenaires, lesquels incluent les IRS (1 à 6) (insulin receptor substrate), Grb2 (growth factor receptor binding protein), Gab-1

(Grb2-associated binder-1), P60dok, Cbl, APS (adapter protein with a pleckstrin homology and an Src homology 2 domain) et les isoformes SHC (Src homology 2 domain containing) (2,3).

2.1.2. Les facteurs IRS et l'induction de cascades de signalisation

Les facteurs IRS constituent les cibles majeures de l'activité protéine kinase du IR. Ils contiennent un domaine conservé PH (pleckstrine homology) situé en position N-terminal. Ce domaine permet la fixation à proximité du IR de phosphoinositides (4). Il est flanqué d'un autre domaine, le PTB (phosphotyrosine-binding), qui permet aux protéines IRS de se lier aux différents récepteurs comme le IR, ou le récepteur à l'IGF-1 ainsi qu'à d'autres récepteurs (5). La région C-terminale des protéines IRS contient plusieurs sites de phosphorylation constitués de résidus Tyrosine. Ces sites servent de sites de fixation pour des protéines contenant un domaine SH2 (Src-homology de type 2), comme la sous-unité régulatrice p85a de la PI3K (Phosphatidyl inositol 3 kinase). Ainsi trois grandes voies de signalisation dont deux appartiennent à IRS servent à propager des signaux en réponse à l'activation de l'IR par l'insuline. Elles impliquent respectivement la PI3K, la MAP kinase (mitogen-activated protein kinase) et les facteurs Cbl/CAP (6).

La cascade Cbl/CAP induit le transport de glucose: après avoir été phosphorylé par le IR, ce complexe Cbl/CAP se transloque vers la membrane et se fixe alors à un domaine lipidique de la membrane par une protéine adaptatrice, CRKII (CT10 (chicken tumor virus number 10) regulator of kinase II) (Figure 1). Cette dernière forme elle-même un complexe avec les partenaires C3G (Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor) et TC10 favorisant par la suite la translocation de vésicules contenant le transporteur du glucose GLUT4 vers la membrane plasmique (6,7).

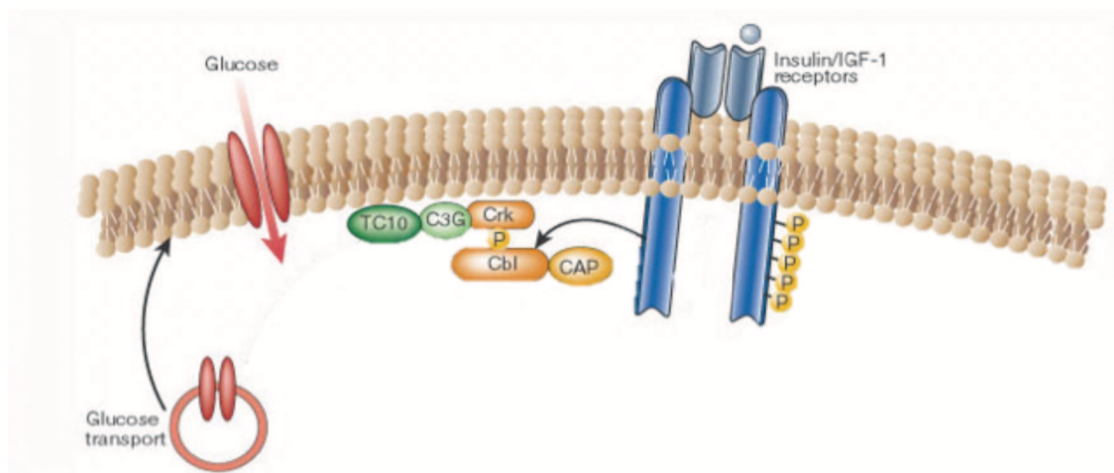


Figure 1: Voies de signalisation Cbl/CAP de IR

Cette voie favorise le métabolisme du glucose en augmentant la capture cellulaire de glucose par GLUT4. Cbl: Casitas B-lineage Lymphoma; CAP: Cbl-associated protein (Figure modifiée d'après (6)).

La cascade des MAP kinases conduit à une croissance cellulaire accrue via l'activation de Grb2 et SOS (Son of sevenless) (Figure2). Ceux-ci conduisent à une translocation de protéines ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase), kinases de la famille des MAP kinase, vers le noyau où ERK1/2 phosphoryle ensuite un certain nombre de facteurs ou co-facteurs de transcription tels que SRC-1 (steroid receptor coactivator-1), Pax6 (pair box protein), NF-AT (nuclear factor of activated T cells), Elk-1 (ETS transcription factor), MEF2 (myocyte enhancer factor-2), c-Fos, c-Myc, et STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) qui régulent l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire (7,8).

La cascade de la PI3K est activée par des protéines IRS pour déclencher les fonctions métaboliques de l'insuline (9,10) (Figure 2). En aval des protéines IRS, la PI3K est l'un des effecteurs le mieux caractérisé. Il s'associe aux protéines IRS phosphorylées sur des résidus Tyrosine via la stimulation par l'insuline et catalyse alors la formation du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, qui, lui, stimule l'activité de la PDK-1 (phosphoinositide-dependent kinase) et déclenche l'activation d'autres effecteurs comme la protéine kinase B (PKB/Akt), mTOR (mammalian target of rapamycin) et la S6K1 (p70 ribosomal protéine S6 kinase) ainsi que des isoformes atypiques de PKC (PKC ζ/λ) (protéine kinase C). Ces derniers conduisent enfin au transport du glucose, à la synthèse du glycogène et à l'augmentation globale de la synthèse protéique (11,12).

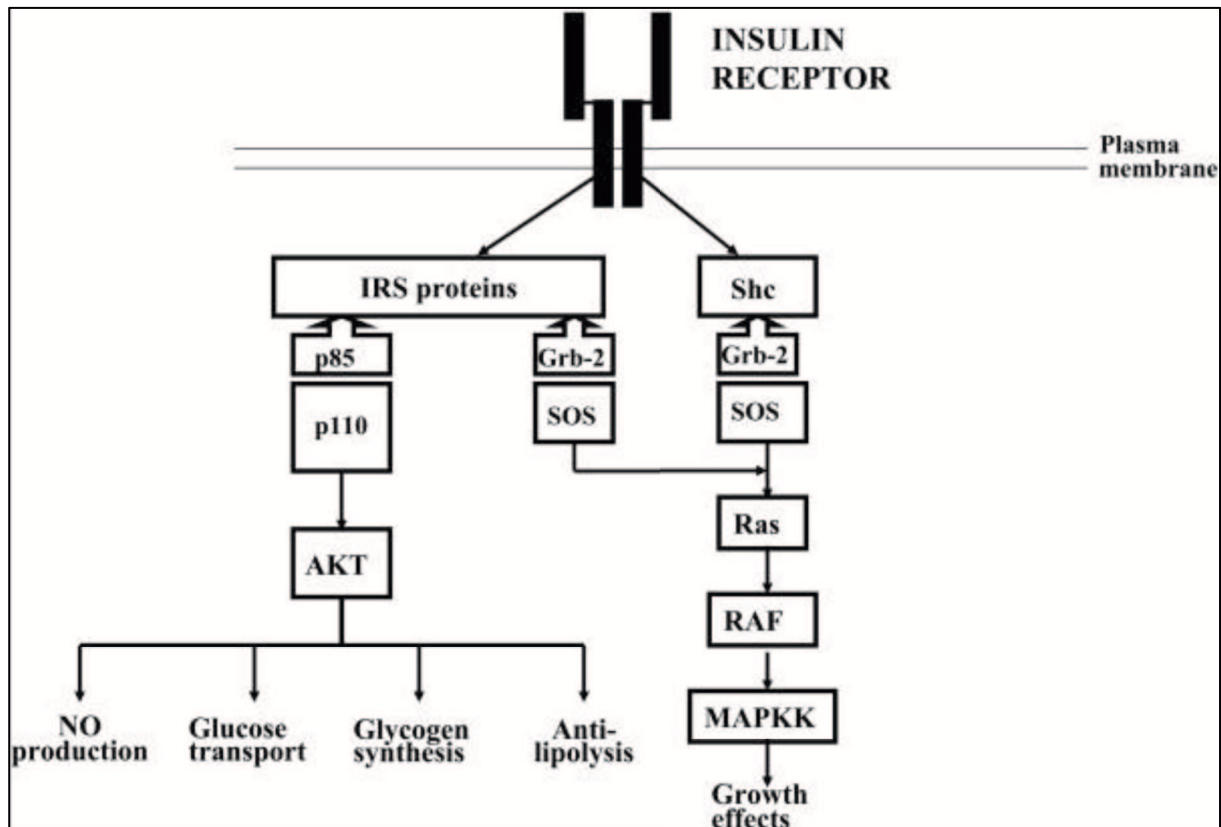


Figure 2: Voies de signalisation PI3K et MAP kinase de IRS

L'insuline a deux grandes voies de signalisation: une qui utilise la voie PI-3 régule l'activité métabolique, et l'autre qui utilise la MAP kinase régule l'activité mitogène. Dans une cellule normale, ces activités sont équilibrées. IRS: le substrat du récepteur de l'insuline. MAPKK: mitogen-activated protein kinase kinase (13).

2.2. L'Insuline et homéostasie glucidique

2.2.1. La régulation de la synthèse du glycogène

La synthèse du glycogène se fait principalement dans le foie et le muscle (Figure 3). L'insuline stimule l'accumulation du glycogène via l'augmentation du transport du glucose et la synthèse du glycogène. Le taux du glycogène est régulé par deux enzymes: la glycogène phosphorylase et la glycogène synthétase. La première agit plutôt en faveur de la dégradation du glycogène et la seconde permet sa synthèse. L'insuline active la glycogène synthétase en favorisant sa déphosphorylation par l'inhibition de kinases telles que la PKA ou la GSK3 (glycogen synthase kinase), et par l'activation de la protéine phosphatase 1 (PP1). Lors de l'activation en aval de PI3K, Akt phosphoryle et inactive la GSK3, ce qui diminue le taux de phosphorylation de la glycogène synthétase, augmentant donc son état d'activité (14). L'insuline n'a pas d'effet direct sur la PP1 mais active plutôt le CGS (cibling glycogène subunit) qui sert «d'échafaudage moléculaire», en réunissant

directement la PP1 avec son substrat, ainsi que la glycogène synthase et la glycogène phosphorylase dans un complexe macromoléculaire (15).

2.2.2. La régulation de la glycogénolyse et de la gluconéogenèse

L'insuline inhibe la production et la sécrétion du glucose par le foie via le blocage de la glycogénolyse et de la gluconéogenèse (Figure 3). L'insuline contrôle directement les activités d'un ensemble d'enzymes métaboliques via leur phosphorylation ou leur déphosphorylation et aussi via l'expression des gènes codant pour les enzymes hépatiques de la gluconéogenèse et de la glycolyse (16). Elle inhibe la transcription du gène codant pour la phosphoénolpyruvate carboxylase qui catalyse une étape limitante de la vitesse de la gluconéogenèse (17). L'hormone diminue également la transcription des gènes codant pour la fructose-1,6-diphosphatase et la glucose-6-phosphatase, et augmente la transcription des enzymes glycolytiques telles que la glucokinase et le pyruvate kinase.

2.2.3. La régulation de la synthèse et de la dégradation des lipides

L'insuline favorise également la synthèse de lipides et inhibe la lipolyse (Figure 3). Dans les adipocytes, le glucose est transformé en trioses puis en glycérol qui est stocké principalement sous forme de triglycérides. Ce type de stockage peut augmenter grâce à une stimulation de l'absorption du glucose et à l'activation d'enzymes impliquées dans la synthèse des lipides, y compris la pyruvate déshydrogénase, l'acide gras synthase et l'acétyl-CoA carboxylase qui est induite par l'insuline. L'hormone bloque également la lipolyse via l'inhibition de la lipase HSL (hormone-sensitive lipase) (18), ceci en réduisant le taux d'AMPc dans les cellules adipeuses via l'activation d'une phosphodiesterase spécifique de l'AMPc (19). La diminution de AMPc mène à une chute du niveau d'activité de la PKA (protéine kinase A), qui est indispensable dans l'activation de cette lipase.

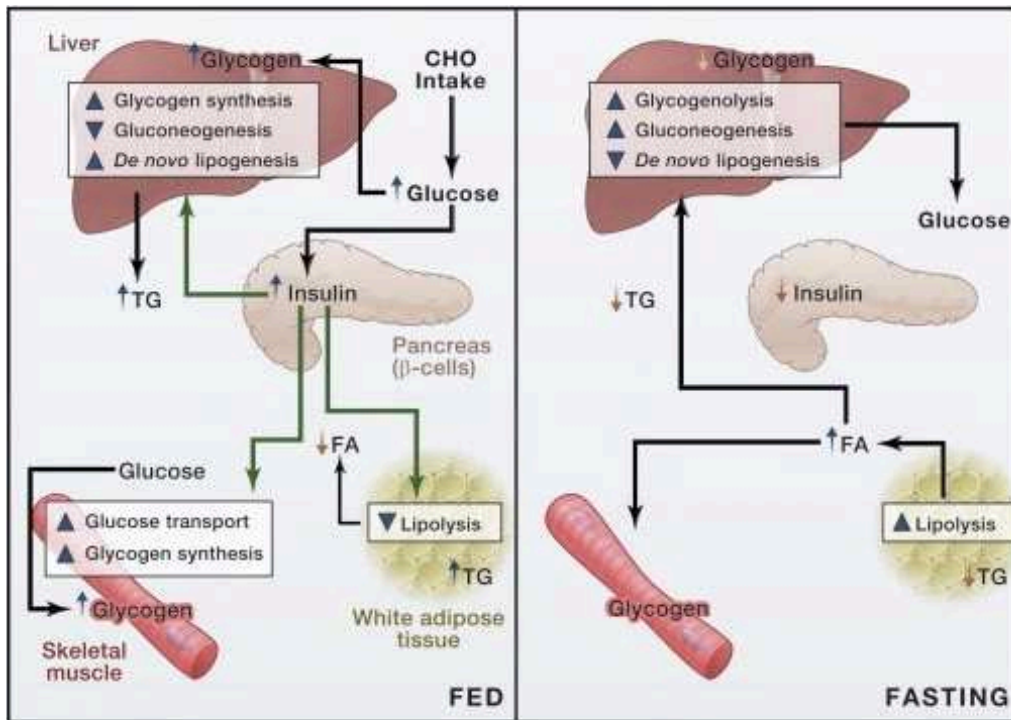


Figure 3: Effet de l'insuline sur l'homéostasie glucidique

Partie de Gauche: Les carbohydrates alimentaires (CHO) augmentent la glycémie et favorisent la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. L'insuline possède de nombreuses actions visant à promouvoir le stockage des calories alimentaires, mais seulement quelques-unes sont illustrées ici. **Dans le muscle squelettique,** l'insuline augmente le transport du glucose, permettant l'entrée du glucose et la synthèse du glycogène. **Dans le foie,** l'insuline favorise la synthèse du glycogène et de la lipogenèse de novo, en inhibant en même temps la gluconéogenèse. **Dans le tissu adipeux,** l'insuline inhibe la lipolyse et favorise la lipogenèse. **Partie de Droite:** dans l'état de jeûne, la sécrétion d'insuline est diminuée. La baisse de l'insuline ainsi que l'action d'autres hormones non représentées sert à augmenter la gluconéogenèse hépatique et favorise la glycogénolyse. La production de lipides hépatiques diminue tandis que la lipolyse adipeuse augmente. FA: fatty acids; TAG: triacylglycerol. (figure modifiée d'après (20)).

3. Pathophysiologie diabétique

3.1. Evolution du DT2

L'évolution ultime du DT2 survient lorsque les cellules β du pancréas n'arrivent plus à sécréter des quantités suffisantes d'insuline pour compenser l'échec de la signalisation par l'insuline. En effet, la résistance à l'insuline force les cellules β pancréatiques à compenser par une production accrue d'insuline, ce qui se traduit par une prolifération des cellules β et par une augmentation de la biosynthèse et de la sécrétion de l'insuline. Tant que les cellules β arrivent à compenser le besoin des cellules périphériques en insuline, le taux plasmatique de glucose reste proche de la normale. Mais finalement, le pancréas parvient à un dysfonctionnement par une défaillance de sa

fonction de producteur d'insuline et la quantité d'insuline sécrétée devient insuffisante et l'hyperglycémie à jeûn apparaît, c'est alors l'installation de l'état diabétique.

3.1.1. L'insulino-résistance

3.1.1.1. Les mécanismes moléculaires de l'insulino-résistance

L'insulino-résistance commence lorsque les cellules effectrices se trouvent dans l'impossibilité de répondre à l'action normale de l'insuline. Plusieurs facteurs comportant des mécanismes d'action différents peuvent expliquer ce phénomène. L'altération de la voie de signalisation intracellulaire ainsi que celle du récepteur à l'insuline peut entraîner dans les cellules cibles une perte de la sensibilité à cette hormone.

3.1.1.1.1. Phosphorylation des résidus Serine/Thréonine (Ser/Thr) de protéines IRS

Les protéines IRS contiennent des sites de phosphorylation de résidus Ser/Thr (Figure 4). La phosphorylation de résidus Ser/Thr régule négativement les signaux de l'insuline et ce processus est considéré comme un rétrocontrôle négatif de l'action de l'insuline (3,21). Certaines de ces phosphorylations peuvent induire soit la dissociation des protéines IRS à partir du récepteur à l'insuline (22) soit la dégradation des protéines IRS (23). D'autres phosphorylations peuvent bloquer des sites de phosphorylation sur des Tyrosines situées sur les protéines IRS (24) ou bien libérer les protéines IRS à partir des complexes intracellulaires qui les maintiennent à proximité du récepteur (25) ou encore induire une transconformation de la protéine IRS qui devient un inhibiteur de la kinase du IR (26).

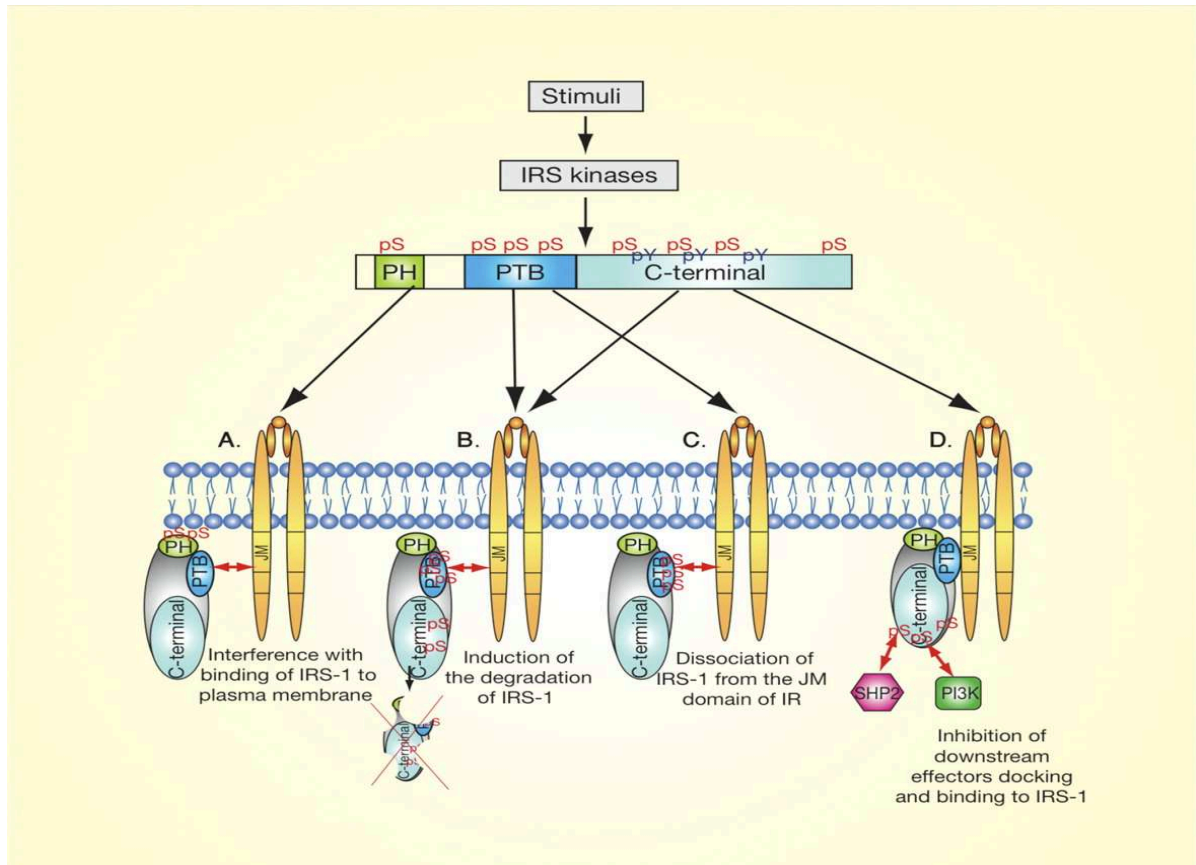


Figure 4: Les conséquences potentielles des phosphorylations des protéines IRS sur les Ser/Thr

Les protéines IRS contiennent un domaine PH à leur extrémité NH₂ suivi d'un domaine PTB. Ce dernier favorise l'interaction des protéines IRS avec le domaine JM de IR, qui phosphoryle les protéines IRS dans leur région C-terminale. Les protéines IRS Tyr-phosphorylées servent ensuite, en aval, comme molécules réceptrices pour les effecteurs tels que PI3K et phosphotyrosine phosphatase 2 (SHP-2). La stimulation prolongée par l'insuline et par les autres stimuli déclenchés par des inducteurs de résistance à l'insuline permet d'activer les kinases de l'IRS qui autophosphorylent les IRS, tel que IRS-1, sur le résidu Ser/Thr. Cette phosphorylation induit plusieurs effets:

A: la phosphorylation des résidus Ser situés dans le domaine PH interfère avec la liaison de l'IRS-1 avec le récepteur. **B et C:** la phosphorylation de résidus Ser/Thr du domaine PTB ou de la région C-terminale de l'IRS-1 induit simultanément la dissociation entre l'IRS-1 et le récepteur et la dégradation de IRS-1. **D:** la phosphorylation de résidus Ser dans la région C-terminale interrompt la liaison de IRS-1 à ses effecteurs situés en aval.

IRS: insulin receptor substrate; PH domain: pleckstrin homology domain; PTB domain: phosphotyrosine binding domain; JM: juxtamembrane; IR: insulin receptor; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase (3).

Les résidus Ser/Thr des IRS peuvent être phosphorylés par différentes protéines kinases, qui se divisent en 2 grandes catégories (Figure 5). L'une comprend des kinases qui sont des médiateurs de la signalisation de l'insuline qui régulent négativement les protéines IRS lors de la stimulation prolongée de l'insuline. Dans cette catégorie, on

trouve les MAP kinase (27), la mTOR/S6K1 (28), et la PKC ζ (29,30). L'autre catégorie est constituée de kinases qui sont activées par des voies non liées à l'action de rétrocontrôle de l'insuline. Il s'agit de la GSK-3 β (31), d'IKK β (I κ B kinase)(32), de JNK (c-Jun NH2-terminal kinase)(33), de la mPLK (mouse pelle-like kinase)(34), et de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) (35). De nombreux sites potentiels constitués de résidus Ser/Thr sur les IRS ont été identifiés et sont impliqués dans la perturbation des signaux de l'insuline via IRS (Ser^{24, 67, 265, 302,...}) (3).

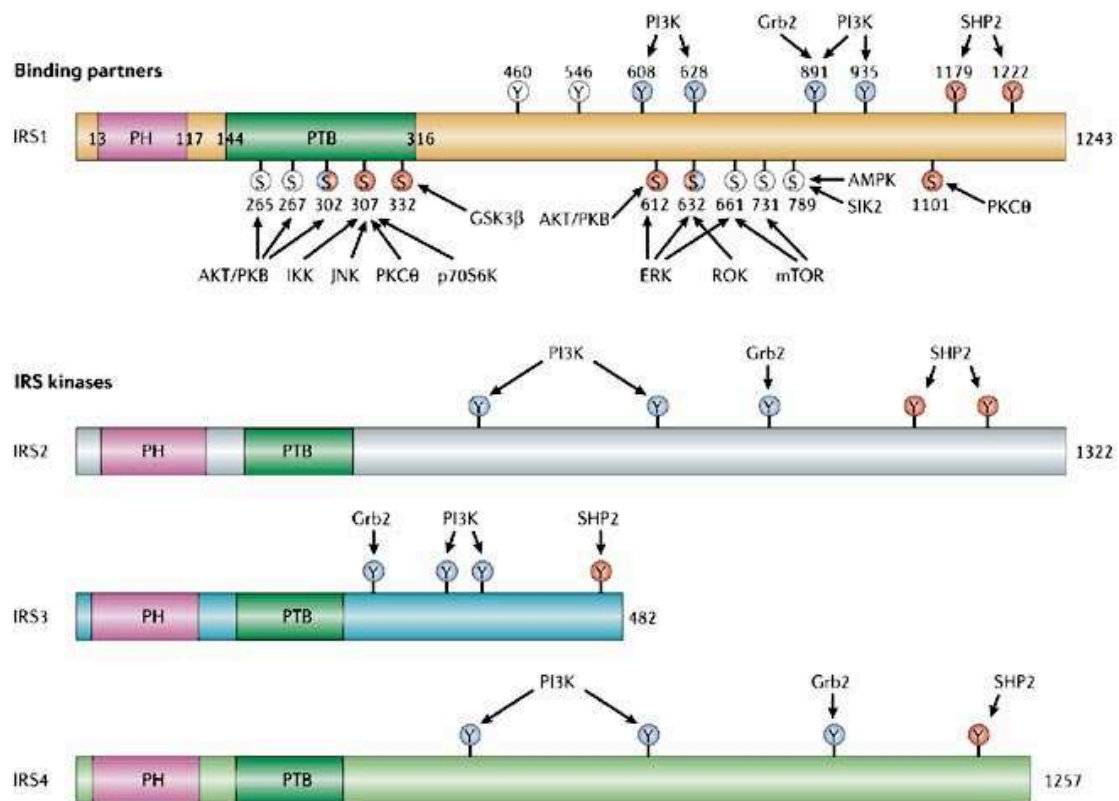


Figure 5: Structure et partenaires d'interaction des IRS.

Les quatre isoformes du substrat du récepteur à l'insuline, IRS1, IRS2, IRS3 et IRS4, partagent un domaine PH (magenta), un domaine PTB (vert foncé) et plusieurs sites de phosphorylation sur des résidus tyrosine et sérine. Les positions des résidus de tyrosine (Y) qui sont phosphorylés par l'IR et les protéines de signalisation en aval se lient à ces sites sont représentés. Les positions des résidus de sérine (S) et les kinases responsables de leur phosphorylation sont également représentés. Les cercles bleus représentent des sites de régulation positive, tandis que les cercles rouges représentent des sites de régulation négative. Une combinaison des deux couleurs montre des sites où, selon les conditions, la signalisation s'avère être soit positive soit négative. Les cercles blancs représentent des sites pour lesquels l'effet de la phosphorylation est actuellement inconnu. Plusieurs protéines se lient à ou phosphorylent IRS, y compris PI3K, Grb2, SHP2, AKT/PKB, IKK, JNK, PKC θ , p70S6K, GSK3 β , ERK, ROK, mTOR, AMPK, SIK2.

IRS: insulin receptor substrate; PH domain: pleckstrin-homology; PTB domain: phosphotyrosine binding; IR: insulin receptor; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; Grb2: growth-factor-receptor-bound protein-2; SHP2: Src-homology-2 (SH2) domain-containing tyrosine phosphatase-2; PKB:

protein kinase B; IKK: I κ B kinase; JNK: c-Jun-N-terminal kinase; PKC θ : protein kinase C θ ; p70S6K: p70 ribosomal protein S6 kinase; GSK3 β : glycogen synthase kinase-3 β ; ERK: extracellular signal-regulated kinase; ROK: Rho kinase; mTOR: mammalian target of rapamycin; AMPK: AMP-activated protein kinase; SIK2: salt-inducible serine/threonine kinase 2 (7).

3.1.1.1.2. Dégradation de protéines IRS

Le blocage des signaux de l'insuline peut survenir également via la dégradation des protéines IRS. Comme on le voit ci-dessus, la dégradation de IRS constitue une des conséquences de la phosphorylation de résidus Ser/Thr portés par ce facteur. Des études récentes ont, en outre, montré que les inhibiteurs des signaux de cytokines comme SOCS (suppressor of cytokine signaling) participent activement à cette dégradation.

Les SOCS comprennent huit membres réunis dans une famille (SOCS-1 à 7 et CIS) qui ont tous en commun un domaine central SH2 lié aux résidus phosphotyrosine à l'extrémité C-terminale et un domaine NH2 de longueur variable dont le rôle, pour l'heure, n'est pas identifié. La région SH2 contient aussi une boîte 'SOCS' qui régule la dégradation protéasomale des protéines interagissant avec SOCS (36). Les SOCS ont été très étudiés en raison de leur rôle dans l'insulino-résistance. Trois mécanismes d'action des SOCS dans la résistance à l'insuline ont été identifiés: 1) la dégradation des protéines IRS, 2) la fixation de SOCS à l'IR inhibant l'interaction de l'IR à IRS, et 3) l'inhibition de l'activité Tyrosine kinase de l'IR (Figure 6).

1) L'interaction des SOCS et en particulier SOCS-1 et SOCS-3, aux IRS-1 et -2 phosphorylés au niveau de leurs tyrosines entraîne la dégradation de ces derniers par le protéasome (37).

2) SOCS-3 est capable d'interagir avec la phosphotyrosine 960 de l'IR lors d'une stimulation par l'insuline. Cela empêche l'association des protéines IRS-1 et IRS-2 avec l'IR menant en aval au blocage des signaux (38).

3) Enfin, il est établi que SOCS-1 et SOCS-6 peuvent inhiber l'activité kinase de l'IR et par la suite diminuer la phosphorylation des résidus Tyrosine de IRS-1, laquelle est nécessaire à la signalisation par l'insuline (39).

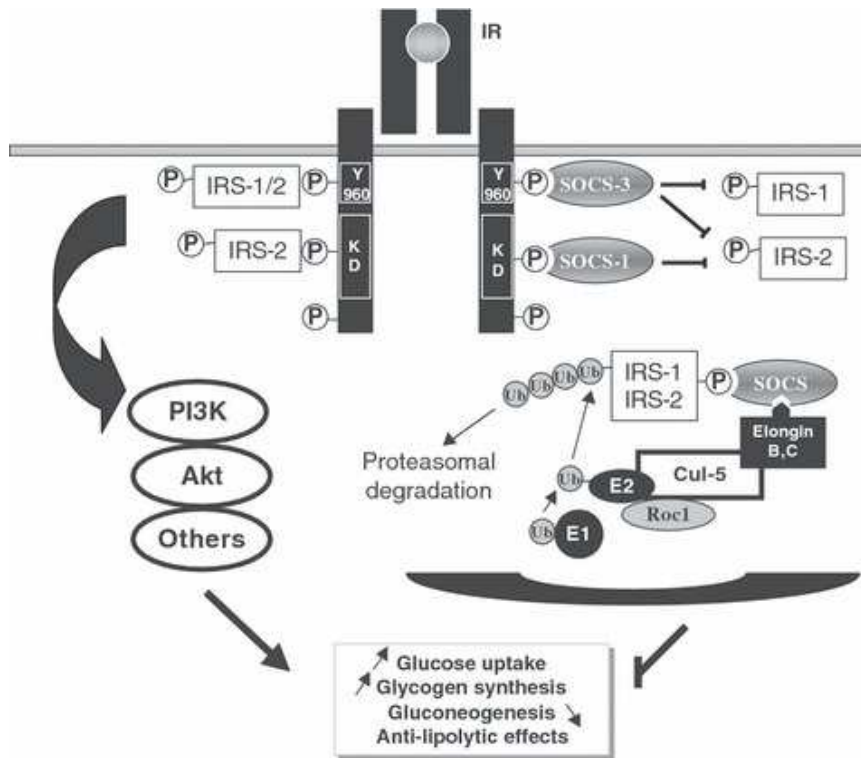


Figure 6: L'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline par le SOCS-1 et SOCS-3.

La phosphorylation de IRS par le IR induit le cascade de signal intracellulaire (PI3K, Akt, ...) pour aboutir enfin à l'effet de l'insuline sur le métabolisme glucidique. Les SOCS peuvent concurrencer avec la IRS sur la fixation sur le résidu Tyr 960 du IR. Les SOCS peuvent également se fixer sur les IRS et entraîner la dégradation de ces dernières par la protéasome. Enfin, les SOCS peuvent inhiber l'activité kinase du IR.

Cul: cullin; E1: enzyme 1; E2: enzyme 2; IR: insulin receptor; IRS: insulin receptor substrate; KD: kinase domain; PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase; Roc1: regulator of cullin 1; SOCS: suppressor of cytokine signalling; Ub: ubiquitin; Y: tyrosine residue (40).

3.1.1.1.3. Diminution d'expression de IR

La diminution de l'expression de l'IR participe aussi à la résistance à l'insuline. Contrairement aux autres PKCs qui bloquent des signaux de l'insuline via la phosphorylation de résidus Ser/Thr, la PKC ϵ est impliquée dans la diminution de l'expression de la sous-unité β de l'IR (IR β) et ainsi induit l'insulino-résistance. Après avoir été phosphorylée par les AGs, la PKC ϵ se transloque dans le noyau et altère la fonction du HMGA1 (high mobility group AT-hook 1) impliqué dans la régulation transcriptionnelle de IR β (41).

3.1.1.1.4. Déphosphorylation des résidus Tyrosine de IR et des protéines IRS

Comme on l'a vu, l'effet de l'insuline se propage via la phosphorylation des résidus Tyrosine de IR et de IRS qui conduit ensuite à différentes cascades de signaux intracellulaires. Cependant, cette phosphorylation est réversible et la déphosphorylation se produit via l'activité de la PTPase (proteine Tyrosine phosphatase). Ainsi, dans un état d'insulino-résistance tissulaire, cette protéine est présente à un taux élevé dans différents tissus tels que le muscle et le tissu adipeux (42,43).

3.1.1.1.5. Augmentation de la sous-unité P85

La signalisation de l'insuline passe principalement via la voie IRS/PI3K. La PI3K est un hétérodimère constitué d'une sous-unité régulatrice p85 associée à une sous-unité catalytique, p110. A l'état normal, les monomères p85 à l'état libre sont en équilibre avec l'hétérodimère p85-p110. Le monomère p85 et l'hétérodimère p85-p110 peuvent tous les deux se lier à un résidu tyrosine des protéines IRS phosphorylées. Seule l'interaction entre l'hétérodimère et l'IRS conduit à une signalisation par l'insuline. Dans ce processus, une augmentation du monomère p85 à l'état libre pourrait provoquer une diminution d'activité de la PI3K (44) entraînant une interruption de la signalisation par l'insuline.

3.1.1.1.6. Blocage d'activité d'Akt

L'inhibition de l'activité d'Akt, la molécule effectrice en aval de PI3K, peut également moduler l'activation médiée par l'insuline. L'inhibition de Akt peut se faire via l'activation de PP2A (proteine phosphatase 2A) ou bien par la phosphorylation de PKC ζ .

L'activation de la PP2A peut mener à la déphosphorylation d'Akt et donc interrompre la signalisation par l'insuline (45).

La phosphorylation de la PKC ζ peut aussi conduire à l'inactivation d'Akt via la phosphorylation de la Ser34 située dans le domaine pleckstrine d'Akt. Cette phosphorylation inhibe la liaison d'Akt au 3-phosphatidylinositol, un cofacteur nécessaire à l'activation d'Akt (46).

3.1.1.2. Les mécanismes cellulaires de l'insulino-résistance

De nombreuses études ont été réalisées pour tenter d'expliquer les mécanismes physiologiques et cellulaires conduisant à la résistance à l'insuline. Différents facteurs tels que l'accumulation lipidique extra et intracellulaire, le stress du réticulum endoplasmique, l'inflammation et le rôle des cellules immunitaires ont été étudiés.

3.1.1.2.1. Accumulation de lipides

L'association entre le métabolisme lipidique et l'insulino-résistance a été particulièrement étudiée. La première étude, réalisée par Randle et ses collègues, suggérait dès 1963 (47) que les AGs altèrent l'action de l'insuline dans l'absorption du glucose par le muscle via l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase. Ceci se traduit par la réduction de l'oxydation du glucose et par l'accumulation des intermédiaires de la glycolyse. Par la suite, d'autres travaux ont confirmé cette interaction entre le métabolisme lipidique et l'insulino-résistance. En 1997, Jucker et ses collègues (48) ont montré qu'une perfusion aiguë de lipides chez les rats réduit l'utilisation du glucose par les myocytes et augmente la concentration de glucose 6-phosphate (G-6-P) intramyocytaire. Ceci pourrait s'expliquer par l'inhibition de la glycolyse due à l'altération du signal de l'insuline. Des études ultérieures ont confirmé que l'insulino-résistance dans le muscle squelettique induite par les lipides peut être attribuée à l'altération du signal de l'insuline et à la diminution du transport de glucose qui est habituellement stimulé par l'insuline (49,50).

A ce stade des données, nous pouvons émettre deux hypothèses concernant les mécanismes impliqués dans ces phénomènes: ou bien les AGs circulants activeraient les voies de signalisation intracellulaires interférant avec celles qui sont sous la dépendance de l'insuline (51), ou bien les lipides intracellulaires s'accumuleraient en entraînant des dysfonctionnements cellulaires conduisant ainsi à l'insulino-résistance (20).

a. Les AGSs circulants

L'existence d'une relation entre l'augmentation du taux des AGs libres circulants et l'insulino-résistance a été établie (52,53). Il est important de noter que la nature des lipides ingérés présente un fort impact sur la composition des AGs circulants (54).

Les AGSs possèdent une activité pro-inflammatoire car ils peuvent, en effet, activer les voies de signalisation de l'inflammation tels que JNK1/AP-1 (activator protein-1) et IKK β /NF- κ B. Cette induction d'un processus inflammatoire se traduit par la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, lesquelles interfèrent avec les voies de signalisation de l'insuline dans différents types cellulaires tels que les macrophages, les adipocytes, les myocytes, les hépatocytes ... etc (14–17). Cet effet pro-inflammatoire de AGSs se réalise principalement via la stimulation des récepteurs TLR4 et/ou TLR2 (57,59,60) (Figure 7). Les TLRs sont connus comme les récepteurs de PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) et de substances endogènes sécrétées lors de lésions tissulaires (61). De quelle manière les AGSs peuvent-ils stimuler les TLRs?

- La première possibilité fait intervenir des protéines liées aux AGSs fonctionnant comme corécepteur des TLRs. Il s'agit par exemple, du CD36 (cluster of differentiation 36) (transporteur des acides gras et récepteur des LDL oxydées (low-density lipoprotein)) qui peut interagir avec le TLR2 (62).
- Deuxièmement, les AGSs peuvent s'insérer dans un domaine spécifique de la membrane appelé 'Lipid Rafts'. Ceci se traduit par une augmentation de la dimérisation de TLR4 et du recrutement de c-Src. Cela entraîne la stimulation de JNK/AP-1 (63,64).
- Troisièmement, les AGSs peuvent fixer avec une haute affinité la Fetuin A (glycoprotéine circulante et sécrétée par le foie) qui activera le TLR4. Il est établi que la Fetuin A joue un rôle de lien physique entre les AGSs et les TLR4 (65).
- Enfin, les AGSs peuvent stimuler la production ou la libération de signaux comme le HMGB1 (high mobility group box 1 protein), à partir de tissus blessés. Ces signaux activeront les TLRs (66).

Par ailleurs, les AGSs peuvent également stimuler les voies du stress cellulaire ou les voies inflammatoires via différents mécanismes indépendants des TLRs:

- Le traitement de macrophages par des AGSs induit une augmentation de la production de ROS (reactive oxygen species). L'augmentation des ROS permet d'activer de nombreuses kinases de stress et aussi de stimuler des protéines activatrices de l'inflammosome comme le NLRP3 (nucleotide-binding domain, leucine-rich repeats containing family, pyrin domain-containing 3) (67). Ce dernier forme un complexe avec une protéine adaptatrice, ASC (apoptotic speck protein containing a caspase recruitment domain) qui régule ensuite la caspase 3,

laquelle active le clivage de la pro-IL-1 β donnant la forme active de IL-1 β (interleukin 1 beta) (68). Cette cytokine pro-inflammatoire va, par la suite, réduire la signalisation de l'insuline (67).

- Les AGSs sont également précurseurs des autres lipides comme le diacylglycérol (DAG) et les céramides dont l'augmentation intracellulaire peut altérer les signaux de l'insuline via différents mécanismes (20,69). Ce processus est expliqué ci-dessous.

b. Les métabolites lipidiques intracellulaires

L'accumulation de lipides intracellulaires est aussi considérée comme un des responsables de l'insulino-résistance, mais les mécanismes d'action sont différents de ceux induits par les AGs libres (Figure 7).

Une fois entrés dans la cellule, les AGs sont rapidement estérifiés avec le coenzyme A (CoA) en donnant les acyl-CoAs. Ceux-ci sont transférés successivement au glycérol pour former les mono-, di-, et triacylglycérol (TG). Les acyl-CoAs peuvent également s'estérifier avec la sphingosine et donner des céramides. Tous ces métabolites lipidiques intracellulaires sont suspectés comme pouvant intervenir dans la résistance à l'insuline (20). Nous allons les analyser ci-dessous.

Comme le montre les expériences suivantes, les acyl-CoAs ne sont pas impliqués dans l'insulino-résistance.

Sous l'action catalytique d'une enzyme mitochondriale, la mtGPAT (acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase), l'acide lysophosphatidique est formé à partir des acyl-CoAs et du glycerol 3-phosphate. L'absence de cette enzyme provoque une accumulation des substrats comme les acyl-CoAs. Comme attendu, lorsque des souris KO mtGPAT1^{-/-} (déficience en mtGPAT1) sont nourries avec un régime riche en graisses, une accumulation des acyl-CoA hépatiques est observée. Par contre, les taux de DAGs et des TGs ne changent pas. Pourtant, on constate que ces souris sont protégées de l'insulino-résistance au niveau hépatique (70). Dans une autre étude, des souris surexprimant le mtGPAT1 hépatique, présentent un niveau d'acyl-CoAs normal. Pourtant, ces souris présentent une insulino-résistance qui pourrait être reliée, dans ce cas, aux taux élevés d'acide lysophosphatidique, de DAG et de TG observés chez ces animaux (71).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que les acyl-CoAs n'interviennent pas dans l'insulino-résistance.

Krssak et ses collègues (72) ont suggéré que chez des adultes non diabétiques présentant une masse corporelle normale, le taux de TGs intramyocellulaire puisse être un excellent prédicteur de l'insulino-résistance musculaire. Cependant, cette allégation fut contredite par d'autres études. Ainsi, l'équipe de Lui (73) a montré que des souris transgéniques surexprimant la DGAT1 (diacylglycérol acyltransferase), enzyme qui réalise des réactions d'acylation entre des DAGs et des TGs, présentent une augmentation de la synthèse de TGs et une diminution du taux de DAGs et de céramides dans le muscle. Cependant, ils constatent que ces souris sont protégées d'une insulino-résistance induite par un régime riche en graisses. Ces données sont compatibles avec les observations conduisant au paradoxe de l'athlète selon lequel l'exercice physique est associé à une augmentation du taux de TGs intramusculaire et à une bonne sensibilité à l'insuline (74,75).

L'ensemble de ces résultats indiquent donc que l'accumulation des acyl-CoA et des TGs ne sont pas forcément liés à l'insulino-résistance alors qu'au contraire l'augmentation intracellulaire de DAGs et de céramides le sont.

Une corrélation entre l'insulino-résistance et une augmentation du taux de céramides et de DAGs dans le foie et le muscle a été montrée (76). Le traitement de souris avec la myriocine, un inhibiteur de la serine palmitoyl transférase 1, impliquée dans la synthèse des céramides, atténue spécifiquement l'augmentation des céramides dans le muscle de souris sous régime gras. Ceci est associé à une amélioration de la tolérance au glucose, sans aucune modification des acyl-CoAs, des DAGs ou des TGs. Cependant, le rôle des céramides comme médiateur de l'insulino-résistance ne s'observe que dans le cas d'une alimentation riche en AGSs. De fait, comme rapporté dans la même étude, l'infusion d'acides gras insaturés (linoléate) n'induit pas d'accumulation de céramides alors que les souris développent une insulino-résistance même en présence de myriocine. Cela indique donc que les acides gras insaturés altèrent des signaux de l'insuline via d'autres mécanismes que ceux liés à l'accumulation de céramides (77). Cette capacité de la myriocine à protéger les souris de l'intolérance au glucose en inhibant l'accumulation de céramides induite par le régime gras fut confirmée par l'étude de Ussher (78) qui utilise un régime à base de saindoux.

Les DAGs sont généralement des seconds messagers produits sous l'action de la phospholipase C à partir du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. En revanche, dans l'insulino-résistance induite par l'accumulation de lipides, l'augmentation intracellulaire de DAGs peut être due à une contre-balance entre la synthèse et l'hydrolyse des TGs. Les DAGs sont donc des métabolites lipidiques qui possèdent leur propre signalisation intracellulaire (20): en utilisant des souris transgéniques permettant la surexpression de DGAT1 dans le muscle, l'équipe de Lui (73) observe une accumulation de TGs intramusculaire et la protection des souris de l'insulino-résistance musculaire induite par des lipides. Les DAGs peuvent également former, sous l'action des diacylglycérol kinases (DGKs), des acides phosphatidiques, un constituant lipidique majeur de la membrane. Des souris présentant une haploinsuffisance pour la DGK δ (DGK $\delta^{+/-}$), présentent un taux élevé de DAG musculaire associé à l'insulino-résistance musculaire sans augmentation des TGs (79). En résumé, il n'y a que les céramides et les DAGs qui pourraient interférer avec la signalisation de l'insuline tandis que les acyl-CoA et les TGs ne semblent pas avoir d'action. Mais comment l'accumulation du DAG et des céramides intracellulaires peut-elle interférer avec les signaux de l'insuline?

*** Le DAG et les 'nouvelles' Protéine Kinase Cs**

Les DAGs peuvent altérer la signalisation intracellulaire de l'insuline via l'activation de certaines PKCs qui ensuite phosphorylent le résidu sérine de IRS-1 (80).

Les PKCs appartiennent à la grande famille des AGC kinases. Ces enzymes sont impliquées dans la détection des signaux lipidiques et, via leur activité kinase, activent une réponse cellulaire. Les PKCs se subdivisent en trois catégories: les PKCs conventionnelles (cPKC: α , β I, β II, et γ) qui nécessitent du calcium et du DAG pour leur activation, les PKCs nouvelles (nPKC: δ , ϵ , η , et θ) qui ne nécessitent que du DAG pour leur activité et les PKCs atypiques (aPKC: ζ et λ) qui n'ont besoin ni de calcium ni de DAG.

Chez les rongeurs l'insulino-résistance musculaire provoquée par un taux élevé des AGs plasmatiques et résultant d'une infusion d'Intralipid®/héparine (émulsion de lipide et d'héparine) est associée à l'activation de la PKC θ (81) et à la croissance du taux DAG musculaire. Cette insulino-résistance est indépendante du changement du taux de céramides et de TGs dans le muscle (58). Au contraire, les souris dépourvues de PKC θ

(PKC θ -KO) sont protégées de l'insulino-résistance au niveau du muscle squelettique (82). Cependant, après 14 semaines sous régime gras, ces souris PKC θ -KO ont tendance à devenir obèses et développent une insulino-résistance au niveau du tissu musculaire, du tissu adipeux et du foie (83). En résumé, la suppression de l'activité de la PKC θ peut protéger de l'insulino-résistance musculaire après une infusion intralipidique aiguë. Cependant, à long-terme chez ces souris, le régime riche en graisses peut induire la résistance à l'insuline via, soit à une insulino-résistance hépatique, soit à l'activation d'autres isoformes de nPKC musculaires.

Les PKCs sont également impliquées dans l'apparition de l'insulino-résistance hépatique: l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens spécifiques, permettant de diminuer l'expression de la PKC ϵ , améliore la sensibilité à l'insuline hépatique et ce malgré l'apparition d'une stéatose hépatique (20). Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris PKC ϵ -KO qui, après une semaine de régime gras, sont protégées de l'insulino-résistance et ce malgré l'augmentation des TGs hépatiques. Après 16 semaines de régime gras, ces souris présentent une stéatose hépatique mais leur tolérance au glucose est maintenue via une augmentation de la sécrétion d'insuline (84).

Une autre PKC, la PKC δ joue aussi un rôle important dans le développement de l'insulino-résistance hépatique. Cette PKC, activée par 6 heures d'infusion d'Intralipid® a été associée à une insulino-résistance hépatique (85). La présence de PKC δ serait un acteur important dans la balance lipidique chez l'homme et le rongeur. En effet, une déplétion en PKC δ dans le foie ou le corps entier diminue le taux de lipides hépatiques et corporel et améliore la tolérance au glucose. Au contraire, sa surexpression entraîne la stéatose hépatique et l'intolérance au glucose (86,87). Les effets de la PKC δ pourraient être liés à l'altération de la lipogenèse en raison de la diminution d'expression des enzymes clés de la lipogenèse chez les souris KO pour la PKC δ et de fait, l'activité de ces enzymes est augmentée chez les souris surexprimant la PKC δ . On constate que l'expression de la PKC δ hépatique est associée à l'augmentation de TGs et du glucose plasmatique chez l'homme (87). Il serait donc possible que son association avec l'insulino-résistance soit en fait reliée à la régulation de l'accumulation lipidique.

Il semble donc que l'activation des PKC θ , PKC ϵ et PKC δ par les DAGs soit impliquée dans l'insulino-résistance musculaire ou hépatique.

Mais comment ces nPKCs font-elles pour altérer les signaux de l'insuline?

L'activation de la PKC θ a été reliée à la diminution de la phosphorylation de résidus tyrosine et à l'augmentation de la phosphorylation de certaines sérines sur IRS-1 (58) (Figure 7). Suite à cette observation, il fut établi que la PKC θ peut phosphoryler le résidu Ser1101 de IRS-1 qui, par voie de conséquence, inhibe la phosphorylation des résidus tyrosine de IRS-1 qui est observée lors d'une stimulation par l'insuline (88). Dans le foie, la PKC ϵ et le récepteur de l'insuline sont étroitement associés l'un avec l'autre. De plus, l'inhibition de l'expression de la PKC ϵ , induit par des oligonucléotides anti-sens spécifiques, protège de l'altération de l'activation du récepteur à l'insuline induite par le régime gras.

En bref, toutes ces données indiquent que le DAG induit l'insulino-résistance via l'activation des PKCs.

** Les céramides*

Les céramides jouent un rôle important dans l'insulino-résistance, au même titre que le DAG. Cependant, au sein de la famille des céramides, seuls certains d'entre eux, tels que ceux dérivés de l'acide palmitique, jouent un rôle dans l'insulino-résistance. L'accumulation de céramides est associée à l'altération de l'activité d'Akt (89,90). Plusieurs possibilités ont été proposées pour expliquer cette altération (Figure 7):

- Premièrement, les céramides activeraient la phosphatase A2 qui pourrait déphosphoryler Akt et altérer les signaux de l'insuline (45).
- Deuxièmement, les céramides altéreraient l'action de l'insuline via l'isoforme d'une PKC atypique, la PKC ζ :

Dans la cellule, cette PKC ζ se trouve en interaction moléculaire avec Akt2 mais une dissociation intervient lors de la stimulation par l'insuline. Les céramides inhibent cette dissociation, et donc préviennent l'activation de Akt via la phosphorylation de Akt sur le résidu Thr34 par la PKC ζ (91).

Les céramides pourraient également, en s'accumulant au sein de microdomaines lipidiques riches en caveolines (46), recruter la PKC ζ qui, une fois liée à Akt, l'empêcherait de participer à la voie de signalisation de l'insuline (92).

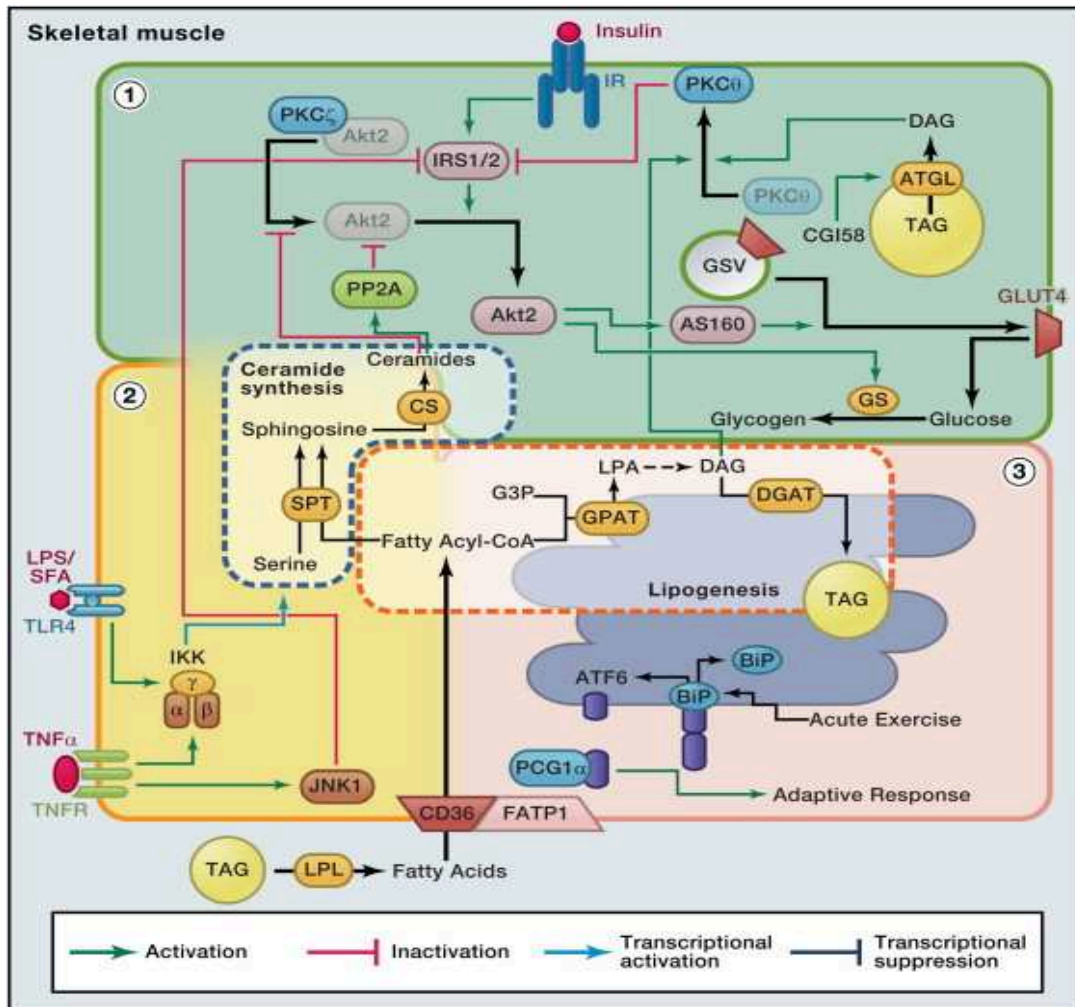


Figure 7: Les voies impliquées dans l'insulino-résistance dans le muscle.

L'insuline active le récepteur de l'insuline (IR) en stimulant son activité tyrosine kinase, laquelle phosphoryle ensuite une tyrosine IRS1. Grâce à une série d'étapes intermédiaires, il se produit une activation de Akt2. L'activation d'Akt2 se produit via AS160 et Rab-GTPase (non représenté), ce qui favorise la translocation des vésicules de stockage contenant GLUT4-(GSV) à la membrane plasmique, et ce qui permet l'entrée du glucose dans la cellule. Cette entrée de glucose favorise la synthèse du glycogène par le glycogène synthase (GS). Cette voie de signalisation centrale est connectée à plusieurs autres voies cellulaires qui sont désignées par des numéros 1-3.

(1) La zone verte ombrée représente les mécanismes d'induction de la résistance à l'insuline via les lipides, notamment le rôle du diacylglycérol (DAG) qui induit l'activation des PKCθ et l'altération ultérieure de signalisation de l'insuline, ainsi que les céramides qui induisent l'augmentation de PP2A et l'augmentation de la séquestration de Akt2 par la PKCζ. L'altération d'activité de Akt2 limite la translocation de GVS vers la membrane plasmique, ce qui entraîne l'altération de l'absorption du glucose. L'activité Akt2 altérée diminue également la synthèse du glycogène induite par l'insuline.

(2) La zone jaune représente plusieurs voies inflammatoires intracellulaires, notamment l'activation de IKK, qui peuvent avoir un impact sur la synthèse de céramides, l'activation de JNK1 qui peut altérer la signalisation de l'insuline via une serine phosphorylation de IRS-1.

(3) La zone rose représente l'activation de la réponse de la protéine dépliée (UPR) qui, dans certains cas (comme l'exercice extrême aigu, peut conduire à l'activation de ATF6 et une réponse adaptative médiée par PGC1α).

CS: ceramide synthase; G3P: glycerol 3-phosphate; LPA: lysophosphatidic acid; SPT: serine palmitoyl transferase; TAG: triacylglycerol (20).

3.1.1.2.2. Unfolded protein response (UPR)

L'UPR constitue un indice qui évalue le stress du réticulum endoplasmique (RE) provoqué par la présence dans la cellule de protéines dépliées et mal conformées. L'activation de l'UPR survient dans le RE via trois principaux senseurs transmembranaires: Le PERK (PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase), IRE-1 (inositol-requiring enzyme1), et ATF-6 (activating transcription factor 6) (93). Ces trois senseurs sont activés afin de restaurer l'homéostasie du RE en réduisant le taux de protéines dépliées dans la lumière du RE. Ceci intervient via trois processus, à savoir une augmentation de la biogenèse de la membrane (surtout via IRE-1), l'interruption de la traduction de protéine (surtout via PERK en phosphorylant eIF2 α) et l'augmentation de l'expression de protéines chaperonnes du RE (94).

L'excès de nutriments (AGSs, glucose élevé), crée un stress cellulaire fonctionnel (95). L'augmentation de l'activation de l'UPR dans le foie et les tissus adipeux caractérise les souris obèses (96). Pourtant, un pontage gastrique pratiqué chez les personnes obèses est associé à une réduction de l'activation de l'UPR, à la réduction du poids et à la diminution de la résistance à l'insuline (97). De plus, l'utilisation d'inducteurs chimiques de l'UPR altère les signaux de l'insuline (96) alors que l'induction de l'expression de protéines chaperonnes réduit le stress du RE et améliore la sensibilité à l'insuline (98). Ainsi, il semble que le stress du RE et l'activation de l'UPR soient associés à l'insulino-résistance.

Il a été décrit que le senseur d'IRE-1, via son domaine kinase et son interaction avec TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), pourrait activer IKK (99) et JNK (100). Cette activation induirait l'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et l'interruption de la voie de signalisation de l'insuline via la phosphorylation de IRS-1 sur la Ser307 (96,101).

L'activation du senseur PERK semble être impliquée dans l'augmentation des signaux de NF- κ B en diminuant la traduction de I κ B α (un régulateur négatif de IKK et NF- κ B). Ceci se traduit par une augmentation de l'activation de NF- κ B et de l'expression des gènes pro-inflammatoires comme le TNF α et IL-6 (102–104).

La troisième branche de l'UPR, ATF-6 est aussi impliquée dans l'activation des signaux de NF- κ B (105).

Enfin, le stress du RE active la PKR (proteine kinase R), une eIF2 α kinase, qui va ensuite activer JNK (106) alors que lors d'une inflammation, PKR active NF- κ B (107).

La relation entre les trois senseurs de UPR et l'inflammation est résumée dans la figure 8.

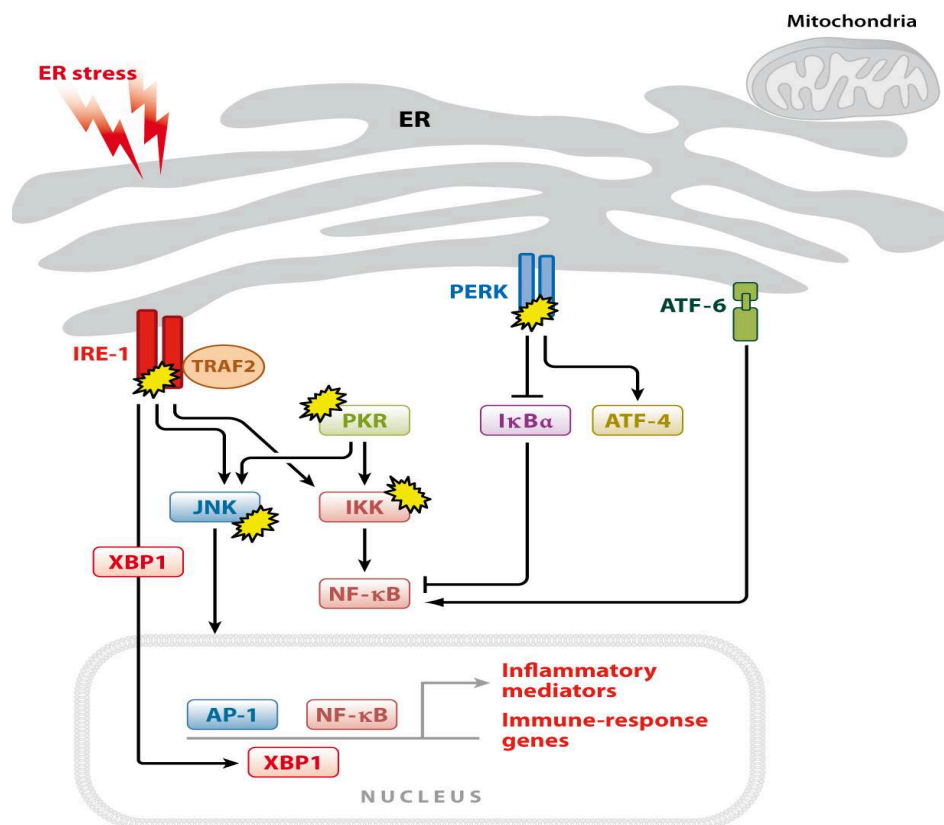


Figure 8: Les voies du stress du réticulum endoplasmique conduisant à une inflammation.

Les trois branches de la réponse induite par les protéines dépliée/mal conformées dans RE ont toutes été impliquées dans la réponse inflammatoire cellulaire. IRE-1 utilise son domaine kinase en association avec TRAF2 pour activer les kinases inflammatoires, JNK et IKK, ce qui conduit à une augmentation des médiateurs inflammatoires via les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B, respectivement. Le clivage de l'ARNm du facteur de transcription XBP1 par IRE-1 entraîne également des conséquences inflammatoires. En effet, XBP1 régule l'induction de cytokines inflammatoires et les réponses immunitaires dans divers types de cellules, notamment les macrophages. L'activation de PERK conduit à une diminution de la traduction I κ B α , un inhibiteur de la signalisation du NF- κ B, augmentant alors l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. En outre, l'activation de PERK induit la traduction d'ATF-4, qui était montré pour réguler l'induction de cytokines inflammatoires, bien que le mécanisme demeure inconnu. PKR est également activé par le stress du RE et contribue à l'activation de JNK et d'IKK. Enfin, ATF6 augmente l'activité transcriptionnelle de NF- κ B.

AP-1: activator protein-1; ATF-4/6: activating transcription factor 4/6; IKK: inhibitor of κ kinase; IRE-1: inositol-requiring enzyme 1; JNK: c-jun N-terminal kinase; PERK: PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase; PKR: protein kinase R; TRAF2: TNF receptor-associated factor 2; XBP1: X-box-binding protein 1 (108).

3.1.1.2.3. L'inflammation

a. Inflammation et Cellules immunitaires

L'association entre l'insulino-résistance et la réponse immunitaire fut observée chez des patients atteints de sepsis (109–112). Des corrélations existent entre de nombreuses maladies activant la réponse inflammatoire comme l'hépatite C, le VIH, les arthrites rhumatoïdes et l'insulino-résistance (113–115). L'équipe de Hotamisligil a découvert que le taux de TNF α est augmenté dans les tissus adipeux de souris obèses présentant une insulino-résistance. Par ailleurs, la neutralisation de cette cytokine proinflammatoire peut être mise en corrélation avec la sensibilité à l'insuline (26,116). Un mécanisme clé sous-tend l'inflammation induite par l'obésité, il s'agit de l'accumulation de macrophages tissulaires, en particulier dans les tissus adipeux (117,118). Les macrophages présents dans les tissus adipeux expriment fortement différents gènes pro-inflammatoires (57,119). Parmi ces derniers, on trouve celui codant pour le TNF α . Cette cytokine est abondamment sécrétée par les macrophages activés et elle est impliquée dans la résistance à l'insuline, ceci, en agissant sur les cellules cibles de l'insuline dans divers tissus via des mécanismes paracrines (26,116). D'une façon générale, les cytokines activent des 'stress kinases' comme S6K, IKK β , JNK1, et aussi la PKC θ , qui, toutes, peuvent phosphoryler des résidus sérine sur IRS1 et par conséquent, altérer des signaux en aval de l'insuline (120,121) (Figure 9). Dans le tissu adipeux, l'activation par la JNK1 et IKK β des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B va amplifier la production des cytokines pro-inflammatoires intratissulaires. Ces dernières pourraient quitter le tissu, et, via la circulation sanguine produire des effets endocriniens périphériques sur des organes éloignés tels que les muscles et le foie en augmentant encore plus la résistance systémique à l'insuline (122).

Les cytokines peuvent également inhiber l'action de l'insuline via des mécanismes transcriptionnels en diminuant l'expression de molécules impliquées dans la signalisation de l'insuline telles que C/EBP- α (CCAAT/enhancer-binding protein), et GLUT4 (123).

Les cytokines pro-inflammatoires peuvent aussi favoriser la biosynthèse des céramides qui vont ensuite inhiber l'activation de Akt et bloquer certains signaux intracellulaires de l'insuline (124).

Les facteurs de transcription tels que AP-1 via JNK1 ou NF- κ B via IKK, peuvent également être activés par le stress du RE ou bien par les ROS produits par la surcharge alimentaire (96,125).

Enfin, l'activation des récepteurs TLRs, via les AGSs dérivés de nutriments ou via le LPS, peut aussi induire l'inflammation (126).

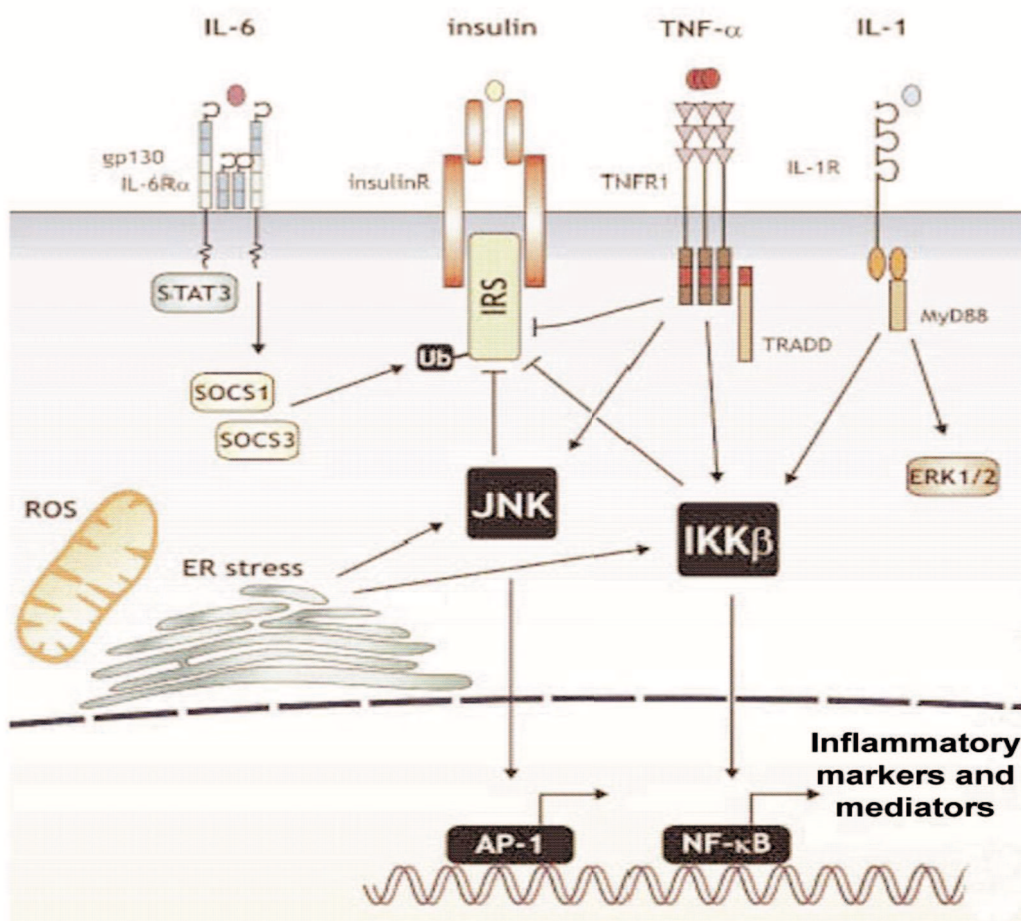


Figure 9: L'inflammation et la résistance à l'insuline: voies de signalisation impliquées.

L'activation chronique de voies proinflammatoires telles que JNK/AP-1, IKK β /NF- κ B et SOCS par des cytokines (IL-6, TNF α , IL-1), les ROS et le stress du RE inhibe également la signalisation de l'insuline résultant en une insulino-résistance.

ROS: Reactive oxygen species; RE: Réticulum endoplasmique; AP-1: Activator Protein-1; IRS: Insulin receptor substrate; STAT3: Signal transducer and activator of transcription; SOCS: Suppressor of cytokine signaling; TNF: Tumor necrosis factor; JNK: c-Jun N-terminal kinases; IKK: Inhibitor of nuclear factor kappa kinase beta subunit; TRADD: Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain; MyD88: Myeloid differentiation primary response gene (88).

Il est évident que les cellules immunitaires participent activement à l'inflammation observée chez les patients diabétiques. Différentes cellules immunitaires, telles que les macrophages, les lymphocytes, les lymphocytes NKT (natural killer T), les mastocytes, les neutrophiles, et les éosinophiles, sont impliquées dans l'insulino-résistance (127).

* *Les macrophages*

Les macrophages dérivent de diverses origines: les macrophages tissulaires tels que ceux du tissu adipeux ou hépatiques (cellules de Küpffer), ou bien les macrophages hépatiques recrutés à partir de la circulation. Les macrophages tissulaires sont constitués de populations hétérogènes présentant différentes fonctions. Sur la base d'études *in vitro*, les macrophages ont été classés en deux catégories, M1 et M2, (128). Ceux de la catégorie M1 appelés encore 'classically activated macrophage' sont hautement pro-inflammatoires et secrètent la majorité des cytokines notamment le TNF α , IL-1 β et IL-6, cytokines impliquées dans l'insulino-résistance. Les macrophages de type M2 ou 'alternatively activated macrophage' ne sont pas proinflammatoires et produisent des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 et IL-4 (128). *In vivo*, il existe divers intermédiaires entre les états M1 et M2 (129,130). Globalement, c'est la balance entre les différentes sous-populations de macrophages qui va définir un état inflammatoire ou non. Chez les sujets obèses, les macrophages pro-inflammatoires de type M1 sont majoritaires (108).

Les macrophages du tissu adipeux (MTA) sont considérés comme étant directement impliqués dans l'insulino-résistance. La population de macrophages est augmentée dans le tissu adipeux de souris obèses ou de souris nourries avec un régime gras. L'infiltration des macrophages dans les tissus adipeux se fait via une surexpression de la chimiokine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) par les cellules adipocytaires. Cette infiltration n'influe pas, par elle-même, sur le niveau d'obésité ou la prise de poids des souris mais ces souris présentent une insulino-résistance périphérique et hépatique et développeront plus tard une stéatose hépatique (131). Cette observation fut confirmée par des études ultérieures qui montrèrent que la délétion du MCP-1 ou bien du CCR2 (récepteur de MCP-1) réduit l'accumulation de MTA et améliore l'homéostasie glucidique systémique, la sensibilité à l'insuline et la stéatose hépatique (131,132).

Un processus similaire peut se produire au niveau du foie. Au cours de l'obésité, il y a une augmentation importante des macrophages hépatiques (133). Ces derniers sont constitués d'une population de macrophages résidents, appelées cellules de Küpffer et de macrophages hépatiques recrutés, qui ont migré dans le foie (133,134). Les cellules de Küpffer sont des cellules dérivées de la moelle osseuse qui ont formé une population stable dans le foie (135). Les macrophages hépatiques recrutés (pro-inflammatoires) sont aussi des cellules dérivées de la moelle osseuse mais ceux-ci ont migré vers le foie sous l'influence de chimiokines hépatiques, telles que le MCP-1 (133,134). La déplétion chimique par le Gadolinium (136) ou le Clodronate (137) des cellules de Küpffer et des macrophages hépatiques recrutés améliore la tolérance au glucose et l'insulino-résistance dans le foie. On en conclut que les macrophages hépatiques sont responsables de l'insulino-résistance hépatique.

Quel est le rôle du recrutement des macrophages?: Une étude indique que l'infiltration macrophagique du tissu adipeux débute à partir de la 8ème semaine chez des animaux soumis à un régime riche en graisses. Une corrélation existe entre l'infiltration des macrophages et l'augmentation du taux d'apoptose adipocytaire, ce qui suggère que les macrophages infiltrés pourraient être responsables de l'élimination de cellules mortes et du remodelage du tissu adipeux (138). Un autre travail indique que la présence des macrophages dans le tissu adipeux permettrait de contrôler la libération des lipides cellulaires en inhibant la lipolyse suite à un excès de consommation de lipides. Cela pourrait donc induire une accumulation de lipides intracellulaires et par la suite une exacerbation de l'insulino-résistance (139).

*** Les lymphocytes T et B**

Les lymphocytes jouent également un rôle important dans la mise en place de l'insulino-résistance. Certains lymphocytes sont considérés comme étant des promoteurs de la maladie tandis que d'autres joueraient un rôle plutôt de protection.

Une accumulation d'un grand nombre de lymphocytes T effecteurs CD8+ a été observée dans les tissus adipeux épидидymaux de souris obèses nourries avec un régime riche en graisses tandis que le nombre de lymphocytes T auxiliaires CD4+ et de lymphocytes T régulateurs se réduit dans les mêmes conditions (140). L'infiltration par des cellules T CD8+ est précédée par l'accumulation de macrophages. Une diminution expérimentale des cellules T CD8+ soit par manipulation génétique, soit par l'utilisation

d'anticorps spécifiques permet de réduire l'inflammation ainsi que l'infiltration des macrophages dans les tissus adipeux. La conséquence de ceci consiste en une amélioration de la résistance systémique à l'insuline. A l'opposé, le transfert de lymphocytes T CD8+ chez des souris déficientes en CD8+ aggrave l'inflammation dans le tissu adipeux. Cette étude a également montré l'existence d'une coopération entre les cellules T CD8+, les macrophages et les adipocytes. En effet, le tissu adipeux des souris obèses active des cellules T CD8+ qui, à leur tour, favorisent le recrutement et l'activation des macrophages dans ce tissu. Les lymphocytes T CD8+ jouent donc un rôle essentiel dans le déclenchement et la propagation de l'inflammation au sein du tissu adipeux.

Dans cette même étude (140), les auteurs discutent du rôle clé des lymphocyte T CD4+ (Th) qui peuvent être subdivisées en plusieurs catégories: les cellules proinflammatoires comme Th1, les cellules anti-inflammatoires comme Th2, et les lymphocytes T régulateurs Treg. La diminution du nombre de cellules T CD4+, en particulier des cellules Th2 et des cellules Treg contribuerait ainsi à l'inflammation locale dans le tissu adipeux. Les cellules Th2 peuvent sécréter les cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-10 et donc inhiber le recrutement des macrophages (141). Les cellules Treg contrôlent les réponses immunitaires adaptatives en supprimant les cellules pro-inflammatoires T, les cellules NKT, les cellules B et les cellules dendritiques (142).

Une étude de Winer (143) a permis de constater que les lymphocytes T CD4+ du tissu adipeux viscéral, contrôlent l'insulino-résistance chez des souris obèses soumises à un régime gras et probablement chez l'homme aussi. Ce rôle des lymphocytes T CD4+ dans le contrôle de l'homéostasie glucidique est compromis chez ces souris obèses, lorsque le tissu adipeux est accumulé par les cellules pro-inflammatoires Th1, qui sécrètent l'IFN γ (interferon gamma). Le transfert de cellules T CD4+ à des souris immunodéficientes et obèses, inverse le gain de poids et la résistance à l'insuline, probablement via la restauration des cellules anti-inflammatoires Th2 dans le tissu adipeux. Cette étude de Winer (143) montre également qu'un bref traitement systémique destiné à rétablir la balance Th1/Treg peut aussi renverser pendant des mois la résistance à l'insuline et ceci malgré la poursuite du régime riche en graisses.

Concernant le rôle des cellules Treg dans l'insulino-résistance, l'équipe de Feuerer (144) a montré que ces cellules sont nombreuses dans le tissu adipeux abdominal des souris normales, alors que leur nombre est fortement diminué chez les

souris obèses insulino-résistantes. La déplétion en cellules Treg chez les souris normales provoque une augmentation de l'expression des cytokines inflammatoires ainsi qu'une altération des signaux de l'insuline aussi bien dans le tissu adipeux que dans le foie. Par contre, l'augmentation d'activité de ces cellules améliore l'insulino-résistance. En plus de leur rôle dans l'inflammation, les cellules Treg expriment également le PPAR γ lequel est nécessaire, chez les souris obèses, à la restauration complète de la sensibilité à l'insuline induite par la pioglitazone (145).

Un autre type de lymphocyte T, nommé 'NKT', a également été impliqué dans l'intolérance au glucose et le développement de l'insulino-résistance. En effet, les souris KO pour la β 2-microglobuline ne possèdent pas de cellules NKT et, sous un régime riche en graisses, elles ne présentent pas d'infiltration de macrophages dans leur tissu adipeux et ne sont pas intolérantes au glucose (146). Au contraire, l'activation des cellules NKT par l' α -galactosylceramide exacerbe l'intolérance au glucose, l'infiltration de macrophages ainsi que l'expression des cytokines inflammatoires dans le tissu adipeux (146).

Les lymphocytes B participent, eux aussi, à l'homéostasie du glucose. Winer et al. (147) ont observé une accumulation de lymphocytes B dans le tissu adipeux des souris obèses soumises à un régime gras. Cependant, des souris obèses dépourvues de lymphocytes B semblent protégées de la maladie métabolique. Les effets des cellules B sur le métabolisme du glucose sont liés à l'activation des macrophages et des cellules T pro-inflammatoires ainsi qu'à la production d'anticorps pathogènes de type IgG. De plus, l'élimination des cellules B par un anticorps CD20 atténue la maladie, tandis que le transfert d'IgG de souris obèses induit rapidement la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose (147). Dans leur ensemble, ces résultats établissent l'importance des lymphocytes B et de l'immunité adaptative dans l'insulino-résistance.

*** Les mastocytes**

Les mastocytes (MC) sont des cellules inflammatoires qui résident dans divers tissus. Ces cellules modulent la réponse inflammatoire. Les MC sont impliqués dans le recrutement des leucocytes ainsi que dans l'immunité adaptative en activant les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes (148,149). Chez l'homme, les MC sont hétérogènes et sont classés en 3 groupes selon la présence de sérines protéases: les MCT

(présence seulement de Tryptase) prédominent dans les cloisons alvéolaires et dans la muqueuse de l'intestin grêle; les MCC (présence seulement de Chymase) se trouvent dans le tissu synovial; et les MCTC (présence de Tryptase et Chymase) se localisent dans la peau, les amygdales, et la sous-muqueuse de l'intestin grêle (148). Ces derniers MC peuvent également être retrouvés dans le tissu adipeux (150) et ils s'accumulent dans les tissus adipeux viscéraux des obèses (151,152).

La relation entre les MC et les troubles métaboliques comme l'obésité et le DT2 a été récemment établie (153): des souris déficientes en MC prennent moins de poids et la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline sont améliorées. L'existence d'un rôle pour les MC dans l'obésité induite par l'alimentation a également été suggérée par des expériences avec des médicaments couramment utilisés dans les allergies et l'asthme (le cromoglycate et le kétotifène) qui inhibent l'effet des MC. En effet, des traitements à base de ces composés améliorent la dérégulation du métabolisme et inversent la prise de poids des souris qui ont été nourries avec un régime riche en graisses pendant 12 semaines (153). En outre, la reconstitution de souris déficientes en MC par des MC dérivés de la moelle osseuse de souris conventionnelles ou de souris *Tnf*^{-/-} inverse le phénotype des souris MC-déficientes. Cette inversion ne se produit pas avec des MC issus de souris *Il6*^{-/-} ou *Ifng*^{-/-}. Cela suggère que IL-6 et l'IFN γ sécrétés par les MC jouent un rôle important dans l'apparition ou le maintien de l'obésité et l'insulino-résistance (153).

Les MC sécrètent également de nombreux médiateurs, qui peuvent moduler l'inflammation du tissu adipeux. Il s'agit par exemple, du 15-désoxy-delta-12,14 prostaglandin-J₂, un des médiateurs des MC qui est un ligand agoniste endogène de PPAR γ et donc favorise la différenciation des adipocytes (154). Enfin, les MC peuvent également réguler l'activation des macrophages par la sécrétion d'IFN γ ou de métalloprotéinase 9 (155), ou bien la production de phospholipase A₂ (156).

*** Les neutrophiles et les éosinophiles**

Les leucocytes polynucléaires incluant les neutrophiles et les éosinophiles sont présents dans le tissu adipeux et sont, eux aussi, reliés au trouble métabolique du glucose.

Les neutrophiles représentent les premières cellules immunitaires à répondre à l'inflammation et peuvent contribuer à aggraver l'état inflammatoire chronique en

aidant au recrutement des macrophages et en interagissant avec les cellules présentatrices de l'antigène (APC). Plusieurs protéases sont sécrétées par les neutrophiles, dont l'élastase qui augmente la réponse inflammatoire dans diverses maladies. Le traitement des cellules hépatiques avec l'élastase induit l'insulino-résistance cellulaire tandis que l'épuisement de cette protéase chez les souris obèses recevant un régime riche en matière grasse provoque une diminution de l'inflammation tissulaire. Cela est associé avec une diminution du nombre de neutrophiles et de macrophages dans le tissu adipeux et se traduit par l'amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline (157). Ces résultats suggèrent que les neutrophiles participent à une maladie métabolique induite par une inflammation.

Les éosinophiles participent à la réponse immunitaire déclenchée par les parasites et les allergies. Ils collaborent avec les macrophages activés de type M2. Dans le tissu adipeux, les macrophages M2 sont importants pour maintenir l'homéostasie du glucose et sont activés par IL-4. Les éosinophiles ont été montrés comme constituant les cellules majeures dans la production de IL-4 dans le tissu adipeux blanc de souris. En absence d'éosinophiles, le taux de macrophages M2 est considérablement atténué. En absence d'éosinophiles, le régime riche en graisses induit une augmentation de la masse grasse corporelle des souris, l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline. Par contre, on constate qu'une augmentation du nombre d'éosinophiles du tissu adipeux induite par les helminthes améliore la tolérance au glucose (158). Ces données sont en faveur de l'idée selon laquelle les éosinophiles participent à l'homéostasie glucidique via la maintenance des macrophages anti-inflammatoires M2 dans le tissu adipeux.

Chacune des études rapportées ci-dessus montre l'importance d'un type cellulaire immunitaire dans l'étiologie de l'insulino-résistance induite par l'inflammation. Cependant, il est probable que l'ensemble de ces cellules collaborent entre elles pour moduler la réponse inflammatoire (Figure 10).

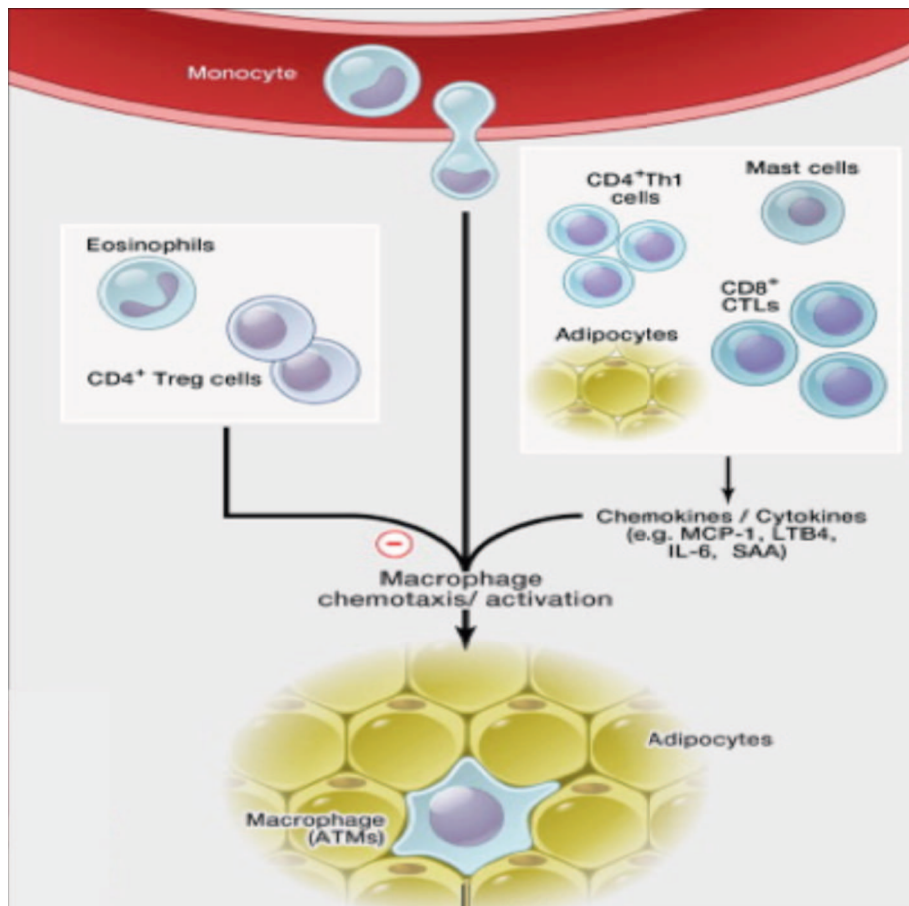


Figure 10: La réponse immunitaire dans le tissu adipeux obèses.

La libération de chimiokines, tels que MCP-1 et LTB₄, facilite le recrutement des ATMs à partir de monocytes sanguins. Les ATMs peuvent détecter des signaux 'danger/alerte' et produire des cytokines inflammatoires, comme le TNF- α . Les ATMs peuvent également recruter des populations effectrices des lymphocytes, les cellules Th1 CD4⁺ et des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (CTLs), qui vont agir en augmentant davantage le recrutement des ATMs et stimulant la production de cytokines. Le recrutement des ATMs ainsi que la fonction inflammatoire peuvent être tous les deux inhibés par les cellules Treg résidentes.

MCP-1: monocyte chemotactic protein 1; LTB₄: leukotriene B₄; ATMs: adipose tissue macrophage, IL-6: interleukine 6; SAA: serum amyloid A (figure modifiée d'après (127)).

b. Inflammation et Tissu adipeux

L'inflammation du tissu adipeux est très étudiée depuis quelques années car ce tissu est considéré comme le site potentiel d'apparition de l'insulino-résistance liée à l'obésité. Un excès de nutriments ou une augmentation de l'inflammation active les facteurs de régulation transcriptionnelle tels que JNK et/ IKK. Ces derniers peuvent phosphoryler les IRS-1 au niveau d'une sérine. Ceci a pour conséquence une inhibition de la cascade de signalisation du récepteur à l'insuline dans le tissu adipeux. L'inflammation du tissu adipeux semble en fait intervenir en amont et rendre les

adipocytes résistants à l'insuline. Le traitement des adipocytes avec le TNF α provoque une diminution des signaux intracellulaires de l'insuline et par conséquent provoque une réduction de l'absorption du glucose (159–161). *In vivo*, dans différents modèles de souris obèses et diabétiques, l'expression du TNF α est augmentée dans le tissu adipeux. L'augmentation du taux de TNF α a été observée aussi bien localement qu'au niveau systémique et sa neutralisation améliore l'absorption périphérique de glucose en réponse à l'insuline (116). Cela explique l'importance de l'inflammation locale du tissu adipeux sur l'homéostasie systémique du glucose.

Le TNF α , IL-1 β et le LPS sont impliqués dans l'induction de la lipolyse dans les adipocytes primaires et aussi dans des lignées de cellules adipocytaires (162–164). Dans les adipocytes humains, l'induction de la lipolyse par le TNF α passe par l'activation des MEK (mitogen-activated protein kinase kinases), de ERK. L'induction de cette lipolyse est aussi la conséquence de l'activation de JNK associée à l'élévation de l'AMPc intracellulaire qui active la PKA (165,166). La PKA activée affecte directement la lipolyse en phosphorylant la périlipine, une protéine associée à la gouttelette lipidique (167). Ceci se traduit ensuite par la libération de Abhd5 (α/β hydrolase domain-containing protein 5), qui se lie à et coactive l'ATGL (adipose triglyceride lipase) (168). Le TNF α diminue également l'expression de la périlipine, ce qui, sans doute, améliore la capacité d'ATGL d'accéder à l'intérieur de la gouttelette lipidique (169,170).

Le TNF α ainsi que IL-1 β et l'IFN γ diminuent une autre protéine présente dans les gouttelettes lipidiques, la FSP27 (fat-specific protein 27). Cette nouvelle protéine possède des domaines homologues à ceux de la périlipine et pourrait être impliquée dans la stabilité des gouttelettes lipidiques en contrôlant l'accès de la lipase (171).

Un autre effet du TNF α dans la lipolyse concerne la suppression de l'expression de G0S2 (G0/G1 switch gene2), récemment identifié comme étant un inhibiteur endogène de l'ATGL (172). De ce fait, le TNF α peut donc tout à la fois stimuler les activateurs et supprimer les inhibiteurs de l'activité de l'ATGL.

Le LPS est capable de stimuler la lipolyse en induisant la phosphorylation de Raf-1, MEK1/2, et ERK1/2: la lipolyse stimulée par l'endotoxine s'arrête lors de l'inhibition de ERK1/2. Le LPS provoque également une diminution d'expression et la phosphorylation de la périlipine et une augmentation de l'activité et du taux d'ATGL (173).

La signalisation inflammatoire dans l'adipocyte peut également réduire l'activité du récepteur nucléaire, PPAR γ qui est essentiel pour l'adipogenèse et le maintien d'expression des gènes et de la fonction des adipocytes. Sans PPAR γ , la capacité des adipocytes à produire et à stocker les lipides et à maintenir la sensibilité à l'insuline est compromise (174). La diminution de PPAR γ se traduit par la réduction de l'expression de l'adiponectine, une cytokine spécifique aux adipocytes qui est également impliquée dans la régulation de la sensibilité systémique à l'insuline (175).

D'une façon générale, les effets de l'inflammation sur les tissus adipeux sont multiples. Ce tissu ne semble pas bien adapté pour réaliser une modulation correcte de l'inflammation et finalement ceci apparaît néfaste à l'efficacité du contrôle de la glycémie.

c. Inflammation et Foie

Le foie joue un rôle essentiel dans les processus métaboliques. Il est responsable non seulement de la gluconéogenèse et du stockage et de l'utilisation du glycogène mais aussi de la lipogenèse et de la synthèse et de la sécrétion du cholestérol. Malgré la présence des cellules de Küpffer en tant que macrophages hépatiques, on observe aussi une infiltration de cellules macrophagiques circulantes vers le foie dans les cas d'obésité et celles-ci peuvent représenter 30% à 70% des macrophages hépatiques totaux (133,134). Les médiateurs inflammatoires sécrétés dans le foie inhibent les signaux de l'insuline via l'activation de NF- κ B. L'activation spécifique de IKK β dans le foie de souris conduit, dans ce tissu, à une diminution de la tolérance au glucose, de la sensibilité à l'insuline et des signaux de l'insuline (176). Au contraire, la perte d'activité de IKK β dans les hépatocytes réduit, au niveau du foie, le taux de cytokines inflammatoires induit par le régime gras et rend les souris plus sensibles à l'insuline (176,177).

La JNK kinase est également activée dans le foie en cas d'obésité et l'inhibition de cette kinase dans le foie réduit le nombre de marqueurs inflammatoires et augmente la sensibilité à l'insuline dans le foie (178). Dans ce tissu, l'activation de JNK se fait de manière indépendante dans les différents types cellulaires dont les hépatocytes, les cellules de Küpffer ainsi que les macrophages recrutés. Cette activation au sein de l'ensemble de ces cellules est nécessaire pour conduire à une intolérance au glucose (179).

La diminution de la sensibilité à l'insuline peut affecter différentes voies métaboliques hépatiques et notamment la gluconéogenèse. La gluconéogenèse est normalement supprimée par les signaux de l'insuline mais chez l'obèse cette régulation est perdue et en conséquence la production hépatique de glucose contribue à l'hyperglycémie. L'inflammation interfère également avec l'homéostasie lipidique hépatique. De fait, l'administration *in vivo* de TNF α ou d'IL-6 induit la lipogenèse hépatique et la production de triglycérides hépatiques (180,181). De même, une dose modérée de LPS stimule la biosynthèse de novo des AGs et la lipolyse périphérique en augmentant ainsi la production de TGs hépatiques (182). L'augmentation du taux de TGs hépatiques conduit à l'augmentation de la sécrétion de VLDL (very low density lipoprotein) par le foie et donc à l'augmentation de la concentration plasmatique de TGs.

L'inflammation hépatique peut induire une réponse inflammatoire systémique via la sécrétion de marqueurs inflammatoires dans le sang tels que CRP, PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-1) et IL-6. Certaines de ces cytokines sont impliquées dans l'insulino-résistance périphérique (183). Par exemple, l'activation de IKK hépatique entraîne une augmentation systémique de IL-6, laquelle va réduire la sensibilité à l'insuline musculaire (176).

L'inflammation hépatique peut donc entraîner, dans le foie, des troubles du métabolisme glucidique et lipidique qui vont se répercuter sur d'autres organes.

d. Inflammation et Muscle

Le muscle représente, lui aussi, un facteur important de l'homéostasie du glucose car ce tissu est impliqué dans la capture du glucose et la consommation d'énergie à partir des sucres. Si l'inflammation interfère bien avec la voie de signalisation de l'insuline, il semblerait que l'obésité ne soit pas suffisante pour permettre une induction directe, dans ce tissu, d'un processus inflammatoire. Par contre, l'inflammation adipocytaire et hépatique semble influencer sur le métabolisme glucidique musculaire. Ceci est confirmé par l'absence d'infiltration de ce tissu par les macrophages chez les animaux obèses, contrairement au tissu adipeux adjacent (117). Chez l'homme atteint de diabète de type 2, aucun signe d'inflammation (TNF α ou IL-6) n'est détecté dans le muscle (184,185); bien qu'une autre étude ait montré, chez l'obèse, une augmentation locale d'expression du TNF α dans les tissus musculaires, laquelle est corrélée avec une altération de la sensibilité à l'insuline (186). L'activation ou l'inhibition de la voie

IKK/NF- κ B dans le muscle n'entraîne ni induction de cytokines inflammatoires ni amélioration de la sensibilité à l'insuline dans le muscle et de l'homéostasie glucidique systémique (187,188). Ces observations ne s'expliquent pas par une absence de réponse au TNF α dans le muscle. En effet, celle-ci est bien active dans ce tissu comme le montre une étude dans laquelle des sujets sains soumis à l'action du TNF α présentent une apparition de l'insulino-résistance musculaire associée à une altération de la phosphorylation de Akt et de la synthèse du glycogène dans le tissu musculaire (189).

Contrairement au TNF α , une cytokine comme IL-6 est capable d'induire une lipolyse dans le tissu musculaire. En effet, la perfusion aiguë d'IL-6 à une concentration physiologique chez des sujets sains n'induit aucun effet sur la concentration plasmatique de glucose. Cependant, après 60 minutes, on constate une augmentation systémique de l'oxydation des AGs d'environ 2 fois et cela durant les 2 heures suivant la perfusion (190). L'augmentation de l'oxydation des AGs est associée à une augmentation de la lipolyse systémique. Comme durant cette période, la cinétique de libération des acides gras et de la lipolyse du tissu adipeux est restée inchangée, on peut considérer que l'augmentation de la lipolyse est d'origine musculaire.

Cette augmentation de la lipolyse musculaire est concomitante de l'augmentation de la phosphorylation de STAT3, une cible située en aval de la liaison de IL-6 à son récepteur. Il est connu que STAT3 est impliqué dans les activités de la chaîne de transport des électrons dans le foie et le cœur ce qui pourrait fournir une connexion entre les effets de l'IL-6 et de l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique (191).

Le LPS joue également un rôle dans la résistance à l'insuline du tissu musculaire. Le LPS ou les AGSs induisent, sur des myoblastes, la synthèse de céramides, un intermédiaire qui relie l'inflammation à la résistance à l'insuline en bloquant l'activité de Akt/PKB dans les cellules musculaires. Cette induction est associée à IKK β qui augmente ensuite l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des céramides (124).

e. Inflammation et Cerveau

Le cerveau renferme le site de régulation centrale de l'appétit et de la dépense énergétique. Bien que généralement, il ne soit pas classé comme 'organe métabolique', le cerveau, et plus spécifiquement l'hypothalamus, répond à divers signaux tels que les signaux métaboliques endocriniens, les micronutriments, l'insuline, et la leptine

sécrétée à partir du tissu adipeux. L'insuline et la leptine présentent tous les deux, via la signalisation hypothalamique, des effets anti-appétants importants. Curieusement, des études récentes ont révélé que pendant l'obésité, les voies inflammatoires de l'hypothalamus sont également activées. L'équipe de De Souza (192) a montré une augmentation d'expression de TNF α , IL-1 β , et IL-6 dans l'hypothalamus chez les rats nourris par un régime riche en graisses. Il est également connu qu'au cours de l'obésité, l'hypothalamus manifeste une résistance à l'insuline et à la leptine. Ceci se traduit par la perte du contrôle de l'appétit, d'une modification du comportement alimentaire, et finalement d'une augmentation du poids corporel (193).

Existe-t-il une relation entre cette inflammation locale et l'insulino-résistance observée au niveau de l'hypothalamus? Et quelles en sont les conséquences? Chez la souris nourrie par un régime gras, l'activation spécifique de la kinase inflammatoire IKK β cérébrale entraîne une augmentation de la prise alimentaire et du poids corporel associé à une résistance hypothalamique à l'insuline et à la leptine. Au contraire, l'inhibition de cette voie de signalisation dans le cerveau restaure la sensibilité à l'insuline et à la leptine et protège du gain de poids des souris induit par le régime riche en graisses (194).

La voie de signalisation inflammatoire IKK peut aussi être activée dans l'hypothalamus par les agonistes de TLRs tels que le LPS et les AGSs: une perfusion d'un inhibiteur de TLR4 via la canule intracérébroventriculaire protège les rats de la réponse inflammatoire provoquée par des AGSs et parallèlement diminue la prise alimentaire et le gain de poids corporel (195). De fait, l'inhibition de l'action soit de TLR4 soit du TNF α chez des souris obèses réduit l'inflammation dans l'hypothalamus et ceci est associé à une réduction de la résistance à la leptine hypothalamique et à une amélioration de la transduction des signaux de l'insuline dans le foie (196). La stéatose hépatique ainsi que l'expression hépatique des marqueurs de stéatose sont diminués. La réduction de l'inflammation dans l'hypothalamus est aussi associée à la restauration de la production du glucose hépatique. Cependant, tous ces effets bénéfiques peuvent être abrogés par la vagotomie, confirmant ainsi le rôle du nerf vague dans l'amélioration de l'homéostasie glucidique dans le foie contrôlée par l'hypothalamus.

La JNK pourrait jouer un rôle dans l'inflammation hypothalamique et l'insulino-résistance. La délétion spécifique de JNK1 dans le cerveau de souris se traduit par une protection vis à vis de la résistance à l'insuline, de l'hyperinsulinémie, et de l'intolérance au glucose induite par le régime gras (197,198). Ces souris n'exprimant plus la JNK1

dans le cerveau sont plus petites que les animaux témoins et présentent une augmentation à la fois de la signalisation par les hormones thyroïdiennes et du processus de thermogénèse. Cependant Le mécanisme d'action de la JNK dans l'insulino-résistance n'est pas encore clairement défini.

L'inflammation du système nerveux central au cours de l'obésité semble être un facteur déterminant dans la prise de poids et la résistance systémique à l'insuline.

3.2. Compensation et défaillance des cellules β du pancréas

Lors de l'apparition de l'insulino-résistance, les cellules β pancréatiques augmentent leur sécrétion d'insuline afin de maintenir le glucose plasmatique à un taux normal. Ce processus est appelé 'compensation par les cellules β '. Cette compensation s'effectue via une augmentation du nombre de ces cellules (199,200) ainsi que via une activation des fonctions de ces cellules β (201,202) (Figure 11).

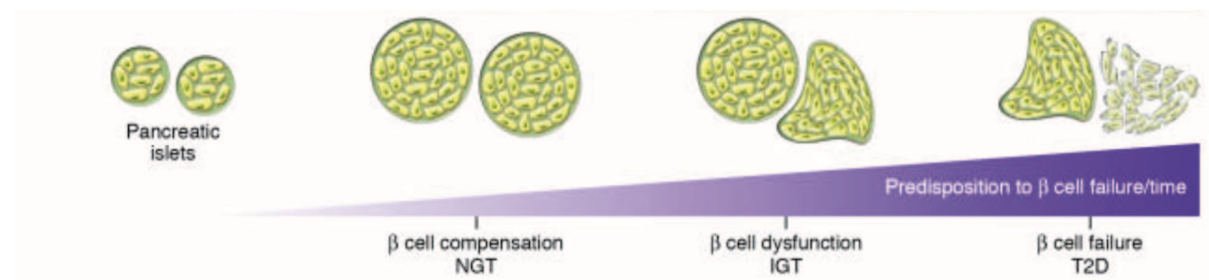


Figure 11: L'évolution de cellules β dans la compensation de l'insulino-résistance.

Le DT2 se développe en réponse à la surcharge en nutrition et le manque d'activité physique chez les sujets qui ont des prédispositions génétiques et acquises sous-jacentes à la fois la résistance à l'insuline (et / ou une hyperinsulinémie) et le dysfonctionnement de cellule β . Au fil du temps, la compensation des cellules β sur la résistance à l'insuline entraîne une diminution progressive de la fonction de ces cellules. En conséquence, les sujets progressent de la tolérance au glucose normale (NGT) au l'intolérance au glucose (IGT) et finissent par le DT2 (figure modifiée d'après (203)).

3.2.1. Compensation par l'expansion de la masse de cellules β

Différents facteurs sont impliqués dans la compensation via l'augmentation de la masse des cellules pancréatiques. Il s'agit de l'augmentation de facteurs nutritionnels tels que le glucose (199,204) et les AGs (205) et de facteurs hormonaux comme le GLP-1 (205,206), l'insuline, et les IGF (207).

La signalisation par les AGs s'opère via leurs récepteurs (FFAR-1) qui sont fortement exprimés dans les cellules pancréatiques et semblent jouer un rôle dans le processus prolifératif (208,209).

Le GLP-1 augmente, lui aussi, la prolifération des cellules β et agit comme un facteur de survie via différentes voies de signalisation comme IRS-2/PKB/CREB (cAMP response element-binding protein) (210) et PKB/EGFR (epidermal growth factor receptor)/PI3K (211).

L'insuline et les facteurs de croissance, IGF1 et IGF2 participent également à ce processus de compensation en agissant sur les IRS-2 qui ensuite activent la PKB (207). La PKB activée protège les cellules β de l'apoptose grâce à la phosphorylation et à l'inhibition des protéines pro-apoptotiques tels que BAD (Bcl-2-associated death promoter) (200).

3.2.2. Compensation par l'augmentation de la fonction des cellules β

Au cours de l'insulino-résistance, la fonction cellulaire pancréatique est significativement augmentée afin d'équilibrer la concentration plasmatique du glucose.

L'augmentation du métabolisme glucidique des cellules β augmente la libération de l'insuline via la voie du canal K^+ -ATP-dépendant (212,213). De plus, le pyruvate dérivé du glucose peut être métabolisé par la pyruvate carboxylase (PC) donnant l'acide oxalo acétique qui entre dans la voie anapylrotique/cataplérotique. La participation du pyruvate à cette voie peut augmenter la sécrétion d'insuline en augmentant des signaux provenant de dérivés cataplérotiques (NADPH) via le cycle malate-pyruvate (214).

La présence des AGs est essentielle pour l'action des cellules β dans la normalisation et l'amplification de l'action du glucose intervenant dans le processus de sécrétion de l'insuline (GSIS) (215). Au moins deux voies de signalisation par les AGs pourraient être impliquées:

- D'une part, la liaison des AGs avec leur récepteur FFAR1/GPR40 situé sur la membrane cellulaire des cellules β qui active certaines voies de signalisation intracellulaire dont une augmentation du Ca^{2+} intracytoplasmique qui est nécessaire pour la sécrétion de l'insuline (216).
- D'autre part, l'interaction entre le malonyl-CoA et les acyl-CoAs dérivés de AGs. En effet, le malonyl-CoA (dérivé de l'acétyl-CoA) inhibe l'oxydation des acyl-CoAs, ce qui provoque donc l'accumulation de ces derniers. Lorsque les acyl-CoAs

s'accumulent dans le cytoplasme, ils peuvent stimuler la sécrétion de l'insuline ou bien directement via l'exocytose de l'insuline (217) ou bien indirectement via soit la formation des lipides complexes (218), soit l'activation de protéine kinase C (219) ou encore soit l'acylation de protéines (220).

En plus de son rôle dans l'expansion des cellules β , l'hormone incrétine GLP-1 est susceptible d'être aussi impliquée dans l'amélioration de la fonction de ces cellules dans les processus de compensation (205,206). En effet, le GLP-1 ainsi que le glucose sont également des stimulants majeurs permettant l'activation de la transcription du gène de l'insuline (221).

Le système nerveux peut également contrôler la compensation des fonctions des cellules β . En effet, le pancréas est riche en terminaisons nerveuses sympathiques et parasympathiques (222). Le cerveau ainsi que l'activité du système nerveux parasympathique interviennent dans le processus de compensation via la croissance et la stimulation de la fonction des cellules β . En effet, des lésions de l'hypothalamus ventro-médian chez le rat provoquent une prolifération des cellules β , due à une l'hyperactivité vagale. La vagotomie ou l'administration d'atropine inhibe complètement cet effet (223).

D'ailleurs, des changements de l'activité neurosympathique induits dans le tissu des îlots de Langerhans sont également susceptibles d'être impliqués dans la compensation. Ainsi, la perfusion de lipides chez le rat permet d'abaisser l'activité nerveuse α 2-adrénergique sympathique et conduit à une augmentation de GSIS des cellules β (224).

3.2.3. Défaillance des cellules β

De nombreux facteurs sont impliqués dans l'initiation du processus de défaillance des cellules β :

- **Le dysfonctionnement mitochondrial et la production de ROS:** l'augmentation du métabolisme du glucose via l'oxydation mitochondriale se traduit par une augmentation du potentiel membranaire de la mitochondrie ainsi que par une production accrue d'ions superoxydes (ROS) (225,226). Une surexposition des cellules β aux ROS entraîne l'activation de l'UCP2 (uncoupling protein 2) (227,228). Il est connu

que l'augmentation quantitative de l'UCP2 altère la capacité des cellules β à sécréter l'insuline, à cause d'une diminution de la synthèse d'ATP (229). C'est la combinaison des facteurs suivants: insulino-résistance et taux anormalement élevé d'oxydation du glucose (230) ou insulino-résistance et dysfonctionnement des mitochondries dû à des mutations génétiques (231), qui conduit à des dommages oxydatifs des cellules β et finalement à une défaillance fonctionnelle.

- **L'altération de la voie anaplérotique/cataplérotique:** cette voie métabolique joue un rôle important dans le GSIS. D'une part, l'activité de cette voie est augmentée lors de la compensation des cellules β et d'autre part, son altération peut provoquer une perte de GSIS. Les AGSs en excès perturbent cette voie comme l'a décrit l'équipe de Iizuka (232) qui montre que l'exposition à long temps des cellules β pancréatiques au palmitate entraîne une réduction de l'activité de la PC (enzyme de la première étape anaplérotique de l'utilisation du pyruvate). On constate que cette réduction est associée à l'altération du GSIS des cellules β . L'existence de ce lien entre la faible activité de la PC et l'altération du GSIS des cellules β est corroborée par des études *in vivo*, dans lesquelles, il est établi que les cellules β pancréatiques de rats diabétiques (Goto-Kakizadi et Zucker diabetic fatty) expriment faiblement la PC (233,234).

- **La glucolipototoxicité:** c'est une présence concomitante de taux plasmatiques élevés de glucose et d'AGs qui serait responsable de la défaillance des cellules β . L'augmentation du glucose et des AGs circulants entraîne une augmentation de leur métabolisme dans les cellules β . Les AGs sont métabolisés en acyl-CoAs qui entrent dans les mitochondries de diverses cellules en général et dans les cellules β en particulier via l'enzyme CPT-1 (carnitine-palmitoyl transférase-1), puis ces acyl-CoAs subissent la β -oxydation. Le glucose, quand à lui, est métabolisé en acétyl CoA qui entre normalement dans le cycle de Krebs. En présence d'un taux élevé de glucose, une partie de cet Acétyl-CoA sera métabolisée en malonyl-CoA. Ce composé se trouve être un inhibiteur de la CPT-1 et donc il peut bloquer la β -oxydation des acyl-CoAs dérivés des AGs. L'accumulation de ces acyl-CoAs va conduire alors, directement ou indirectement, à la formation de lipides complexes comme les céramides qui provoquent la résistance à l'insuline, l'altération du GSIS, et l'apoptose des cellules β (215,235).

A la suite de ce processus initial de défaillance des cellules β , la seule survenue d'une hyperglycémie peut engendrer des phénomènes de toxicité supplémentaires. Cette glucotoxicité peut intervenir (236) en augmentant l'ensemble des phénomènes suivants: le stress oxydatif (236), l'activité de la voie des glucosamines (236), le stress du RE, la glucolipotoxicité (237), la glycation (236), l'activation des voies inflammatoires (238) et l'accumulation de l'IAPP (Islet amyloïde polypeptide) qui est, lui aussi, un composé toxique (239). Le résultat final sera donc la dédifférenciation et la mort des cellules β par apoptose (240).

Après avoir passé en revue tous les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance à l'insuline, nous allons maintenant aborder les origines diverses de l'installation de cette pathologie. Quels sont les facteurs qui prédisposent ou qui sont directement impliqués dans la résistance à l'insuline?

3.3. Origine de la pathologie

3.3.1. Le facteur génétique

Des facteurs génétiques constituent une des origines du DT2. Plusieurs variations génétiques récemment identifiées sont impliquées dans l'insulino-résistance périphérique ainsi que dans le dysfonctionnement des cellules β pancréatiques. Chacune de ces variations génétiques possède par elle-même un faible impact sur l'incidence du DT2. En se fondant sur le nombre de mutations en cause, le DT2 d'origine génétique peut être divisé en deux groupes: le DT2 monogénique et le DT2 polygénique.

3.3.1.1. Le DT2 monogénique

Le DT2 monogénique est caractérisé par l'existence de mutations dans un seul gène (Tableau 1). Classiquement, le diabète monogénique qui se développe dans les six premiers mois de la vie a été désigné comme le diabète néonatal (DN), et celui qui se développe chez les jeunes adultes est nommé le diabète de maturité (MODY) (241).

Le DN est une maladie monogénique qui est causée par des mutations dans des gènes qui jouent souvent un rôle clé dans la fonction ou le développement des cellules β , y compris la fonction de la glucokinase, du canal K_{ATP} , et de l'insuline elle-même. L'incidence de ce type de DT2 est faible (1/200.000 des naissances). Ce type de diabète

peut être permanent ou transitoire ou bien suivre des alternances de rémissions-récidives. La maladie est généralement associée à un retard de croissance in-utero et à un poids de naissance inférieur à la normale. Ce diabète, même s'il apparaît très tôt dans le développement, est différent du diabète de type 1 (242).

Le MODY est typiquement diagnostiqué en dehors de la période néonatale mais avant l'âge de 25 ans. Les mutations génétiques peuvent concerner des facteurs de transcription ainsi que des gènes impliqués dans le fonctionnement des cellules β . Ces mutations peuvent conduire à une détérioration progressive de la fonction des cellules β et en conséquence provoquer une hyperglycémie et éventuellement le diabète (242). Presque 90 % des cas sont reliés à des mutations dans les gènes soit de la glucokinase soit des facteurs de transcription HNF-1 α (hepatocyte nuclear factor) et HNF-1 β , et HNF-4 α (241).

Tableau 1: Sous-type du diabète monogénique (tableau modifié d'après (243))

| Nom de gène (locus) | Protéine | Fonction de Protéine | Phénotype de diabète |
|----------------------------|----------------------------------|---|---|
| MODY | | | |
| <i>HNF4A</i> (20q12) | HNF4 α | Facteur de transcription | MODY1, à l'adolescence ou jeune adulte (et hyperinsulinisme néonatal) |
| <i>GCK</i> (7p15) | Glucokinase | Phosphorylation du glucose | MODY2, hyperglycémie légère (apparition dans la petite enfance, et tout au long) (fréquente) |
| <i>HNF1A</i> (12q24) | HNF1 α | Facteur de transcription | MODY3, à l'adolescence ou jeune adulte (fréquente) |
| <i>PDX1</i> (13q12) | IPF1 | Facteur de transcription | MODY4, jeune adulte (similaire à HNF1A mais rare) |
| <i>HNF1B</i> (17q21) | HNF1 β | Facteur de transcription | MODY5, jeune adulte, les kystes et le diabète rénaux (RCAD) |
| <i>NEUROD1</i> (2q32) | Beta2 | Facteur de transcription | MODY6, jeune adulte (similaire à HNF1A mais rare) |
| <i>INS</i> (11p15.5) | Preproinsulin, insulin | Hormone, l'effet hypoglycémiant et l'anabolisme | MODY7, dans l'enfance et jeune adulte |
| ND | | | |
| <i>PLAGL1</i> (6q24) | Pleiomorphic adenoma gene-like 1 | Nuclear zinc finger protein | ND transitoire; Chromosome 6Q anomalies structurales avec des mécanismes à empreinte (défauts de méthylation) |
| <i>KCNJ11</i> (11p15.1) | Kir6.2 | K channel pore-forming subunit | ND permanent et transitoire |
| <i>ABCC8</i> (11p15.1) | SUR1 | canal K sous-unité régulatrice et le récepteur sulfonylurée | ND permanent et transitoire |
| <i>GCK</i> (7p15) | Glucokinase | Phosphorylation du glucose | ND permanent des mutations homozygotes |

| | | | |
|---|---|---|---|
| <i>INS</i> (11p15.5) | Insuline | Hormone, l'effet hypoglycémiant et l'anabolisme | ND permanent et le diabète précoce enfance; mutations hétérozygotes dans les régions codage de <i>INS</i> /mutations homozygotes dans les régions régulatrices de l' <i>INS</i> |
| ND associée à des anomalies du développement et/ou fonctionnalités extra-pancréatiques | | | |
| <i>PDX1</i> (13q12) | IPF1 | Facteur de transcription | Pancréas agénésie et ND des mutations homozygotes |
| <i>EIF2AK3</i> (2p12) | PERK | Pancreatic eIF2-alpha kinase | Wolcott-Rallison syndrome (diabète associé à une dysplasie épiphysaire) |
| <i>PTF1A</i> (10p12) | Pancreas-specific transcription factor 1a | Facteur de transcription | ND associée à une hypoplasie du pancréas et hypoplasie cérébelleuse |
| <i>GLIS3</i> (9p24.2) | GLI-similar 3 transcription factor | Facteur de transcription | ND associée à l'hypothyroïdie congénitale (syndrome NDH) |
| <i>FOXP3</i> (Xp11.23) | Forkhead box P3 | Facteur de transcription | X-linked IPEX syndrome (avec l'auto-immunité diffuse) |
| <i>HNF1B</i> (17q21) | HNF1β | Facteur de transcription | ND transitoire associée à une atrophie pancréatique et/ou des anomalies rénales |

3.3.1.2. Le DT2 polygénique

Des études dont les GWAS (genome-wide association studies) ont récemment identifié plus de 40 gènes associés à un risque accru de DT2 (Tableau 2). Les mutations sur ces gènes sont des SNPs (single-nucleotide polymorphisms) car une seule base est affectée et généralement située dans les régions non codantes (242). Parmi tous les gènes impliqués dans cette pathologie, celui codant pour le TCF7L2 (facteur de transcription 7-like 2) est responsable d'un accroissement de susceptibilité au DT2 (244–246).

Tableau 2: Gènes et locus les plus répliqués DT2 susceptibilité (tableau modifié d'après (243))

| Gènes (suggéré) | Locus | Protéine | effet assumé de l'allèle de risque |
|--|-------------|---|--|
| Etudes de gènes candidats biologiques | | | |
| <i>PPARG</i> | 3p25 | Peroxisome proliferator-activated receptor-γ | Diminution de la sensibilité à l'insuline et de la clairance de l'insuline |
| <i>KCNJ11</i> | 11p15.1 | Canal K inwardly-rectifying, sousfamille J, membre 11 | Diminution de la fonction de cellules β, de la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose (GSIS), et de la sensibilité à l'insuline |
| <i>HNF1B</i> | 17cen-q21.3 | Hepatocyte nuclear factor 1-beta | Diminution de la fonction de cellules β |
| <i>WFS1</i> | 4p16 | Wolfram syndrome 1 (wolframin) | Diminution de la fonction de cellule β et de la sécrétion d'insuline |

| | | | |
|--|----------------|--|--|
| <i>GCK</i> | 7p15.3-p15.1 | Glucokinase (Hexokinase 4) | - Diminution de la fonction de cellule β et de GSIS. - Augmentation de la glycémie à jeûn et de l'hémoglobine glyquée |
| Exploration des pics de liaison | | | |
| <i>TCF7L2</i> | 10q25.3 | Transcription factor 7-like 2 (T-cell-specific, HMG-box) | - Diminution de la fonction de cellule β , de la sécrétion de l'insuline stimulé par l'incrétine, de GSIS, de la conversion de la proinsuline, de la sensibilité à l'insuline, de l'indice de la disposition. - Augmentation de la glycémie à jeûn et du glucose à 2h |
| GWAS pour DT2 | | | |
| <i>CDKN2A/2B</i> | 9p21 | Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/2B | Diminution de la fonction de cellule β , de GSIS, de l'indice de disposition |
| <i>CDKAL1</i> | 6p22.3 | CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1 | Diminution de la fonction de cellule β , de GSIS, de la conversion de la proinsuline, et de l'indice de disposition |
| <i>SLC30A8</i> | 8q24.11 | Transporteur soluté famille 30 (transporteur de zinc), membre 8 | - Diminution de la fonction de cellule β , de GSIS, de la conversion de la proinsuline, et de l'indice de la disposition. - Augmentation de la glycémie à jeûn, du glucose à 2h et de l'hémoglobine glyquée |
| <i>IGF2BP2</i> | 3q27.2 | Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2 | Diminution de la fonction de cellule β , de GSIS, et de l'indice de disposition |
| <i>THADA</i> | 2p21 | Thyroïde adénome associé | Diminution de la fonction des cellules β , de la sensibilité à l'insuline, de la sécrétion d'insuline de deuxième phase, de l'indice de disposition, et de la réponse de l'insuline stimulée par le GLP-1 et l'arginine |
| <i>NOTCH2</i> | 1p13-p11 | Neurogenic locus notch homolog protein 2 (<i>Drosophila</i>) | Pas de données |
| <i>CDC123</i> | 10p13 | cycle de division cellulaire 123 homolog (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) | Diminution de la fonction de cellule β et de la sécrétion d'insuline |
| <i>CAMK1D</i> | Pas de données | Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D | Pas de données |
| <i>HHEX</i> | 10q23 | Hematopoietically expressed homeobox | Diminution de la fonction de cellule β , de GSIS, de la sensibilité à l'insuline, de la conversion de la proinsuline, et de l'indice de disposition |
| <i>IDE</i> | Pas de données | Enzyme de dégradation de l'insuline | Pas de données |
| <i>TSPAN8</i> | 12q14.1-q21.1 | Tetraspanin 8 | Diminution de la fonction de cellule β , de la sécrétion d'insuline, et de la sensibilité à l'insuline |
| <i>LGR5</i> | 12q22-q23 | Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 | Pas de données |
| <i>ADAMTS9</i> | 3p14.3-p14.2 | ADAM metallopeptidase avec thrombospondin type 1 motif, 9 | Diminution de la sensibilité à l'insuline |

| | | | |
|---|----------------|---|---|
| <i>JAZF1</i> | 7p15.2-p15.1 | Juxtaposé avec une autre zinc finger protein 1 | - Diminution de la fonction des cellules β . - Augmentation de la sécrétion d'insuline et de l'insuline à jeûn |
| <i>IRS1</i> | 2q36 | Insulin receptor substrate 1 | - Augmentation de la résistance à l'insuline, de l'insuline à jeûn, et de l'insuline à 2h. - Diminution de la sensibilité à l'insuline, |
| <i>KCNQ1</i> | 11p15.5 | Canal K voltage-dépendants, sous-famille KQT-like, membre 1 | Diminution de la fonction de cellule β , de la sécrétion d'insuline, et de la sécrétion d'incrétine |
| <i>FTO</i> | 16q12.2 | masse grasse et protéine associée à l'obésité | Augmentation du risque de l'obésité, de l'indice de masse corporel, et de la masse grasse, augmentation des triglycérides et du cholestérol |
| GWAS pour les caractères liés au DT2 | | | |
| <i>GCKR</i> | 2p23 | Régulateur de Glucokinase (hexokinase 4) | Augmentation de la résistance à l'insuline, de l'insuline à jeûn, de la glycémie à jeûn, et du glucose à 2h |
| <i>MTNR1B</i> | 11q21-q22 | Melatonin receptor 1B | - Diminution de la fonction de cellule β , de GSIS, et de l'indice de la disposition. - Augmentation de la glycémie à jeûn et de l'hémoglobine glyquée |
| <i>ADCY5</i> | 3q13.2-q21 | Adenylate cyclase 5 | - Diminution de la fonction de cellule β . - Augmentation de la glycémie à jeûn et du glucose à 2h |
| <i>PROX1</i> | 1q32.2-q32.3 | Prospero homeobox 1 | - Diminution de la fonction de cellule β - Augmentation de la glycémie à jeûn |
| <i>DGKB</i> | 7p21.2 | Diacylglycerol kinase, beta 90 kDa | - Diminution de la fonction de cellule β , - Augmentation de la glycémie à jeûn |
| <i>TMEM195</i> | Pas de données | Transmembrane protein 195 | Pas de données |

3.3.2. Les facteurs environnementaux

3.3.2.1. Excès en nutriments et obésité

Le DT2 est souvent associé à une surcharge énergétique, une faible activité physique et à l'obésité. C'est la conséquence d'un déséquilibre dans le rapport entre ingestion de nutriments et dépense énergétique. Chez les souris, la consommation prolongée d'aliments riches en graisses induit des troubles métaboliques, l'insulino-résistance et enfin le DT2. De nombreuses études ont tenté d'améliorer le DT2 via la modification des compositions alimentaires. Pour cela, des régimes en faible teneur en glucides ou en lipides ou contenant des protéines avec plus ou moins de fibres ont été utilisés. Shai et ses collègues (247) ont montré qu'un régime en faible teneur en glucides ainsi qu'un régime méditerranéen sont plus efficaces dans la perte du poids par rapport à un régime de faible teneur en graisses. Le régime méditerranéen, après 24 mois de traitement, entraîne une diminution significative de la CRP (C-reactive protein), de la

glycémie à jeûn, et de l'insulino-résistance (247). D'autres études ont montré que ce régime était aussi associé à la réduction de la Triglycéridémie et de la HbA1c (glycated haemoglobin) (248,249). Le bénéfice de ce régime méditerranéen est probablement relié à sa richesse en fibres contenues dans les graines et les légumineuses, en vitamines contenues dans les fruits et en acides gras (AGs) mono-insaturés trouvés dans l'huile d'olive (250). En effet, les acides gras mono-insaturés de l'huile olive sont impliqués dans l'augmentation du taux d'adiponectine, lequel est corrélé avec la sensibilité à l'insuline (251-253). De plus, ce régime, riche en fibres, contribue à augmenter la sensation de satiété et donc permet de réduire l'apport calorique (254).

Des études portant sur l'utilisation de régimes riches en acides gras saturés (AGSs), représentant de 9 à 67 % des apports caloriques totaux, montrent une augmentation de l'insulino-résistance. Au contraire, l'augmentation de la proportion d'acides gras mono ou poly-insaturés ne donne pas d'effet ou se traduit par des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline (255).

Concernant la contribution de l'obésité dans l'apparition du DT2, celle ci pourrait être à l'origine d'une altération des signaux de l'insuline et donc provoquer l'insulino-résistance et le DT2. En effet, l'obésité est associée à une augmentation de l'inflammation du tissu adipeux qui interfère avec la réponse à l'insuline (26,116).

3.3.2.2. Rôle des polluants et de AhR (aryl hydrocarbure receptor)

Ce n'est que récemment que certaines études épidémiologiques ont mis en évidence l'existence d'un lien entre la présence de certains polluants environnementaux et l'augmentation de l'incidence du DT2. Les polluants impliqués dans cette prédisposition au DT2 sont d'origine organique et sont souvent des ligands du AhR. Parmi les ligands d'AhR, on peut citer le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD), les polychlorinated biphenyls (PCBs), le benzo(a)pyrene (BaP), les particules issues de la combustion diésel, les hydrocarbures, le 3-methylcholanthrene.

Une équipe belge a trouvé une forte corrélation entre l'intoxication par les dioxines/PCBs et le DT2 (256). Des résultats similaires ont été montrés en Suède dans une communauté de pêcheurs contaminés aux PCBs (257). Plusieurs études aux Etats Unies confirment l'existence d'une relation étroite entre les polluants organiques et la résistance à l'insuline ou l'apparition du diabète (258,259).

Plusieurs études ultérieures *in vitro* et *in vivo* ont démontré que le traitement de rats par TCDD altère au niveau du tissu adipeux, l'absorption du glucose stimulée par l'insuline en réduisant probablement la transcription du transporteur de GLUT4 (260). Par ailleurs, le traitement de souris par le TCDD réduit l'expression du gène de la glucokinase (261). Chez le rat, le TCDD diminue la prise alimentaire et inhibe l'activité de la phosphoénolpyruvate carboxykinase, enzyme impliquée dans la gluconéogenèse (262). Des effets du TCDD sur l'inhibition de la sécrétion de l'insuline (263) ainsi que sur l'augmentation de l'expression de cytokines inflammatoires comme le TNF α (Tumor necrosis factor α), ont été rapportés (264). En outre, un autre analogue du TCDD, le BaP diminue l'expression du GLP-1 (glucagon-like peptide-1) chez les souris nourries avec un régime gras (265).

Tous les effets du TCDD rapportés ci-dessus semblent s'effectuer via AhR et aussi via PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ). Il est en effet bien connu que le TCDD est un agoniste de AhR mais aussi un antagoniste de PPAR γ . AhR constitue un récepteur aux xénobiotiques et à des composés endogènes comme le 7-ketocholestérol. Via sa dimérisation avec NF- κ B (nuclear factor kappa B), ce récepteur est impliqué dans la régulation de l'inflammation, ainsi que dans la détoxification via l'induction du Cyp1a/b (cytochrome P450), et dans la différenciation monocytaire (266). PPAR γ est impliqué dans la différenciation des adipocytes ainsi que dans le contrôle du métabolisme et de l'homéostasie lipidique. De plus, le TCDD pourrait altérer la sensibilité à l'insuline via l'augmentation de l'expression de PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor- α), impliqué principalement dans l'oxydation des AGs (267).

3.3.3. La flore intestinale

L'interaction entre la flore intestinale, l'homéostasie glucidique, l'insulino-résistance, et le DT2 est désormais établie.

La flore intestinale représente le total de la population des microorganismes qui s'installe dans le tractus gastro-intestinal, y compris les bactéries, les champignons, les archées, les virus, ainsi que les protozoaires. Cette flore se compose d'une population d'environ 100 trillions de microorganismes représentant une masse comprise entre 1,5 et 2 kg. Cette microflore vit en tant qu'écosystème complexe (268). Elle est considérée comme une sorte d'organe microbien qui exerce des fonctions clés que l'hôte est incapable d'effectuer par lui-même.

Au sein de cette population riche et diversifiée, prédominent les bactéries anaérobies (269). Chez l'homme, la flore bactérienne intestinale est dominé par 2 grands phylums: les Firmicutes et les Bactéroïdètes tandis que les phylums des Actinobactéries, des Proteobacteria, des Verrucomicrobia, des Fusobacteria et des Cyanobacteria sont mineurs (270).

L'installation de la flore bactérienne s'effectue rapidement après la naissance. Cette installation est influencée principalement par la flore vaginale et intestinale de la mère et de l'environnement. Evidemment, la flore intestinale des enfants nés naturellement est similaire à la flore vaginale de leur mère (271). Le tractus intestinal de nouveau-né est colonisé premièrement par des bactéries aérobies composées d'entérobactéries, d'entérocoques et de staphylocoques. Et au fur à mesure, l'installation des bactéries anaérobies strictes comme Bifidobacterium, Clostridium et Bacteroides est observée (272). Plusieurs facteurs pourraient être impliqués dans l'installation et la composition de flore comme le mode d'accouchement, la maturation de la grossesse, le mode de vie, l'alimentation, l'antibiothérapie ainsi que le génome humain. Pourtant, après un an, la flore intestinale commence à se stabiliser et ressembler de celle du jeune adulte (273).

3.3.3.1. Les fonctions de la flore intestinale

Grace à sa complexité, sa diversité et sa grande quantité, la flore intestinale à l'état sain peut exercer différentes fonctions physiologiques qui pourraient impacter sur la santé de l'hôte.

- **Métabolisme des polysaccharides et des protéines:** la flore bactérienne peut intervenir dans la dégradation et la fermentation de certaines substances alimentaires. C'est le cas de polysaccharides et de certains sucres (l'inuline, les gommés...) d'origine végétale que l'hôte n'est pas capable de dégrader. La flore microbienne les dégrade et/ou fermente en donnant des acides gras à chaînes courtes (AGCCs) comme l'acétate, le propionate et le butyrate qui sont rapidement absorbés par les cellules épithéliales et utilisés par différents organes. Cette flore intestinale peut également participer dans le métabolisme protéique en fournissant aussi des AGCCs, des acides gras à chaînes courtes ramifiées (isobutyrate, 2-méthylebutyrate et isovalérate), du phénol, de l'indole

et l'ammoniac. Ces trois derniers sont ensuite métabolisés et éliminés par voie urinaire (274).

- **Régulation et le stockage énergétique:** la flore intestinale joue un rôle important dans la régulation et le stockage d'énergie. Par rapport aux souris normales, la masse grasseuse de souris axénique est 40% inférieure. Cette différence pourrait être expliquée par:

- L'effet inhibiteur de la flore bactérienne sur le Fiaf (fast-induced adipocyte factor) qui est produit par l'intestin, le foie et le tissu adipeux. Le Fiaf est un inhibiteur de la lipoprotéine lipase et donc il pourrait bloquer la captation des AGs par les cellules et l'accumulation des graisses dans les adipocytes (275).
- La présence d'un taux élevé de AMPK dans les muscles et le foie de souris axéniques. Cette kinase est connue dans la régulation d'énergie cellulaire (276).
- Les AGCCs: le butyrate constitue la principale source énergétique pour les cellules épithéliales intestinales qui semblent participer à la sensibilité à l'insuline et à la balance énergétique, tandis que le propionate et l'acétate jouent principalement un rôle dans la gluconéogenèse. Il a été montré que dans le colon, le butyrate augmente, via l'interaction avec la GPR41 et la GPR43 (G protein-coupled receptor), la sécrétion à partir des cellules 'L' de deux hormones: le GLP-1 et le PYY (peptide YY) (277-279). La sécrétion de ces hormones a pour conséquence la sécrétion d'insuline qui entraîne une réduction de l'appétit (280).

- **Protection de la colonisation d'agents infectieux:** pour s'installer, les bactéries pathogènes doivent entrer en compétition avec la flore intestinale pour les nutriments. En plus, certaines bactéries commensales peuvent stimuler le système immunitaire contre les pathogènes en sécrétant des antimicrobiens comme les lectines de type C et les immunoglobulines de type A (281).

- **Maintien de l'intergrité et de la structure intestinale:** le butyrate un des AGCCs induit la sécrétion de mucines et de petites antimicrobiens qui permettent ensuite de renforcer la barrière intestinale. De plus, le butyrate augmente également la croissance et le développement des cellules et de tissu.

- **Immunomodulation:** la cohabitation de la flore bactérienne dans le tractus intestinal de l'hôte pourrait s'effectuer en minimisant la réponse immunitaire locale ou systémique grâce à la modulation des réactions immunitaires localisées appelées 'la tolérance'. Evidemment, les études sur les souris axéniques nous montrent de manière spectaculaire des anomalies au niveau du taux des cellules immunitaires ainsi que de la structure lymphoïdes locales et systémiques (malformation de la rate, des ganglions lymphatiques...). Cependant, la colonisation des bactéries commensales de l'intestin ainsi que l'administration de produits de bactéries (polysaccharides A) sur ces souris axéniques peut restaurer et rééquilibrer certaines fonctions du système immunitaire (282,283).

L'ensemble de ces données montre l'importance de la flore intestinale pour l'hôte. Lors d'une altération qualitative ou quantitative de la flore microbienne intestinale (dysbiose), des troubles métaboliques notamment l'obésité, la résistance à l'insuline et le DT2 peuvent être observés.

3.3.3.2. La flore intestinale et DT2

Durant les dix dernières années, divers travaux ont mis en évidence le rôle de la flore intestinale dans le maintien ou l'altération du métabolisme glucidique. En effet, des souris axéniques nourries avec un régime riche en graisses, ne développent pas de DT2. Au contraire, des souris axéniques colonisées avec une flore provenant de souris normales mais soumises à un régime riche en graisses deviennent diabétiques (275,276).

Plusieurs études menées chez la souris ainsi que chez l'homme montrent que l'obésité et la perturbation du métabolisme glucidique sont associées à l'altération, au niveau intestinal, du ratio entre les deux grands phylums, Firmicutes et Bactéroïdètes (284,285). En outre, chez les sujets diabétiques, on observe une déplétion en bactéries productrices de butyrate, telles que les espèces de *Clostridium*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis*, et *Roseburia inulinovorans* (286–288), et l'enrichissement en bactéries pathogènes opportunistes (286). La flore des patients diabétiques se caractérise par une augmentation de l'espèce bactérienne sulfato-réductrice, *Desulfovibrio*, ainsi que des espèces *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri* et *Lactobacillus plantarum* (287,288). D'autres études, menées chez

des patients diabétiques et intolérants au glucose, ont permis une mise en évidence, dans le mucus, d'une diminution de l'abondance de *Akkermansia muciniphila*, bactérie qui joue un rôle dans la fonction de barrière intestinale (289).

De nombreux travaux ont tenté d'expliquer les mécanismes moléculaires sous-tendant le lien existant entre la modification de la flore intestinale et l'apparition du DT2 (Figure 12).

L'inflammation à bas niveau dans différents tissus contribuerait à l'installation de l'insulino-résistance. Ceci serait la conséquence de la libération des LPSs (lipopolysaccharides) bactériens dérivés de la membrane externe des bactéries gram négatives, lesquelles induisent une endotoxémie métabolique qui provoque la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (290). Les études réalisées dans le modèle animal et chez l'homme ont montré que l'alimentation riche en graisses peut moduler le microbiote intestinal et augmenter les taux circulants de LPSs, probablement soit, via l'apparition des LPSs dans les chylomicrons sécrétés par les cellules épithéliales intestinales, soit par l'augmentation de la perméabilité intestinale.

Des souris nourries avec un régime gras présentent une augmentation de l'adiposité et de l'inflammation de bas niveau qui est dépendante de la signalisation médiée par les LPSs. D'autres travaux indiquent que la perfusion de LPSs chez des souris entraîne des changements métaboliques comparables à ceux obtenus avec une alimentation riche en graisses (290–293). Comparées à des souris contrôles, les souris axéniques ainsi que des souris traitées par des antibiotiques présentent un faible taux de LPSs circulant associé à une diminution de l'insulino-résistance (294) (295). Les LPSs sont les ligands des TLRs (toll like receptor) présents sur différents types cellulaires dont majoritairement les macrophages. Ainsi, les LPSs qui activent le TLR4 induit ensuite une réponse inflammatoire avec la production de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de cellules immunitaires (296).

Comme indiqué ci-dessus, la flore intestinale influence également le métabolisme glucidique et énergétique via la production de AGCCs. Alors, l'altération de la flore pourrait déréguler la sécrétion de l'insuline et l'homéostasie glucidique. De la même manière, cette dysbiose pourrait inhiber l'effet AGCCs sur la suppression de l'inflammation provoquée par les cellules immunitaires (297).

L'indole est un composé issu du métabolisme du tryptophane induit par la flore intestinale. Des études récentes font état d'un rôle de ce composé dans la sécrétion du GLP-1 (298,299). Cet effet s'exerce via l'inhibition de canaux K^+ - voltage dépendant présents sur les cellules 'L'. De façon similaire, les microorganismes intestinaux peuvent transformer les acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires, lesquels vont activer le TGR5 (récepteur membranaire des acides biliaires). Ceci entraîne aussi la sécrétion de GLP-1 par les cellules 'L' (300). Par contre, le sulfure d'hydrogène (H_2S), qui est produit par des bactéries exprimant des enzymes sulfato-réductrices, pourrait neutraliser l'activité du TGR5 et exercer un effet inhibiteur sur la libération du GLP-1 et du PYY (301).

La dysbiose est impliquée également dans la diminution de la perméabilité intestinale. Cela pourrait s'effectuer via un mécanisme GLP-2-dépendant (302) et serait sous le contrôle de l'indole produit par les bactéries (303).

Globalement, l'ensemble des données suggère que des altérations du microbiote intestinal pourrait entraîner une rupture de l'étanchéité de l'épithélium provoquant une absorption de macromolécules à partir du contenu intestinal et déclenchant alors des réactions immunitaires systémiques. Ces dernières affecteraient le métabolisme des lipides et du glucose conduisant finalement à une résistance à l'insuline et éventuellement au diabète de type 2.

3.3.3.3. La flore intestinale et métabolome

Le terme métabolome est employé pour qualifier l'ensemble de petites molécules chimiques trouvés dans les échantillons biologiques (plasma, fecès, urine, ...). De manière plus précise et dans notre contexte, le métabolome est désigné pour caractériser l'ensemble de métabolites biologiques trouvés dans le plasma (glucides, lipides, acides aminés, ...).

Une question importante qui se pose est : le microbiote influence-t-il le métabolome?

En comparant le métabolome de souris axéniques et de souris conventionnelles, Wikoff et al. ont trouvé que la flore intestinale impacte particulièrement le métabolisme des acides aminés en augmentant la production des métabolites contenant un noyau indole comme indoxyle sulfate... . Cette flore microbienne augmente également la

production de nombreux acides organiques contenant des groupes phénol. Enfin, l'impact de la flore intestinale sur la capacité de l'hôte dans le métabolisme de médicaments est aussi observé (304).

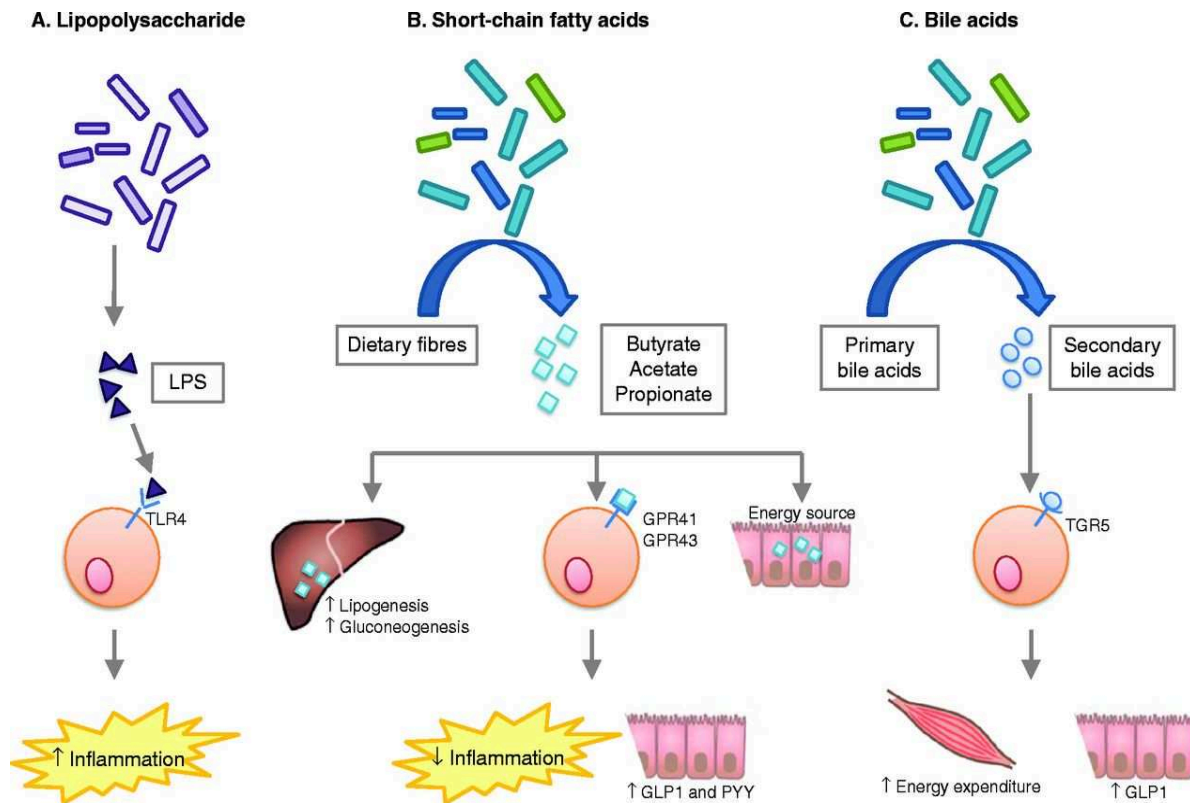


Figure 12: La flore intestinale et le métabolisme de l'hôte.

La flore intestinale peut influencer le métabolisme de l'hôte via de nombreux mécanismes, dont trois mécanismes importants sont représentés. **(A) Rôle du LPS.** Le LPS provient de la membrane externe des bactéries Gram-négatives et se lie au récepteur TLR4, qui active les voies de signalisation pro-inflammatoires résultant, il en résulte une inflammation à bas grade qui entraîne une diminution de la sensibilité à l'insuline. **(B) Rôle des acides gras à chaîne courte.** Les bactéries présentes dans le côlon fermentent des fibres alimentaires en acides gras à chaîne courte (notamment le butyrate, acétate et propionate). L'acétate et le propionate sont utilisés comme substrats pour la gluconéogenèse et la lipogenèse dans le foie, alors que le butyrate est un substrat énergétique important pour les cellules de la muqueuse du côlon. En outre, des acides gras à chaîne courte se lient au GPR41 et GPR43 entraînant des effets différents en fonction de types cellulaires concernés. Dans les cellules immunitaires, cette signalisation entraîne une réduction de l'inflammation et dans les cellules L de l'intestin, elle augmente le taux de GLP-1 et PYY qui conduisent tous ensemble à l'augmentation de la sensibilité à l'insuline. **(C) Rôle des acides biliaires.** Les acides biliaires primaires sont produits par le foie et recirculés de l'intestin vers le foie. Cependant, les bactéries intestinales sont capables de déconjuguer des acides biliaires primaires, ce qui entrave leur recirculation. Les acides biliaires primaires déconjugués sont, en outre, métabolisés par les bactéries intestinales en acides biliaires secondaires. Les acides biliaires secondaires se lient au TGR5, ce qui entraîne l'augmentation de la dépense d'énergie dans les

muscles et la sécrétion de GLP-1 à partir des cellules L. Ces deux processus conduisent à l'augmentation de la sensibilité à l'insuline. LPS: lipopolysaccharide; TLR 4: Toll-like receptor 4; GPR: G protéine-coupled receptor; GLP-1: Glucagon-like peptide-1; TGR5: G protéine-coupled bile acid receptor (305).

A ce jour l'approche médicamenteuse pour traiter le diabète par divers composés pharmacologiques comme metformine, sulfonylurées, incrétines... ne parvient pas à prévenir des risques cardiovasculaires associés. De plus, le risque iatrogène est important et cela s'est traduit par exemple par le retrait de certains médicaments (ligands de PPAR γ). Une inefficacité médicamenteuse est aussi à déplorer en raison des diminutions des posologies consécutives à des toxicités. De plus, l'usage à long terme de ces médicaments entraînent divers effets secondaires comme des troubles intestinaux, des risques cardiovasculaires, hypoglycémiques

La recherche de molécules pouvant améliorer la tolérance au glucose mais aussi les risques associés est d'actualité. Certaines molécules naturelles comme des extraits de cannelle, du chrome ou de la berbérine ont fait l'objet de quelques études. Une famille de molécules naturelles polyphénoliques a fait l'objet de très nombreuses études. Parmi ces dernières, le resvératrol et la curcumine ont des effets sur la glycémie. Il nous a semblé important d'étudier l'effet de ces molécules associées ou pas sur la tolérance au glucose.

II. Les polyphénols

1. Le resvératrol (RSV)

1.1. Généralités

Le Resvératrol est un polyphénol naturel qui fut extrait la première fois en 1940 par un chercheur japonais, Takaoka. Il effectua cette extraction à partir de racines du *Veratrum grandiflorum* Loes (hellébore blanc) (306). Le RSV fut ensuite identifié par Nonomura et al. en 1963 dans la racine du *Fallopia japonica* (ou *Polygonum cuspidatum*), Cette plante d'Asie orientale est utilisée depuis des siècles en médecine traditionnelle chinoise et japonaise contre l'inflammation viscérale, la dermatite purulente, la gonorrhée, l'allergie, les maladies cardiaques et l'hyperlipidémie (307–311). Il fut en suite détecté dans les feuilles de la vigne (*Vitis vinifera*) en 1976 (312) et plus tard dans le vin en 1992 (313). On trouve du RSV dans plus de 70 espèces de plantes réparties en 32 genres, à savoir en premier lieu, dans la peau de raisin noir (le vin et le jus de raisin), les baies noires (mûres, myrtilles), les framboises, les airelles, la canneberge et certains

fruits secs tels que l'arachide sont particulièrement riches en RSV (314–317) (Tableau 3).

Tableau 3: Contenu de RSV dans différentes sources (tableau modifié d'après (318))

| Source | Portion | Total Resvératrol/Portion (µg) |
|--------------------|---------|--------------------------------|
| Racines Itadori | 1 g | ~2200 |
| Thé Itadori | 200 ml | ~2000 |
| Raisins | 100 g | 150-780 |
| Vins rouges | 150 ml | 80-2700 |
| Jus de raisin | 240 ml | 0.12-0.26 |
| Myrtille | 100 g | 86-170 |
| Canneberge | 100 g | ~90 |
| Pistache | 28 g | 2.5-47 |
| Arachides crues | 28 g | 0.6-50 |
| Arachides grillées | 28 g | 0.5-2.2 |
| Beurre d'arachide | 32 g | 4.7-24 |
| Poudre de cacao | 15 g | 19-34 |
| Chocolat noir | 15 g | 3.8-6.5 |
| Chocolat au lait | 15 g | 0.8-2.6 |

Le RSV (3,4',5-tri hydroxy stilbène) appartient à la famille des polyphénols et plus précisément à la classe des stilbènes. C'est une phytoalexine, substance de défense produite par les plantes en condition de stress ou en réponse aux infections (166–168). Par exemple, dans le vin, les deux facteurs les plus importants dans l'induction de la production du RSV résident dans les conditions météorologiques et la présence de champignons (322–325).

La structure du RSV comporte deux cycles phénoliques reliés par une double liaison styrene responsable des formes isomériques cis et trans (Figure 13). Ces deux formes isomères peuvent être séparées en utilisant la chromatographie liquide haute performance (CLHP). Elles se distinguent l'une de l'autre par leur maximum absorption:

prédominante dans l'intestin et le foie (318,341). Sous l'action de l'UGT1A1 (UDP-glycosyltransferase 1 polypeptide A1) et de la SULT1A1 (sulfotransferase), le RSV est métabolisé en différents composés glucurono conjugués et sulfatés, y compris le 'resveratrol-3-O-glucuronide', 'le 'resveratrol-3-O-sulfate', le 'resveratrol-4-O-glucuronide', le 'resveratrol-3-O-4'-O-disulfate,' le 'resveratrol-4'-O-sulfate' et les 'resveratrol-diglucuronides-C/O-conjugués' (Figure 14,15). La flore intestinale métabolise également le RSV en donnant le dihydroresveratrol et ses métabolites glucuronidés et sulfatés (318,342). Certains métabolites conservent certaines activités biologiques de la molécule mère (343) et il reste toujours dans l'organisme des traces de RSV non modifié (337,338,344). D'ailleurs, la nature et la quantité de ces métabolites sont différentes d'un individu à un autre (332,341,345). En fait, des flavonoïdes alimentaires comme la quercétine co-administrés en même temps que le RSV peuvent inhiber sa sulfatation et la glucuronidation dans le foie et dans les tissus duodénaux. Ceci permet d'augmenter la biodisponibilité du RSV (346-348). L'urine et les fèces constituent les voies d'excrétion du RSV, dernière étape de sa pharmacocinétique. Suite à l'ingestion d'une dose unique, le RSV et ses métabolites sont complètement éliminés des tissus et de l'organisme après 72 h (349). Globalement, le RSV constitue donc une molécule facilement absorbée, fortement métabolisée et bien tolérée même à des doses élevées (350).

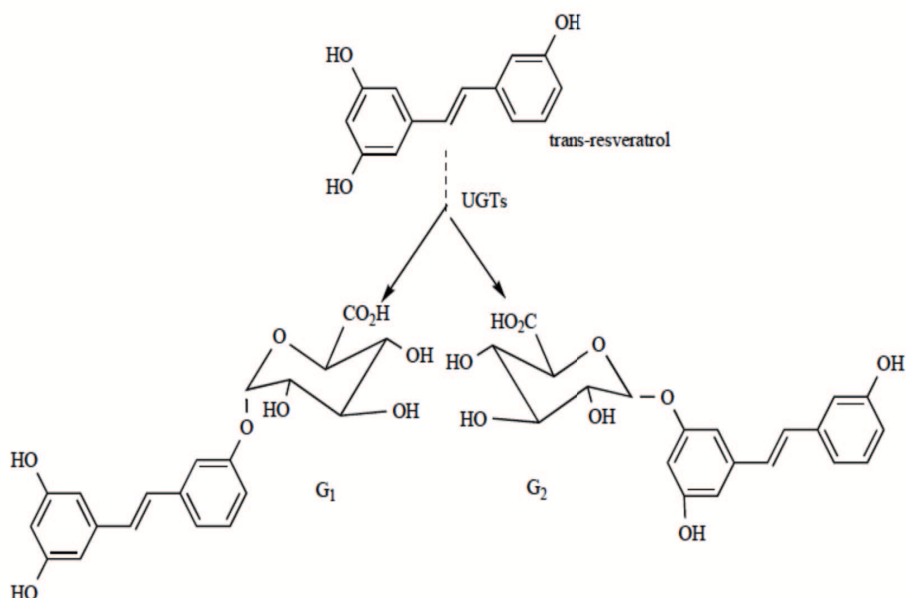


Figure 14: La voie métabolique du Resvératrol dans l'intestine par les enzymes UGTs.

G1 - trans-resveratrol-4'-O-glucuronide and G2 - trans-resveratrol-3-O-glucuronide (318).

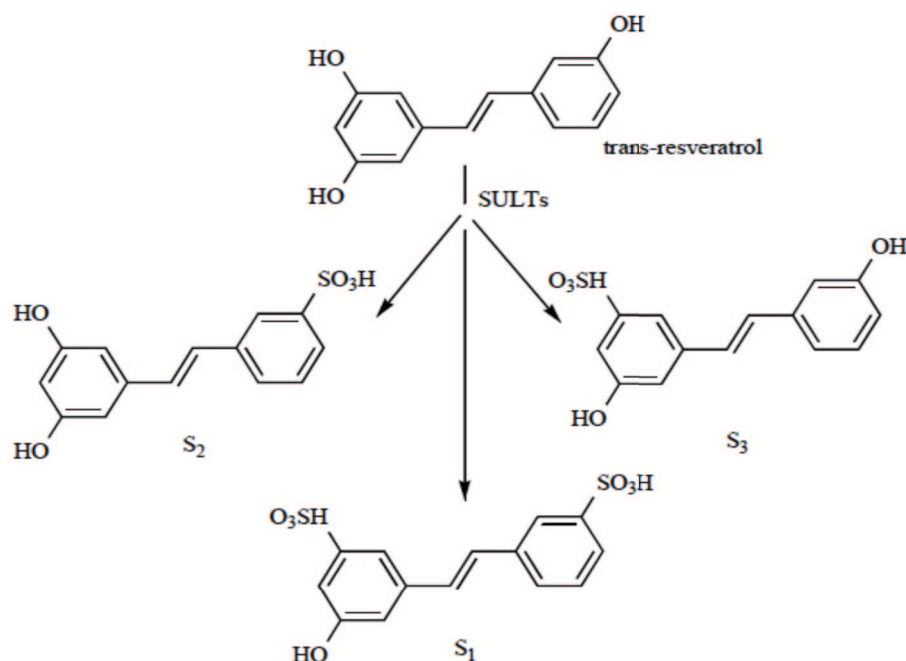


Figure 15: La voie métabolique du Resvératrol dans le foie par les enzymes SULTs.

S1 - trans-resveratrol-3-O-4'-O-disulfate, *S2* - trans-resveratrol-4'-O-sulfate, and *S3* -trans-resveratrol-3-O-sulfate (318).

1.3. Pharmacologie du RSV

Le RSV module directement ou indirectement plusieurs voies de signalisation cellulaire. Selon l'analyse PAGE (Parametric analysis of gene set enrichment), le RSV induit une modification significative de 127 voies métaboliques et de signalisation, y compris le cycle de Krebs, la glycolyse, la restriction calorique, la voie de signalisation de l'insuline, la phosphorylation oxydative et le transport des électrons, la voie de signalisation de STAT3, la voie p53, la voie des ROS, l'arrêt du cycle cellulaire, la mort cellulaire, la voie Sirtuine (SIRT), la voie NF-κB (351) (Figure 16). Ces données nous montrent l'effet pléiotropique du RSV et explique les raisons de l'intérêt porté à l'utilisation potentiel du RSV dans le traitement de différentes maladies liées au système cardiovasculaire, l'inflammation, les processus de vieillissement, les diabètes, le dysfonctionnement neurologique, la carcinogénèse, etc. (352).

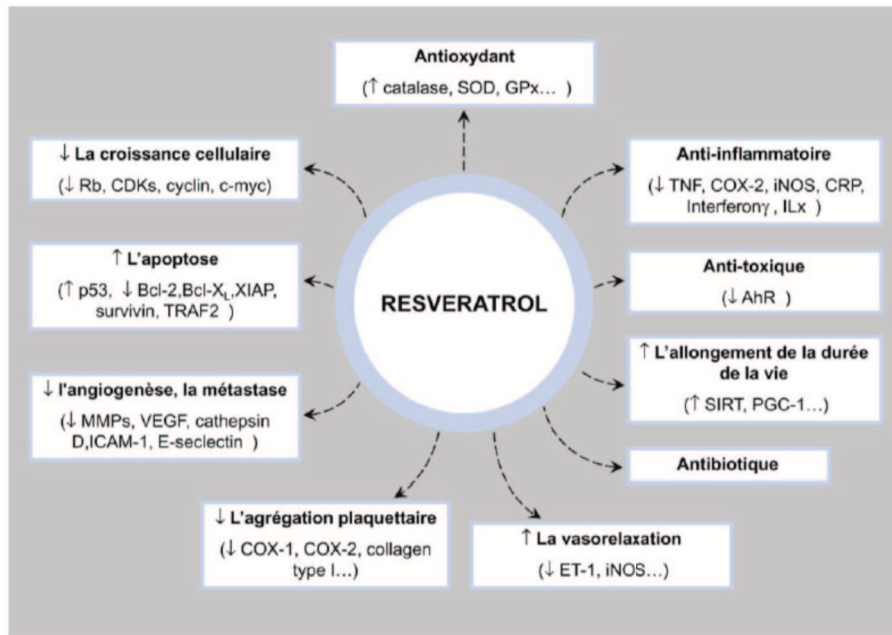


Figure 16: Les effets biologiques du Resvératrol.

TNF: Tumor necrosis factor; COX-1: cyclooxygenase1; COX-2: cyclooxygenase2; iNOS: inducible nitric oxide synthase; CRP: C reactive protein; ILx: interleukins; AhR: aryl hydrocarbon receptor; SIRT: sirtuin; PGC-1: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1; ET-1: endothelin 1; MMPs: matrix metalloproteases; VEGF: vascular endothelial growth factor; ICAM-1: intracellular adhesion molecule 1; Bcl-2: B cell lymphoma 2; Bcl-X_L: B cell lymphoma-extra large; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein; TRAF2: TNF receptor-associated factor 2; Rb: retinoblastome; CDKs: cyclin-dependent kinases; c-myc: myc proto-oncogen protein; SOD: superoxide; GPx: glutathione peroxidase (353).

1.3.1. Effet anti-inflammatoire du RSV

Les effets anti-inflammatoires de RSV ont été démontrés par de nombreuses études aussi bien *in vitro* que *in vivo*.

Différentes lignées cellulaires telles que les macrophages, les 3T3 pré adipocytes (354), les cellules endothéliales (355), les cellules musculaires lisses (356), les chondrocytes (357), les cellules microgliales (358), et le tissu adipeux (359) ont été utilisés pour montrer les propriétés anti-inflammatoires du RSV.

Dans les cellules endothéliales, le RSV diminue l'expression des marqueurs pro-inflammatoires comme ICAM-1 (Inter-cellular adhesion molecule 1), VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1) (325,355) et la E-selectine (360) Cette réduction peut inhiber l'adhésion des granulocytes et des monocytes sur les cellules endothéliales et permettre une diminution de l'inflammation. Le RSV inhibe également la libération de certaines cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 (361), IL-2, IL-12, IFN- γ , et TNF α (362) par les macrophages et les lymphocytes. En plus, l'expression de iNOS (inducible nitric oxide

synthase) et la libération de l'oxyde nitrique dans les macrophages stimulés sont aussi réduites par le RSV (363,364).

Le RSV inhibe aussi l'expression et l'activité de COX-1 (cyclooxygénase) (358) et COX-2 (365) qui sont des enzymes impliquées dans la production des médiateurs pro-inflammatoires. En plus, il atténue l'activité de mPGES-1 (microsomal prostaglandin E synthase-1), une enzyme essentielle, responsable de la synthèse de PGE2 (Prostaglandin E2) (358).

Le RSV intervient également dans la réduction du taux de Ca²⁺ intracellulaire. Comme le Ca²⁺ possède un rôle de second messager durant l'activation de l'inflammation cellulaire (318), une réduction de son taux intracellulaire provoque, par la suite, une diminution de marqueurs inflammatoires comme le TNF α , IL-8, et IL-6.

L'action anti-inflammatoire du RSV pourrait être reliée à sa capacité d'inhiber l'action de facteurs impliqués dans la transcription de gènes tels que MAP Kinase, c-JNK, IRF-3 (Interferon regulatory factor-3), AP-1, et NF- κ B (366,367). Etant donné que NF- κ B participe à une des voies majeures de l'inflammation, de nombreuses études lui ont été consacrées afin de comprendre le mécanisme d'action du RSV sur cette voie. Cependant, actuellement ce mécanisme n'est pas encore complètement établi: Le RSV empêcherait la translocation de NF- κ B dans le noyau via soit l'inhibition de IKK (368), soit l'activation de SIRT1 qui déacetylerait NF- κ B (369,370), soit l'inhibition de la phosphorylation de p65 (366).

Pour confirmer l'effet anti-inflammatoire du RSV, de nombreuses études *in vivo* ont été effectuées. Chez les rats présentant des colites chroniques induites par le TNBS (trinitrobenzenesulphonic acid), un traitement par le RSV fait baisser l'infiltration des neutrophiles et le taux de TNF α . Chez ces animaux, malgré une absence de modification de la PGD2 (prostaglandin D2), le taux de PGE2 et de COX-2 ainsi que l'expression protéique de NF- κ B p65 sont tous diminués par le RSV (371). De plus, chez la souris, dans un autre modèle d'inflammation aigüe de l'iléon induit par *Toxoplasma gondii*, on constate, lors d'une culture *ex vivo* de l'iléon, que le RSV réduit l'expression de IL-6 ainsi que la sécrétion de l'IFN- γ et de la MCP-1. Dans cette expérience, l'accumulation de lymphocytes T dans l'iléon est également inhibée par le RSV (372). Un effet similaire du RSV a été constaté dans un autre modèle en utilisant le LPS pour induire l'inflammation:

lorsque des souris sont traitées par le RSV, la capacité d'adhésion leucocytaire se trouve réduite de 60% ainsi que les taux de TNF α , de IL-6, de MCP-1 et d'ICAM-1 (373).

Les effets anti-inflammatoires ainsi que les effets anti-oxydants sont résumés dans la figure 17.

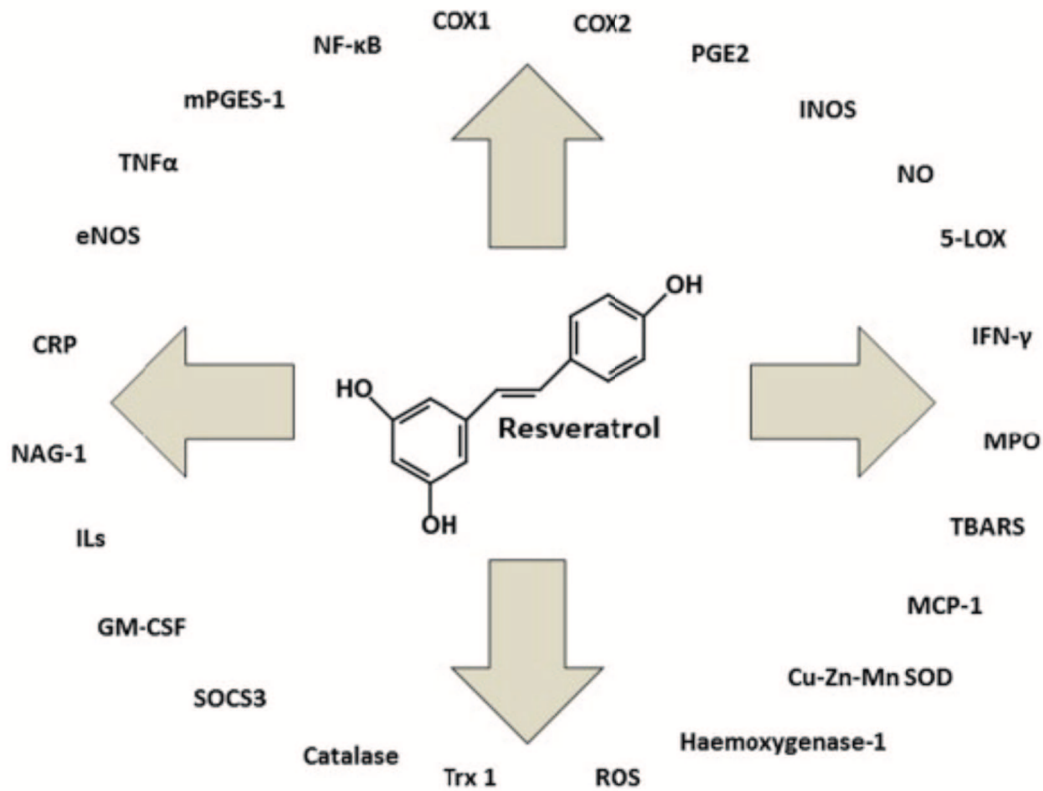


Figure 17: Les cibles biologiques moléculaires supposées du Resvératrol dans les processus anti-inflammatoires et anti-oxydants.

TNF α : Tumeur necrosis factor alpha; mPGES-1: microsomal prostaglandin E synthase 1; NF- κ B: necros factor-kappa B; COX-1: cyclooxygenase1; COX-2: cyclooxygenase2; PGE2: Prostaglandin E2; iNOS: inducible nitric oxide synthase; NO: nitric oxide; 5-LOX: 5-lypoxigenase; IFN γ : interferon gamma; MPO: myeloperoxidase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; MCP-1: Monocyte chemo attractant protein 1; ROS: reactive oxygen species; Trx1: thioredoxin 1; SOCS3: suppressor of cytokine signaling 3; GM-CSF: granulocyt macrophage colony stimulating factor; ILs: interleukins; NAG-1: nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene 1; CRP: C reactif protein; eNOS: endothelial nitric oxide synthase (374).

1.3.2. Effets du RSV sur AhR

Les propriétés d'antagoniste du RSV vis à vis de AhR fut montré par deux équipes. Tout d'abord, en 1998, Ciolino et ses collègues (375) ont établi que le RSV inhibe de manière dose-dépendante l'augmentation de l'expression du Cyp1a1 induite

par le TCDD, un ligand de AhR. Cette inhibition intervient en prévenant la fixation de AhR sur les séquences promoteurs de Cyp1a1. Ensuite, un an plus tard, en 1999, l'équipe de Casper (376) a établi que le RSV joue un rôle d'antagoniste au niveau de AhR, ceci en montrant que le RSV peut se fixer sur AhR et promouvoir la translocation de AhR dans le noyau qui peut alors se fixer sur l'ADN, comme cela se produit avec les Dioxines. Cependant, dans le cas du RSV, la transactivation ultérieure n'intervient pas. C'est via ce mécanisme que le RSV inhibe l'expression de certains gènes tels que le Cyp1a1 et IL-1 β . Suite à cette découverte, de nombreuses études examinèrent la capacité protectrice du RSV dans la lutte contre la toxicité induite par des agonistes de AhR comme les dioxines ou le BaP. De fait, le RSV empêche, par exemple, l'inhibition de l'ostéogenèse induite par le TCDD (377). Il peut aussi protéger les spermatozoïdes et les poumons contre des dommages induits sur l'ADN par le BaP (378,379) qui sont capables de provoquer l'apoptose des cellules.

Cependant en fait, le RSV peut, à haute concentration, agir également comme un agoniste de AhR, ceci malgré sa faible affinité, il peut activer la voie de signalisation de AhR et augmenter l'expression et l'activité du Cyp1a1 (380,381).

1.3.3. Effet antibiotique du RSV

En plus de son effet antifongique, le RSV possède également un effet antimicrobien. Les propriétés antibiotiques du RSV ont été démontrées sur diverses espèces bactériennes incluant des gram (-) et des gram (+). *Arcobacter butzleri* et *Arcobacter cryaerophilus* sont des bactéries couramment présentes dans l'eau contaminée et la nourriture carnée et la persistance de ces microorganismes peut provoquer des maladies gastro-intestinales ou extra-gastrointestinales. Due à leur existence dans l'environnement, ces bactéries sont résistantes à plusieurs antibiotiques utilisés à l'heure actuelle (382). Le RSV se révèle comme étant un bon inhibiteur de croissance de *A. butzleri* avec une CMI (concentration minimale inhibitrice) de 100 $\mu\text{g/ml}$ et *A. cryaerophilus* avec une CMI de 50 $\mu\text{g/ml}$ (383). En outre, le RSV possède aussi une activité bactéricide contre *Haemophilus ducreyi*, un agent responsable de la maladie sexuelle transmissible dénommée 'Chancres mous', avec une CMB (concentration minimale bactéricide) de $\leq 500 \mu\text{g/ml}$ (384). Un effet antibactérien du RSV se retrouve également avec une CMI comprise entre 500 $\mu\text{g/ml}$ et 1000 $\mu\text{g/ml}$ chez 29 souches de MRSA (Méthicillin-resistant Staphylococcus) isolés à partir de patients (385).

1.3.4. Le RSV et le DT2

Les effets biologiques présentés ci-dessus peuvent être reliés aux potentialités que possède le RSV dans le traitement du DT2: de fait, de nombreuses études épidémiologiques et expérimentales montrent que le RSV se révèle être une molécule possédant un grand intérêt thérapeutique contre le diabète et l'obésité (351,386–388).

Ces dernières décennies, plusieurs mécanismes d'action ont été suggérés afin d'expliquer l'effet antidiabétique du RSV.

Tout d'abord, le RSV serait un activateur de SIRT1. Ce facteur joue un rôle important dans divers processus: comme la régulation de l'homéostasie des lipides et du glucose, le contrôle de la sécrétion (389,390) et de la sensibilité à l'insuline (391,392). Il possède un effet anti-inflammatoire et contrôle le stress oxydatif et permet l'amélioration de la fonction endothéliale via l'augmentation du nombre et de la fonction des mitochondries (393–396) et des capacités de β -oxydation (397). Cependant, une étude récente de Pacholec (398) a montré des résultats contradictoires en disant que le RSV n'est pas un activateur direct de SIRT1.

D'autre part, notre équipe a montré que le RSV stimule la sécrétion de GLP-1 qui augmente ensuite la sécrétion et la sensibilité de l'insuline et dans cette étude, le RSV possède également un impact sur la flore intestinale en normalisant la flore du contenu caecal modifié par un régime riche en graisse (399). De manière similaire, il est établi dans des modèles animaux, que le RSV peut améliorer la dysbiose présente au niveau du microbiote intestinal, en augmentant le ratio entre les souches de type Bacteroidetes et celles de type Firmicutes, en favorisant la croissance de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* et en inhibant la croissance de *Enterococcus faecalis* (400) et des entérobactéries (401).

Nous allons maintenant décrire l'état de connaissance sur un autre polyphénol: la curcumine.

2. La Curcumine (Cur)

2.1. Généralités

La curcumine (diferuloylmethane) constitue le principal composé du curcuma alimentaire qui est extrait à partir des rhizomes de *Curcuma longa*, une plante qui appartient à la famille des Zingiberaceae. Le curcuma est utilisé depuis des siècles principalement dans les pays asiatiques pour traiter différentes maladies. En 1815,

Vogel et Pelletier ont isolé un composé responsable de la couleur jaune vif du curcuma et ils le nommèrent 'Curcumine'. Suite à son isolement, Milobedzka et Lampe ont établi la structure chimique de la Cur en 1910 (402).

La dénomination chimique de la Cur est '1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione' avec la structure chimique brute $C_{21}H_{20}O_6$ (403). Dans la nature, la Cur possède deux isomères différents: la forme énolique et la forme β -dicétonique (Figure 18). La forme énolique est la plus stable et, elle est prédominante en solution. L'étude spectrophotométrique montre que la forme énolique absorbe la lumière à une longueur d'onde de 419 nm tandis que le pic d'absorption de la dicétone se situe à 389 nm (404). La Cur est un polyphénol lipophile qui est quasiment insoluble dans l'eau mais très soluble dans les solvants organiques comme le méthanol, l'éthanol, le diméthyl sulfoxyde (DMSO) et l'acétone (405). Elle reste stable à pH acide mais est instable à pH neutre et basique qui sont les conditions dans lesquelles elle est dégradée en acide férulique et feruloylméthane (406,407).

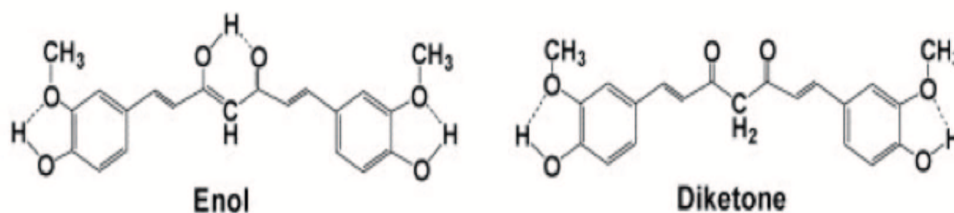


Figure 18: Les deux isomères de Curcumine.

2.2. Pharmacocinétique de la Cur

L'utilisation thérapeutique de la Cur est limitée à cause de sa faible biodisponibilité. L'absorption de la Cur est faible, sa métabolisation est élevée, et son élimination rapide (408). La première étude sur le profil pharmacocinétique de la Cur fut réalisée sur des rats en 1978. Après une administration par voie orale de 1g/kg de Cur, des traces de Cur ont été détectées dans le plasma (409). L'équipe de Pan (410) a trouvé une faible concentration plasmatique de Cur (0,13 $\mu\text{g/ml}$) après 15min d'une administration par voie orale de 1,0 g/kg. La C_{max} plasmatique (0,22 $\mu\text{g/ml}$) est atteinte en 1 heure et cette concentration repasse en 6 heures en dessous de la limite détectable. Après une administration par voie intra-péritonéale de 0,1 g/kg, le niveau plasmatique

de la Cur atteint 2,25 µg/ml en 15 minutes après l'administration puis diminue rapidement en 1 heure. Des radio-marqueurs ont été utilisés afin de suivre la distribution de la Cur dans l'organisme. Avec des doses décroissantes de 400, 80, et 10 mg, la Cur est retrouvée dans le sang, le foie et le rein. A la dose la plus faible (80 et 10 mg), la plupart de la Cur est éliminée en 72 heures alors qu'avec une dose de 400 mg, la Cur marquée est encore retrouvée dans les tissus 12 jours après l'administration. Il est intéressant de noter que le pourcentage de Cur absorbé (60-66% de la dose donnée) reste constant quelle que soit la dose administrée. Cela indique que l'augmentation de la dose de Cur n'aboutit pas à une absorption supplémentaire (411). La Cur est également retrouvée dans l'intestin, la rate, et le cerveau (410,412). Chez les rongeurs ainsi que chez l'homme, une fois absorbée, la Cur devient O-conjuguée pour former la curcumine glucuronide et la curcumine sulfate, puis elle subit une bio-réduction en tétrahydrocurcumine, hexahydrocurcumine, octahydrocurcumine, et hexahydrocurcuminol (272-274) (Figure 19). Les curcumines réduites subissent ensuite une glucuronidation pour être converties en curcumine glucuronide, dihydrocurcumine-glucuronide et tétrahydrocurcumine-glucuronide puis une sulfatation intervient pour donner les curcumines sulfates (416-418). Le foie constitue l'organe majeur responsable du métabolisme de la Cur (409,417,419). Les métabolites principaux sont: la curcumine glucuronide, la dihydrocurcumine-glucuronide, la tétrahydrocurcumine-glucuronide, et la tétrahydrocurcumine (410). L'excrétion de la Cur et de ses métabolites intervient principalement via les fèces alors que l'élimination urinaire est négligeable ou indétectable (409,416).

La faible biodisponibilité de la Cur peut être améliorée en réalisant son administration de manière concomitante avec celle de la Piperine. Grâce à une inhibition de la glucuronidation intestinale et hépatique par la Pipérine, cette association induit, une augmentation très importante de la concentration plasmatique et de la biodisponibilité de la Cur, (420). En outre, il a été montré que certains de ses métabolites, comme la curcumine glucuronide et la tétrahydrocurcumine conservent une partie de l'effet de la molécule mère, ce qui pourrait compenser sa faible biodisponibilité (414,421-423).

En résumé, la Cur se révèle comme faiblement absorbée, rapidement métabolisée et éliminée, mais bien tolérée même à des doses élevées (420,424).

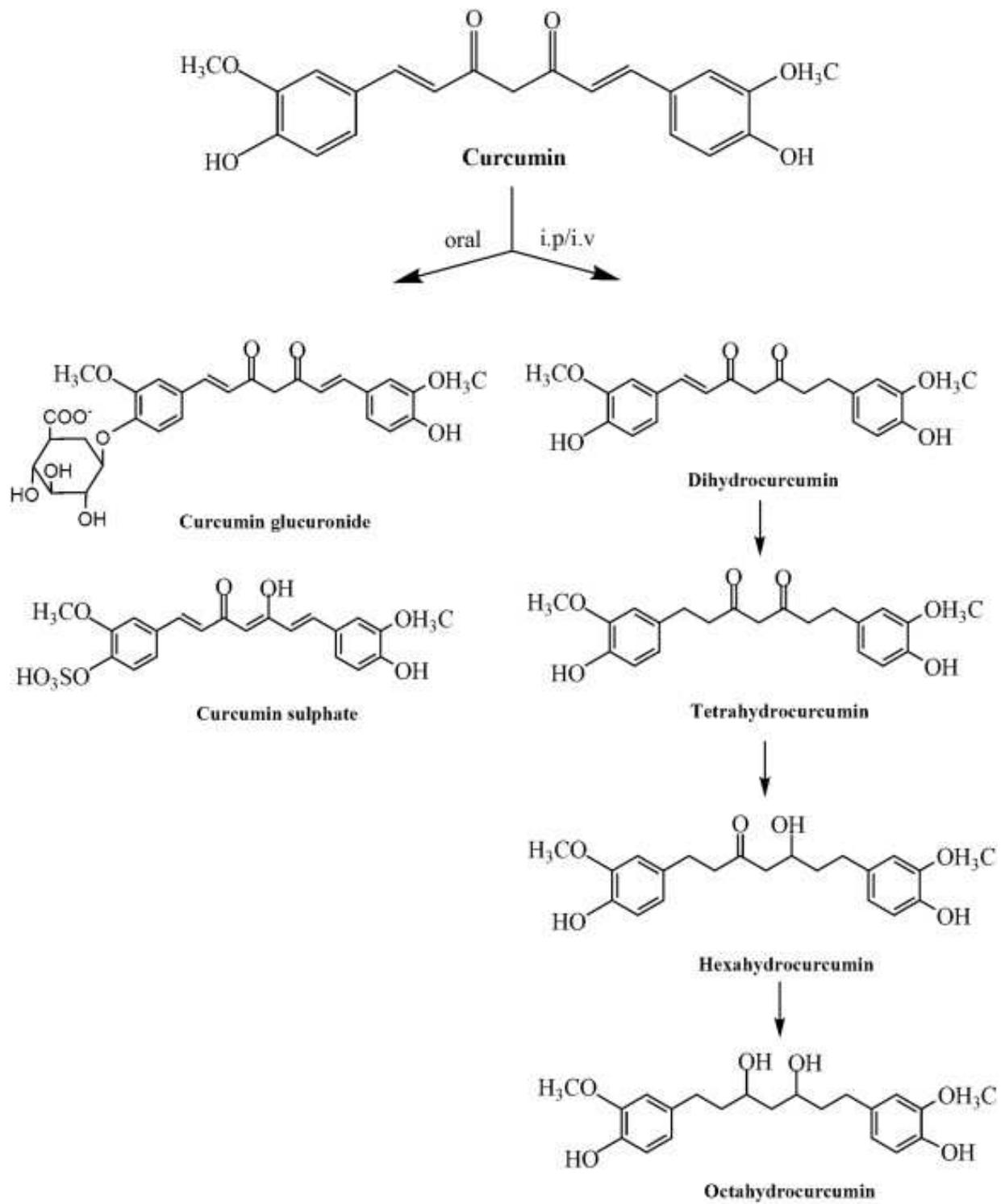


Figure 19: Les structures de la Curcumine et ses métabolites (408).

2.3. Pharmacologique de la Cur

La Cur possède de nombreuses propriétés pharmacologiques (Figure 20). Elle interagit avec diverses cibles moléculaires, telles que des facteurs de transcription, des facteurs de croissance, différents récepteurs, certains enzymes, des cytokines, et des gènes régulant la prolifération cellulaire et l'apoptose. Ce polyphénol naturel module plusieurs facteurs de transcription, y compris NF- κ B (425), AP-1 (426), STAT (427), Nrf2 (Nuclear factor like-2) (428), PPAR- γ (429), FOXO (Forkhead box protein O) (430), et la β -caténine (431). En plus, elle inhibe l'activité de différentes protéines kinases comme MAP Kinases (432), PKA (433), et certaines PKCs (434). Elle régule également p53 et p21 (435) qui sont impliqués dans l'apoptose cellulaire. Dû à ses multiples effets, la Cur possède un intérêt potentiel vis-à-vis du traitement de diverses pathologies comme les maladies inflammatoires, les troubles métaboliques, les maladies neurodégénératives, ainsi que différents cancers... (402,405).

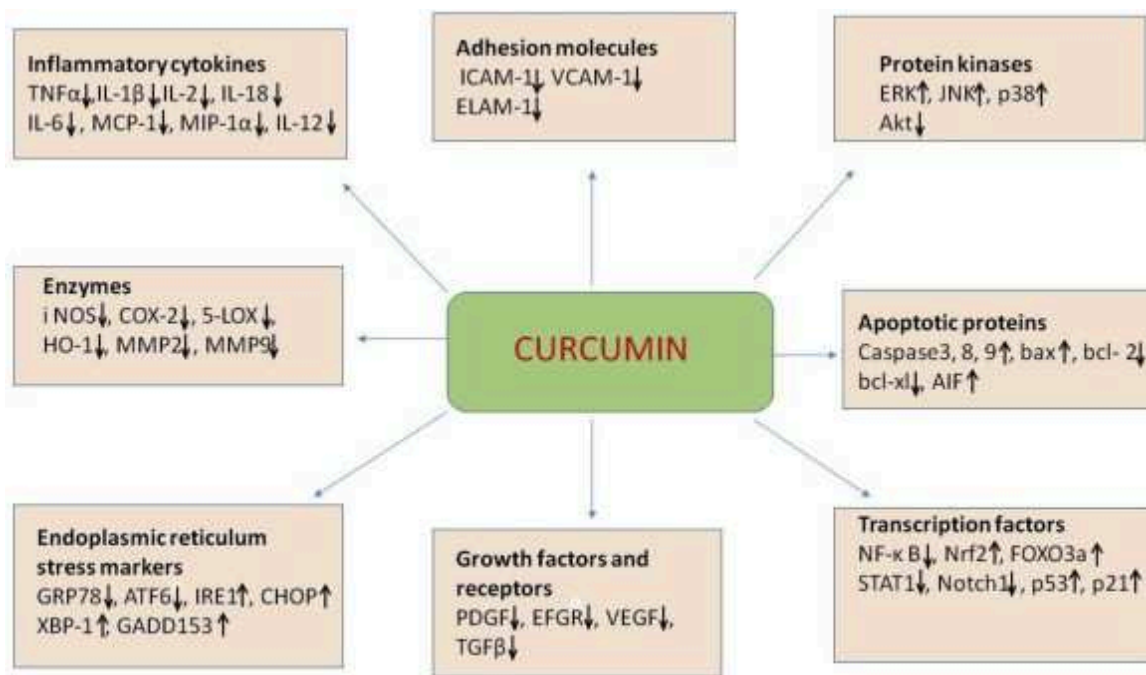


Figure 20: Modulation par la Curcumine de l'expression de différentes molécules de signalisation cellulaire.

TNF α : Tumeur necrosis factor alpha; IL-1 β : interleukin-1 β ; IL-2: interleukin 2; IL-18: interleukin 18; IL-6: interleukin 6; MCP-1: Monocyte chemo attractant protein 1; MIP-1 α : macrophage inflammatory protein 1 alpha; IL-12: interleukin 12; ICAM-1: intracellular adhesion molecule 1; VCAM-1: vascular cellular adhesion molecules 1; ELAM-1: endothelial leukocyte adhesion molecule1; iNOS: inducible nitric oxide synthase; COX-2: cyclooxygenase2; HO-1: heme oxygenase1; MMP2: matrix metalloprotease 2; MMP9: matrix metalloprotease9; GRP78: glucose

regulated protein 78; ATF6: activating transcription factor 6; CHOP: C/EBP homologous protein; XBP-1: X-box binding protein 1; GADD153: growth arrest and DNA damage-inducible gene 153; PDGF: platelet derived growth factor; EGFR: epidermal growth factor receptor; VEGF: vascular endothelial growth factor; TGF β : transforming growth factor beta; JNK: c-Jun N-terminal kinases; bax: BCL2 associated X protein; bcl-2: B cell lymphoma 2; AIF: apoptosis inducing factor; Nrf2: nuclear factor erythroid 2; STAT1: signal transducer and activator of transcription (402).

2.3.1. Effet anti-inflammatoire de Cur

Les propriétés anti-inflammatoires de la Cur ont été démontrées par de nombreux travaux *in vitro* ainsi que *in vivo*.

Dans les cellules endothéliales humaines en culture, la Cur réduit l'expression de différentes protéines d'adhésion telles que de ICAM-1, VCAM-1 et ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1) (436). Cette réduction peut mener à l'inhibition du recrutement des cellules leucocytaires et par la suite à la diminution de l'inflammation. La production de diverses cytokines et de marqueurs pro-inflammatoires comme IL-1 β , IL-8, TNF α , MIP1 α (monocyte inflammatory proteine-1), MCP-1 (437), IL-12 (438), IL-6 (439), et IL-2 par les macrophages et par d'autres cellules est également inhibée par la Cur (440). En outre, dans les macrophages stimulés, l'expression de iNOS et la libération de l'oxyde nitrique est aussi réduite par la Cur (438).

La Cur modifie la synthèse des eicosanoïdes par l'inhibition de la COX-2, une enzyme responsable de la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires (438,441). La Cur possède également la capacité de supprimer l'expression de métalloprotéinases (MMPs) comme MMP1/7 (442), MMP2 (443), et MMP9 (444).

Ces effets inhibiteurs de la Cur pourraient être liés à sa capacité à, inhiber les facteurs impliqués dans la régulation de la transcription de gènes tels que les MAP kinases, STAT, AP-1, NF- κ B et la β -caténine (445,446) (Figure 21). La Cur agirait sur la voie NF- κ B en empêchant la translocation de NF- κ B dans le noyau (447–449), ceci soit par l'inhibition de IKK, soit via l'inhibition de la phosphorylation et de la dégradation de I κ B α .

D'autres voies de signalisation, telles que la voie MAP kinase/ERK ainsi que celle de la PI3K/Akt qui sont impliquées dans l'activation de NF- κ B, sont également inhibées par la Cur (442,450,451).

Les études *in vivo* ont confirmé les effets anti-inflammatoires de la Cur. Ainsi, dans un modèle d'arthrite chronique chez le rat, elle réduit l'expression de divers marqueurs pro-inflammatoires comme le taux de CRP, celui de l'Haptoglobine, et de IL-1 β (452). La Cur réduit aussi d'autres marqueurs comme le taux de MPO (myeloperoxydase), de LPO (lipidperoxydation), et d'APL (alkaline phosphatase). La Cur protège le colon en supprimant la surexpression de iNOS et de NF- κ B induit par le DNCB (2,4 dinitrochlorobenzène), lequel est responsable de l'apparition d'une colite chez le rat (453). La Cur diminue également l'expression de différentes cytokines inflammatoires telles que IL-1 α et β , IL-2, IL-6, et IL-10 dans le foie de rats soumis à un choc hémorragique expérimental. Cette diminution serait due à l'inactivation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (454). Les divers sites d'action de la Cur sont résumés sur la figure 19.

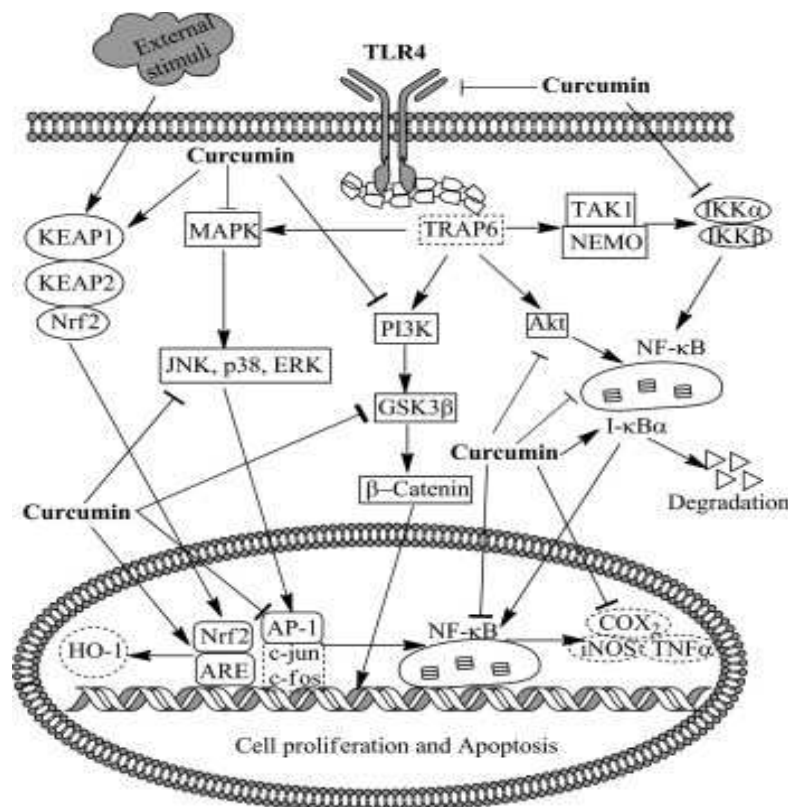


Figure 21: Mécanisme d'action de la Curcumine sur la voie de signalisation de NF- κ B.

La curcumine inhibe l'activation de NF- κ B induit par TLR4 via IKK α et IKK β . La curcumine réduit l'activation de NF- κ B induit par Akt et augmente également le taux de dégradation I- κ B. La curcumine inhibe l'induction de la p38 et d'ERK par la MAP Kinase. Normalement cette induction favorise la transcription d'AP-1, de c-for, et de c-jun. En outre, la curcumine inhibe l'expression du TNF α , de iNOS et de la COX-2. La curcumine induit Nrf2 et augmente la sécrétion de HO-1 qui sont

des facteurs proapoptotiques. La curcumine augmente le taux de mort cellulaire par apoptose et inhibe la prolifération cellulaire dérégulée en inhibant PI3K et GSK3 β et en modifiant l'activité de la β -caténine ainsi que de multiples molécules de signalisation (445).

NF- κ B: nuclear factor kappa B; TLR4: toll like receptor 4; IKK: I κ B kinase; ERK: extracellular signal-regulated kinase; MAP kinase: mitogen-activated protein kinase; AP-1: activator protein-1; TNFa: tumor necrosis factor α ; iNOS: inducible nitric oxide synthase; COX-2: cyclooxygenase 2; Nrf2: nuclear factor like-2 ; PI3K: phosphatidyl inositol 3 kinase; GSK3b: glycogen synthase kinase 3 beta.

2.3.2. Effet de la Cur sur AhR

La Cur peut se comporter comme un antagoniste de AhR en inhibant l'activité de ce récepteur induite par le TCDD mais aussi comme un agoniste de AhR, malgré sa faible affinité pour ce récepteur. En utilisant des cellules de carcinome épithélial, Ciolino et ses collègues ont montré que la Cur était capable d'agir comme antagoniste vis-à-vis de la fixation du TCDD sur AhR. Cette étude a également montré l'effet d'inhibition de la Cur sur l'activation de AhR induit par le DMBA (dimethylbenzanthracene). Il s'en suit une diminution de l'expression du Cyp1a1 (455). La Cur peut inhiber l'effet du BaP sur l'expression et l'activation du Cyp1a1 via AhR aussi bien *in vitro* (456) qu'*in vivo* (457). L'équipe de Nishiumi explique de façon différente l'effet d'inhibition de la Cur sur l'activation de AhR: en fait, la Cur n'inhiberait pas la translocation de AhR induit par le TCDD dans le noyau mais l'accélélerait et dans le noyau, ce polyphénol inhiberait de manière dose dépendante, l'hétérodimérisation de AhR avec Arnt (AhR nuclear translocator) ainsi que la phosphorylation de ces facteurs induit par le TCDD (458).

Comme indiqué précédemment, la Cur peut agir comme un activateur de AhR et donc induire l'expression et l'activation de Cyp1a1. C'est ce que rapporte une équipe japonaise travaillant sur l'effet de différents composés végétaux sur AhR. Ils constatent que la Cur est aussi un activateur de AhR malgré sa faible affinité pour ce récepteur comparée à celle des isoflavones, du RSV ou d'autres composés polyphénoliques (381).

Globalement, la Cur peut, selon les circonstances, jouer deux rôles opposés: quand elle n'est pas en compétition avec d'autres composés, la Cur joue un rôle d'agoniste de AhR et augmente l'expression et l'activité de Cyp1a1. En revanche, en présence d'un agoniste puissant de AhR, la Cur se révèle comme un antagoniste vis-à-vis de cet autre composé.

2.3.3. Effet antibiotique de la Cur

En plus de son activité anti-inflammatoire, la Cur possède également des propriétés antibactériennes. C'est en effet une bactéricide efficace vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, d'*Enterococcus faecalis*, d'*Escherichia coli*, ainsi que vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*. A la concentration de 25 µM et avec une exposition de 30 min, la Cur tue entre 12% et 60% de ces bactéries. Avec une incubation de 2 heures, cette même dose, permet d'éliminer de 20 à 90% de chacun de ces quatre genres bactériens. A une concentration de 100 µM, le pouvoir bactéricide de la Cur se révèle être de respectivement 100, 99, 100 et 57% vis-à-vis de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, et *P. aeruginosa*. L'activité bactéricide de la Cur s'expliquerait par les dommages causés aux membranes bactériennes (459). C'est en effet un 'anti-MRSA' qui provoque aussi des dommages de la paroi bactérienne, des perturbations du contenu cytoplasmique, et finalement la lyse cellulaire (460). *Helicobacter pylori* qui est responsable de pathologies gastroduodénales incluant le cancer gastrique et qui se révèle difficile à combattre par les antibiotiques conventionnels est éradiqué par la Cur. Ce polyphénol inhibe *in vitro*, avec une CMI comprise entre 5 µg/ml et 50 µg/ml, la croissance de ces bactéries isolées à partir de patients. La Cur est aussi capable d'éradiquer *H. pylori* chez des souris infectées et permet ainsi de restaurer les dommages gastriques provoqués par ces bactéries (461).

2.3.4. La Cur et le DT2

Compte tenu de tous ses effets pharmacologiques, on en conclut que la Cur constitue potentiellement un bon candidat pour le traitement du DT2.

Srivinasan (462), le premier, a noté chez un patient, un effet anti-hyperglycémique de la Cur. La capacité de la Cur à contrôler le taux de glucose sanguin a été plusieurs fois évoquée et discutée. Diverses études menées chez les rongeurs, montrent une capacité de la Cur à réduire, la masse corporelle, le taux de glucose circulant, celui de l'hémoglobine, et de l'hémoglobine glycosylée (463). Ce polyphénol peut également améliorer la tolérance au glucose (464) ainsi que le niveau de la sensibilité à l'insuline (465).

Ces effets favorables de la Cur peuvent résulter d'une modulation des voies transcriptionnelles comme NF- κ B (466), PPAR- γ (467), AMPK (468), et Nrf2 (469). Il a été suggéré récemment que la Cur pourrait aussi agir comme un inducteur de la sécrétion de GLP-1 qui pourrait ensuite augmenter la sécrétion et la sensibilité à l'insuline (470).

Objectifs du travail

Le diabète de type 2 est une maladie multifactorielle caractérisée par l'intolérance au glucose et l'insulino-résistance. Différents facteurs tels que des facteurs génétiques et environnementaux sont soupçonnés comme participant à son étiologie. L'augmentation, ces dernières années, de l'incidence de cette maladie est très bien corrélée aux changements des modes de vie et surtout des habitudes alimentaires. L'alimentation riche en graisses et pauvre en fibres caractéristique de l'Occident pourrait modifier l'écologie de la population microbienne dans le tractus gastro-intestinal. L'altération de la flore intestinale semble être liée à l'homéostasie du glucose et à la résistance à l'insuline. De façon directe, la modification du microbiote intestinal peut donc aboutir à l'altération de la source énergétique intestinale principale (acides gras à chaîne courte) et à une altération de la gluconéogenèse hépatique. De plus, le déséquilibre de la flore intestinale modifie la sécrétion du GLP-1 qui constitue une hormone importante dans l'induction de la sécrétion de l'insuline par les cellules pancréatiques. La modification du microbiote qui, en augmentant la perméabilité de l'intestin, permet ainsi l'entrée des bactéries dans divers tissus. La production de LPS dans le tissu intestinal peut également contribuer à induire l'inflammation et l'insulino-résistance tissulaire.

Etant donné que les polyphénols naturels comme le RSV et la Cur possèdent diverses propriétés pharmacologiques telles que des propriétés anti-inflammatoires, antibiotiques et antidiabétiques, notre hypothèse de départ était que la combinaison de ces deux polyphénols pourrait fournir des effets bénéfiques et synergiques sur le traitement du diabète de type 2.

Les objectifs de notre travail ont été d'étudier l'effet de l'association du RSV et de la Cur sur l'amélioration de la tolérance au glucose. Différents axes d'investigation ont été suivis:

- Bien que de nombreuses études montrent un effet antidiabétique du RSV et de la Cur, l'effet de la combinaison de ces deux molécules n'a pas encore été étudié. Au début de ce travail, nous avons examiné les effets de chacun des polyphénols ou de leur association sur divers paramètres physiologiques dont la tolérance au glucose, l'insulinémie et la lipidémie.

- Ne connaissant pas l'action globale de ces polyphénols sur la flore intestinale, nous avons étudié le métagénome de la flore intestinale.
- Nous avons étudié l'impact d'une modification du microbiote sur le métabolome.
- L'effet de l'association du RSV et de la Cur sur l'inflammation des principaux tissus impliqués dans l'insulino-résistance a aussi été étudié. Cette étude a été entreprise sur les animaux mais aussi *in vitro* en utilisant des cellules humaines intestinales et monocytaires.
- Pour aborder l'étude du mécanisme moléculaire susceptible d'être impliqué dans l'action de ces polyphénols associés ou pas, nous avons étudié:
 - L'effet antibiotique de ces polyphénols sur certaines espèces bactériennes intestinales identifiées après les études metagénomiques.
 - Le rôle du AhR dans la réponse aux polyphénols. En effet, le RSV et la Cur sont des agonistes compétitifs de ce récepteur qui semble régler l'expression du GLP-1.

Comme des études récentes suggèrent que les Cyps pourraient être impliqués dans le métabolisme des AGs, nous avons également étudié la variation d'expression des Cyps en relation avec le traitement par les polyphénols et l'état de la flore intestinale. Ces résultats sont présentés dans le chapitre 'Résultats supplémentaires'.

Résultats

I. L'article

- Résumé

Le resveratrol (RSV) et la curcumine (Cur) sont des polyphénols naturels et ont été considérés comme des composés potentiels pour le traitement de l'inflammation et des troubles métaboliques tels que le diabète de type 2 (DT2). Le but de ce travail est d'étudier l'effet de la combinaison de RSV et de Cur sur l'amélioration de DT2. Les souris ont été réparties en cinq groupes et ont été nourries avec un régime contrôle (NC) ou un régime alimentaire riche en matières grasses (HFD) ou un HFD avec RSV ou un HFD avec Cur ou encore un HFD avec RSV+Cur pendant cinq semaines. Après cinq semaines de traitement, le RSV améliore significativement la tolérance au glucose tandis que la Cur n'a pas d'effet. De façon surprenante, la Cur inhibe l'effet du RSV lors de l'association. Le RSV ou la Cur améliore également la dysbiose de la flore intestinale induite par HFD alors que l'association des deux polyphénols annule l'activité de chaque composé. De plus, des résultats d'antibiogramme montrent que la Cur inhibe l'effet inhibiteur du RSV sur la croissance de certaines espèces bactériennes telle que *Alistipes putredinis*. Des résultats similaires ont été observés sur la métabolomique à partir de plasma de souris. Le RSV réduit l'expression de certains marqueurs inflammatoires dans le côlon tels que IL6, IL1 β et F4/80 alors que la Cur ne diminue que l'expression de IL1 β et F4/80. Afin de clarifier l'effet modeste de ces polyphénols sur l'inflammation dans le côlon, les cellules épithéliales (Caco2) et des monocytes (THP1) ont été utilisées et traitées par le RSV +/Cur. Il est intéressant de noter qu'au niveau cellulaire, l'effet anti-inflammatoire du RSV ou de la Cur est évident et la combinaison donne plutôt des effets synergiques. Dans l'ensemble, les résultats suggèrent que la Cur inhibe l'effet du RSV dans l'amélioration du DT2 et cette inhibition pourrait se produire via la modulation de la flore intestinale et du métabolome.

**Resveratrol improves glycemia and modulates microbiota dysbiosis,
metabolome and inflammation**

Navin Sreng^{1,2,3,4,5}, Serge Champion⁶, Jean-Charles Martin^{3,4,5}, Saber Khelaifia⁷, Jeffrey E Christensen^{1,2,8}, Roshan Padmanabhan^{1,2}, Vincent Azalbert^{1,2}, Pascale Loubieres^{1,2}, Laurent Pechere⁹, Rémy Burcelin^{1,2,§}, and Eric Séréé^{3,4,5,§}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Toulouse, France.

²Université Paul Sabatier (UPS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Team 2: 'Intestinal Risk Factors, Diabetes, Dyslipidemia' F-31432 Toulouse Cedex 4, France.

³INRA, UMR 1260, F-13385, Marseille, France

⁴INSERM, UMR 1062, « Nutrition, Obésité et Risque Thrombotique », F-13385, Marseille, France

⁵Aix-Marseille University, School of Medicine, F-13385, Marseille, France

⁶IMBE-UMR CNRS 7263/IRD 237, Mutagenèse Environnementale, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France

⁷Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UM 63, CNRS 7278, L'Institut de Recherche pour le Développement 198, Inserm 1095, Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection, Faculté de Médecine, Aix-Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France

⁸VAIOMER SAS, 516 Rue Pierre et Marie Curie, 31670 Labège, France

⁹Laboratoire YVERY sarl, 134 rue Edmond Rostand, 13008 Marseille, France

Running title: Resveratrol controls gut microbiota in diabetic mice

§ Corresponding authors: remy.burcelin@inserm.fr and seree.eric@gmail.com

Telephone: +33 05 61 32 56 14

Key words: Microbiota and metabolic diseases; polyphenols, inflammation, intestine

Abstract

Resveratrol (RSV) and Curcumin (Cur) are natural polyphenols and have been considered as potential compounds for the treatment of inflammation and metabolic disorders diseases including type 2 diabetes (T2D). The aim of this study was to investigate whether the combination of RSV with Cur will provide a potential or antagonist effect on T2D installation. Mice were divided in five groups and were fed with either a control diet (NC), a high fat diet (HFD), a HFD with RSV, a HFD with Cur, or a HFD with RSV+Cur for five weeks. Notably, after five weeks of treatment, RSV improved significantly glucose tolerance whereas Cur did not. Moreover, Cur inhibited the RSV effect while the combination was used. RSV or Cur improved also HFD-induced gut flora dysbiosis whereas RSV combined with Cur canceled the activity of each compound. In addition, on bacteria culture plate, Cur inhibited the inhibitory effect of RSV on the growth of some bacterial species such as *Alistipes putredinis*. Similar results were observed on the metabolomics from mice plasma. On colonic inflammation, RSV reduced the expression of some inflammatory markers such as IL6, IL1b, and F4/80 whereas Cur decreased expression only IL1b and F4/80. To clarify the modest effect of these polyphenols on colon, epithelium cells (Caco2) and monocyte (THP1) were utilized and treated with RSV+/Cur. Interestingly, at the cellular level, the anti-inflammatory effect RSV or Cur was clear and the combination provided most likely synergistic effect. These results suggested Cur inhibited RSV to ameliorate T2D and this inhibition may occur via gut flora and metabolomics modulation.

Introduction

Dietary polyphenols have been of great interest these last decades due to their important therapeutic activities. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene; RSV) and Curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione; Cur) are natural polyphenols which have numerous pharmacological properties. RSV is a phytoalexin found in various plants such as grape skin with anti-inflammatory activity (1). It suppresses NF- κ B transcriptional activity through inhibition DNA binding activity of the NF- κ B complex (2) that subsequently reduces expression of pro-inflammation targeted genes such as inducible nitric oxide synthase, IL6, ICAM-1 and VCAM-1. The anti-inflammatory activity of RSV was notably shown in coronary arterial endothelial cells (2), and on the secretion of MCP-1 from 3T3-L1 adipocytes when stimulated by TNF α (3). A similar process has been described in human articular chondrocytes where RSV down regulates the expression of VEGF, MMP3, MMP9 and COX-2 via the suppression of NF- κ B activity induced by IL1 β (4). Altogether, the anti-inflammatory activity of RSV is supportive of a role in the control of disease that the etiology involves an inflammatory process. The last decades have demonstrated that a low grade chronic inflammation characterizes metabolic diseases diabetes and obesity (5). The metabolic organs liver, adipose, and pancreatic islets are infiltrated by immune cells such as macrophages and lymphocytes in response to a long period of fat-enriched diet (6). These cells secrete cytokines which hamper insulin action and secretion leading to obesity and type 2 diabetes (T2D). A leading hypothesis regarding the origin of inflammation in metabolic disease is the gut microbiota (7). Type 2 diabetic patients (8) and high-fat diet-fed mice (9,10) are characterized by a gut microbiota dysbiosis which is causal to the disease as demonstrated in gut microbiota transfer to germ free mice (10,11). One of the corresponding mechanism is the translocation from the gut, across the intestinal epithelial barrier, to the tissues of bacterial fragments such as

lipopolysaccharides (12,13) and even full bacteria (14) which trigger the proliferation of macrophages and preadipocytes within the tissue leading to a chronic inflammation (7). This translocation process is due to an impaired intestinal immune defense (10) that sets a tissue microbiota (10,15). Therefore, a control of metabolic inflammation targeting the intestine inflammatory activity could be a therapeutic strategy of metabolic diseases. This mechanistic hypothesis is supported by numerous data from the literature. RSV is reported to decrease acute small intestinal inflammation in a mouse model of inflammatory bowel disease induced by *Toxoplasma gondii* infection (16). Numerous data suggest the impact of RSV on the control of gut microbiota in different animal models as dextran sulfate sodium-induced colitis (17) or in response to a fat-enriched diet (18–21), and even in humans (22). Consequently, to its impact on gut microbiota dysbiosis insulin secretion (23,24) and sensitivity (25,26) were improved and consequently hyperglycemia was corrected (27,28). Recently, the anti-atherosclerosis effect of resveratrol (29) was shown in ApoE^{-/-} mice to be mediated by attenuating the production of the pro-atherosclerotic factor trimethylamine-N-oxide (TMAO) by the liver which originates from the production by gut microbiota of trimethylamine (30). Furthermore, RSV increased frequency of bacteria with a bile salt hydrolase activity, thereby enhancing bile acid deconjugation and fecal excretion in ApoE^{-/-} mice. Although, on the control of atherosclerosis these mechanisms seem convincing, the mode of action of RSV on gut microbiota for the control of glycemia is unclear and remains to be explored. Other polyphenols such as Cur, an extract of *Curcuma longa*, have shown similar health benefits such as anti-infectious, anti-tumor, and anti-inflammation effects (31). Anti-inflammation of Cur has been demonstrated in various instances including on a human tenocyte (32), endometriotic stromal cells (33) and in animal model of streptozotocin-induced diabetic nephropathy (34). Eventually, Cur, as shown for resveratrol, impacts colitis (35,36) and type 2 diabetes (37–39).

Altogether, we thought to study the combined impact of RSV and Cur on high-fat diet-induced gut microbiota dysbiosis for the control of glycemia.

Materials and methods

Polyphenol formulation

The RSV (Omnipharm, Chambéry, France) and Cur (Omnipharm, Chambéry, France) were mixed at the dose of 60mg/Kg/day and 30mg/Kg/day, respectively, with a specific formulation (Yvery, Marseille, France). This formulation contains 100mg of RSV and 50mg of Cur with 125 mg of polysorbate 20 (Sigma, France) and 2.25g of polyglyceryl-3Diolate (Sigma, France) as described (40). This formulation enables the polyphenols to be absorbed with a 10 time increased efficacy and to last up to 5 hours into the blood (40). The RSV, Cur or RSV and Cur within their formulation were daily mixed with the High-fat Diet (HFD) diet.

Reagents

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), and RPMI 1640 supplemented with HEPES and glutamine (300 mg/L) were purchased from Life Technologies (Cergy-Pontoise, France). Fetal calf serum (FCS) ("HyClone," lot n°CPB0054) was from Perbio (Thermo scientific, Brebières, France). The luciferase detection kit was from Promega France (Charbonnières, France). Pyridine (extra dry), methoxylamine hydrochloride, and N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) were obtained from Acros Organics (Loughborough, U.K.). Trizol reagent and Moloney murine leukemia virus reverse-transcriptase were purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Columbia and Mueller-Hinton-2 agar were from BioMérieux (Marcy l'Etoile, France). The remaining reagents were from Sigma (L'Isle d'Abeau, France).

Animals and treatments

Eight week-old male C57Bl/6J wild type mice (Charles River, L'Arbresle, France) were housed in a specific pathogen-free condition with a 12-/12-hour light (10 p.m.)/dark (10 a.m.) cycle and had free access to water and food. After one week of acclimatization, mice were divided to five groups. A group (n=7) was maintained on normal chow diet (NC, energy content: 12% fat, 28% protein, and 60% carbohydrate), a group (n=8) fed a high-fat diet (HFD, energy content: roughly 72% fat comprising corn oil and lard, 28% protein, and <1% carbohydrate, SAFE, Augy, France). Furthermore, groups of HFD-fed mice (n=8 per group) supplemented with RSV or Cur or the combination of RSV and Cur were set. The high-fat diet was used in purpose to induce diabetes and a gut microbiota dysbiosis within less than 4 weeks i.e. before the onset of obesity which allows the study of a direct effect of the polyphenols on the regulation of glycemia without the confounding impact of obesity, as described in numerous instances (10,14,41). All animal experimental procedures were approved by the local animal ethical committee of the Rangueil hospital under the authorization number '31-278'.

Oral glucose tolerance test

An oral glucose tolerance test (OGTT, 2g/kg of glucose) was performed in 6h-fasted mice after five weeks of treatment, as described (10). Blood glucose concentration were monitored from the tip of the tail vein with a glucose meter (Roche Diagnostic, Meylan, France) at -30, 0, 15, 30, 60, 90, and 120 min after oral glucose administration.

Metabolomics

Plasma sample processing

First, 10 μ L of plasma aliquoted from each sample were mixed to set the quality control (QC) samples. Plasma and QC samples (100 μ L each) were deproteinized using methanol

precipitation (42). After drying under a stream of nitrogen, the methanol protein free extract was derivatized with O-methoxylamine hydro-chloride in pyridine, vortexed, and incubated at 80°C for 15 min in a dry-block heater. A volume of 50µL of MSTFA was then added and the extracts incubated at 80 °C for a 15 min. At completion, 20 µL of retention index marker solution was added (0.3 mg mL⁻¹ docosane, nonadecane, decane, dodecane, and pentadecane in pyridine) prior to centrifugation at 15,800g for 15 min (43). The resulting supernatant (90µL) was immediately transferred to GC/MS vials for analysis, to prevent any sample decays.

GC/MS

Analyses were carried out on a Agilent gas-chromatography 6890-mass spectrometer 5973N fitted with a split/splitless injector, connected to HP5 column, 30 m length, 0.25 mm ID and 0.25µm film thickness. The injector was set at 260°C in splitless mode. The analysts were eluted with a temperature gradient, starting at 50°C, then rising at 10°C/min to 70°C, held 2 min, then ramping at 5°C/min to 110°C, then 30°C/min to 290°C, and finally 20°C/min to 325°C. The mass spectrometer interface was heated at 300°C, the electron impact ionization was performed at 70eV at 230°C. Acquisition was performed at 2.8 scan/min.

Data post-processing

MS files were converted to cdf files and cdf files to qgd files to be processed by the Shimadzu GCMS postrun analysis®. On a reference sample run, a characteristic ion in each chromatogram peak was extracted and integrated. The reference frame was then applied to all runs, and the resulting dataset exported to excel reporting the sample names in row and the MS m/z features in columns. Intensity values were normalized to tryptophan-d4 or cholesterol-d4 added as internal standard (44). To check for data

quality, a principal component analysis was performed on normalized data. A monotonic QC samples drift on the PCA map indicated source contamination. This was best alleviated by applying a non linear LOESS correction (44,45), using the web interface workflow4metabolomics (46).

Then MS features displaying more than 30% of relative standard deviation in the QC samples were discarded, to retain 60 different features. Metabolite annotation was performed using the NIST and Gölm databases, matching fragment patterns and ECLs.

DNA extraction and 16S rDNA targeted metagenomic sequencing

Total DNA bacteria from the ceacum was extracted and sequenced as previously described (47). The protocols for DNA extraction were carefully designed to minimize any risk of contamination between samples or from the experimenters, as described (47,48). The V3-V4 hyper-variable regions of the 16S rDNA were amplified using the primers designed to include amplification of the Verrucomicrobia phylum as described (47,48). Samples were processed and sequenced according to the manufacturer's instructions using MiSeq Reagent Kit v3 (2x300 bp Paired-End Reads, 15 Gb output). FastQ files were generated at the end of the run to perform the quality control and filtering. The 16S targeted sequences were then clustered of into OTU before taxonomic assignment and analysed using the bioinformatics pipeline as described (47,48).

Operational Taxonomic Unit (OTU) picking

A combination of closed reference and de novo sequence clustering methods (pick_open_reference_otus.py workflow in QIIME) were used to identify Operational Taxonomic Units (OTUs) for biodiversity analyses. The quality-filtered sequences were first aligned to the Greengenes collection of reference sequences (gg_otus_13_5.tar.gz, http://greengenes.secondgenome.com/downloads/database/13_5) with a sequence

identity of 97%. The final outputs of the workflow were a biom-formatted matrix of OTU abundances in each sample.

Differential abundance analysis for OTU's and KEGG ID's were performed using the R package DESeq2 (version 1.10.1). DESeq2 was performed on sub-setted cecal data. For filtering out the differential features we used log₂FoldChange of 1.5 and 0.4 for OTUs and KEGG data, where as a p-value of 0.01 and 0.05 for OTUs and KEGG data, respectively. Variant stabilization transformation was done on the count data, which was further used to create PCoA, Heatmaps and t-SNE plots. t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) was used for dimensionality reduction for the visualization of the OTU dietary group datasets.

Differential analysis of bacterial taxa using LEfSe

To identify for bacterial taxa that were differentially abundant in the different dietary groups, Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe) analysis was performed on the OTU table using the online Galaxy interface. Using the LEfSe algorithm, bacterial taxa that were differentially abundant in pairwise analysis of dietary groups were first identified and tested using the Kruskal Wallis test. The identified features were then subjected to the Linear Discriminant Analysis (LDA) model with a threshold logarithmic LDA score set at 2.0 and ranked. Respective cladograms were generated with genus at the lowest level.

Inferred metagenomics and predicted functional analysis using PICRUSt

The closed reference sequence clustering OTU's were used for metagenome prediction and functional analysis. The quality-filtered, demultiplexed sequences were clustered by 97% similarity. Representative sequences were picked and aligned to the sequences

from the Greengenes reference collection (gg_otus_13_5.tar.gz) to assign taxonomy (as above), as described (47,48).

The resulting OTU table was then used to generate inferred metagenome data using the PICRUSt workflow with the Galaxy interface. The abundance values of each OTU were normalized to their respective predicted 16S rRNA copy numbers. The normalized OTU abundance values were multiplied by the respective predicted gene counts for metagenome prediction. Predicted functional pathways were annotated using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database at hierarchy levels 2 and 3. We also generated KEGG ID hierarchies based on the KEGG module database for pathway modules, structural complexes, functional sets, and signature modules (<http://www.genome.jp/kegg/module.html>), as described (49). LEfSe analysis was used to identify bacterial pathways and structural complexes that were differentially abundant in pairwise analysis of dietary groups.

Kegg hierarchy and LEfSe

HUMAnN (HMP Unified Metabolic Analysis Network) is a pipeline for efficiently and accurately determining the presence/absence and abundance of microbial pathways in a community from metagenomic data. HUMAnN (version 0.99) takes KEGG abundance file created by PICRUSt as inputs and produces gene and pathway summaries as outputs, as described (49). The output matrix containing the relative abundance of OTUs per sample was processed with the linear discriminant algorithm implemented in LEfSe using an alpha cutoff of 0.05 and an effect size cutoff of 2.0. We used in house scripts to parse the HUMAnN output into four different KEGG Module categories which was then used to create the LEfSe cladogram.

To predict metagenomic content from the 16s rRNA (OTUs) we used PICRUSt (version 1.0.0) using the default settings, as described (49). The OTU were normalized (qPCR) before running PICRUSt.

Culture and cell treatments

Human colic adenocarcinoma cells, Caco2, and Human monocyte cells, THP1, were cultured, as previously described (50,51). After 80% confluence, Caco2 cells were washed twice by DMEM + FCS 10% or for conditioned media collection by a mix of 0.2% BSA and 1% FCS and treated for 1 hour without or with RSV or Cur or the combination of both compounds. Then, they were stimulated with Tumor Necrosis Factor α (TNF α) or phorbol myristate acetate (PMA) for 4 hours. At the end, conditioned media was collected and stored at -20°C for zymogramme and cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and stored at -80°C for RNA extraction. Treatment of THP1 cells was similar except the replacement of DMEM by RPMI medium.

RNA extraction and real time PCR

Total RNA was isolated from cells and tissues using Trizol reagent and quantified by NanoDrop (NanoDrop technologies Inc., France). Total RNA (1 μ g) was reverse-transcribed using Moloney murine leukemia virus reverse-transcriptase and random primers at 42°C for 1 h. The expression of target genes was determined using the Stratagene Mx 3005p. The mRNA concentration of target genes was normalized to levels β 2-actin for mice or β 2-hemoglobuline for human cells mRNA and the results were expressed as relative expression levels (REL). The data were quantified by the method of $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Primers used are listed in supplementary table 1.

Transient transfection and Luciferase assay

Transient expression experiments were performed in 24-well plates according to previous studies (50,51). Each well (2 cm²) contained 2 x 10⁵ Caco2 cells in DMEM containing 10% FCS. One hour before the transfection, cells were incubated in serum-free DMEM, then the transfection was carried out using, for each well, 0.4 ml DMEM containing 0.3 mg of plasmid DNA construction to be tested including two Xenobiotic responsive elements (XRE) sequences driving luciferase (LUC) gene expression which was under the control of the basal promoter of the Thymidine kinase gene (XRE-TK-LUC) (52), 0.1 mg of control plasmid driving the b-galactosidase expression, and 2 ml of lipofectin. Sixteen hours later, the medium was replaced by 1 ml DMEM- 10%FCS and culture resumed for Twenty four hours. The cells were challenged with or without RSV and Cur or both compounds for three hours and then BaP, a ligand of the Aryl-hydrocarbon receptor (AhR) was or not added and incubation resumed for twenty four hours. Extracts were prepared using the lysis buffer of the Promega luciferase kit. Protein content of each assay was determined (BioRad kit–Interchim France). Luciferase assays were performed using 30 mg proteins of the same extracts in luciferase assay reagent, according to instructions of the manufacturer (Promega), and using a photometer (Berthold). Results were reported as arbitrary light units of luciferase normalized for transfection efficiency relative to b-galactosidase activity. At least three independent experiments were carried out in four times.

Zymography

Zymography was performed using 10% PAGE containing gelatin (1 mg/ml). Conditioned medium was loaded on the gel (5-20 ml) and migration was performed at 4°C for 2 h 15 min at 120 volts. After electrophoresis, gels were washed twice in buffer containing (50 mM Tris, pH 7.5; 0.15 M NaCl; 2.5% Triton X100) for 30 min to remove SDS. Proteolytic

activity was revealed by incubation of the gel in the same buffer without Triton but supplemented with appropriate concentrations of cations (5 mM Ca²⁺, 0.5 mM Mn²⁺) After fixation and coloration (Coomassie blue), enzyme activity was identified as clear bands against the blue background. Gel was scanned and the digitized picture was further contrasted using Paint-shop-Pro software. Cell treatment and zymography were repeated three times at least and results from a representative experiment were shown.

ROS determination

The ability of polyphenols to modify the reactive oxygen species (ROS) production was tested on Macrophages-derived THP1 cells treated with PMA and was recorded by lucigenin-induced luminescence. Differentiation of THP1 cells was carried out by supplementation of the culture medium with Retinoic acid (1mM), vitamine D3 (0.1 mM), interferon gamma (10U/ml = 5ng/ml) for 48h. Obtained macrophages were or not treated with RSV or Cur (5-50 mM) during 6 hours and cell monolayer was scratched and suspended in a RPMI-based medium without Phenol Red and supplemented with FCS (10%). Then, the suspension was distributed in an opaque 96 well plate (200 ml in each well - 0.7x10⁵ cells). Lucigenin solution (25ml) (51 mg lucigenin, 476 mg Hepes, 100 mg Gelatine / 100 ml RPMI) and according to assays, PMA (200 nM final concentration, 25 ml) was added. Luminescence was immediately recorded in the luminiscan system. Intensity values of luminescence were recorded each 5 min during a total period of 60 min. Graphs were constructed and integration of curves was carried out using the excel software. Values were plotted as relative units.

Bacteria culture

Here, seven bacterial strains chosen from 16S rDNA analysis results were included in this study: *Alistipes shahii*, *Alistipes putredinis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides irregular*,

Clostridium butiricum, *Clostridium nordii*, and *Odoribacter splanchnicus*. All strains were subcultured using a 5% sheep blood-enriched Columbia agar (COS) and incubated 48-hours at 37°C in anaerobic condition generated by GENbag anaer systems (BioMérieux).

Diffusion method in wells

RSV and Cur were dissolved in DMSO before used.

The in vitro susceptibility testing of RSV and Cur against clinical strains of *Alistipes shahii*, *Alistipes putredinis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides irregular*, *Clostridium butiricum*, *Clostridium nordii*, and *Odoribacter splanchnicus* was performed on Mueller-Hinton-2 agar by diffusion method as previously described (53,54) by depositing 100 µM of RSV, Cur or 100 µM of RSV + 100 µM of Cur solutions in a 0.5 mm in diameter wells dug into the MH2 agar medium using pastry-cutter. Beforehand, 1mL of bacterial suspension calibrated at 10E7 cells / mL was spread on agar to obtain a homogeneous bacterial culture. All petri dishes were incubated in an anaerobic condition for 48 h at 37°C. The diameters of growth inhibition of the tested bacteria were measured and photographed using a Scan 1200 (Interscience, St-Nom-la-Bretèche, France) to determine the antimicrobial activity of RSV, Cur or RSV+Cur.

Statistical Analyses

Results are presented as means ± SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used to assess the statistical significance between groups, except for the OGTT analysis, where two-way ANOVA followed by Tukey's post-test was applied. A two-sided p-value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.0g for Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, CA).

Statistical analyses for gut microbiota related data. Nonparametric Mann-Whitney's tests and nonparametric Kruskal-Wallis tests followed by Dunn's multiple comparison tests and Spearman's correlations were conducted using computer software (PRISM,

Version 6.05, GraphPad, Inc., La Jolla, CA) and a software environment (R, Version 3.1.2, <https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.1.2/>).

Statistics for metabolomics

Statistical analyses were performed using SIMCA P+12 (Umetrics, Umea, Sweden). Partial least square-discriminant analyses (PLS-DA) were used to calculate the statistical distance among the study groups metabolome and to select the most relevant variables attached to group discrimination (55). After PLD-DA, Variables selection was performed on the variable importance in projection (VIP) score calculated by the SIMCA algorithm, plotted in a normal probability plot distribution and selected with 80% confidence interval. For all statistical significant PLS-DA models, the P values obtained after variables selection and cross-validation ANOVA were lower than 0.001, with a low residual (regression/residual less than 4), a class variance explained (R²_Y) over 88%, and class variance predicted (after cross-validation) over 81%, and a variables variance explained (R²_X) over 71%. Permutation tests (200 hundred permutations) ascribing false class assignment to observations gave bad R²_Y and Q²_Y values, indicated that model predictions were not due to chance.

Results

Resveratrol improves glucose tolerance of high-fat diet-fed diabetic mice

To explore the therapeutic effect of RSV on glyceimic parameters without the confounding effect of an increased body weight and on gut microbiota ecology, we fed the mice with a high-fat diet for only 5 weeks with two different polyphenols i.e. resveratrol and curcumin or the combination. The duration of this treatment allowed us to study the early impact of the polyphenols on the development of hyperglycemia. RSV improved the glyceimic control of the HFD-fed mice following an oral glucose challenge

(Figure 1). We then compared the impact of RSV with another polyphenol curcumin (Cur). This polyphenol had barely any impact on glycemia. Interestingly, Cur reversed the effect of RSV on the glycemia of the HFD-fed treated mice. Therefore, we used this feature of Cur on RSV glycemic control as a pharmacological tool to study the mechanisms through which RSV controls glycemia. It is noteworthy that we favored a model of hyperglycemia without obesity and studied the early onset of the disease to avoid the confounding impact of obesity on the mechanism responsible for the glycemic control. The impact of RSV could hence be fully and directly interpreted. Furthermore, due to the short time course of diet treatment no major metabolic co-morbidities were expected and therefore detected in any group studied as reported previously (41). Plasma triglycerides, cholesterol, and insulin were not impacted by any of the treatment (data not shown).

Effect of polyphenols on gut microbiota in high-fat diet-fed diabetic mice

Since high-fat diet induces a gut microbiota dysbiosis and the latter is causal to hyperglycemia (10), we sequenced the gut microbiota of HFD-fed mice treated with the polyphenols. The sequencing of the 16S rDNA genes from the gut microbiota samples followed by taxonomic classification (**Figure 2A**) and primary component analyses (**Figure 2B**) demonstrated first that the fat-enriched diet dramatically changed the ecology of the gut microbiota at the phylum and family taxonomic levels when compared to the NC-fed mice. Compared to the NC-fed mice the HFD-fed mice were characterized by an increased abundance in the phyla Proteobacteria and Deferribacteres (**Figure 2A**). At the family level, the proportion of Rikenellaceae, Bacteroidaceae, Peptostreptococcaceae, and Deferribacteraceae were increased in HFD-fed mice (**Figure 2A**). In contrast, the proportion of Lactobacillaceae, which have been proposed to be key players in host metabolic balance (56), were notably absent from the HFD mouse cecal

samples. The HFD also decreased the abundance of the families Lachnospiraceae and Porphyromonadaceae. Dimensional reduction plot depicting the relationships between the microbiota for each cecal content sample, with respect to the five dietary groups, shows that the high-fat diet treatment had a strong impact (**Figure 2B**). The treatment of the HFD-fed mice with any of the polyphenol further and almost similarly modifies the microbiota ecology. Interestingly, the Cur treatment of the RSV-HFD-fed mice were additive on the change in gut microbiota ecology. Changes of the gut microbiota ecologies were also observed at the level of the taxonomic diversity as calculated using the Shanon index (**Figure 2C**). The mice fed a HFD had an increased Shanon diversity at both taxonomic levels. The RSV and Cur treatments reversed the increased bacterial diversity which is most likely due to the antibiotic activity of the polyphenols (18,57).

To more precisely identify the differential taxons at all taxonomic levels we performed LEfSe analyses followed by a linear discrimination analysis of the 16S rDNA gene (**Figure 3**). The impact of a HFD generated numerous differences at all taxonomical levels (**Figure 3A**). Among them the proportion of Deferibacteraceae, Peptostreptococcaceae, and Desulfovibrionaceae was increased by the HFD while the proportion of Lactobacillaceae, Coriobacteriaceae, and Anaeroplasmataceae was rather reduced.

We then analyzed whether the control by RSV of glycemia was associated with the previously reported antibiotic feature of the polyphenols on the gut microbiota dysbiosis induced by the HFD (18,57). We here show that when RSV was consumed by the HFD-fed mice the ratio between Firmicutes/Bacteroidetes phyla increased while the proportion of Proteobacteria reduced (**Figure 2**). At the Family level RSV increased the proportion of Ruminococcaceae while reducing that of Rikenellaceae and Peptostreptococcaceae (**Figure 2**). Cur treatment impacted different taxa and mostly reduced Rikenellaceae while increasing Bacteroidaceae. Importantly, Cur treatment of

the RSV-treated mice hampers the impact of RSV by further reducing the proportion of Ruminococcaeae and Porphyromonadaceae (**Figure 2**). We then precisely identified the taxa that the proportion was increased by the HFD-treatment and reversed by the RSV and blocked by the Cur (**Supplementary Table 2**). Out of 14 taxonomic elements showing differences between groups, 10 signed the difference between NC and HFD. From these, one element (S24-7) was also found among the 3 differences identified in response to the RSV treatment (**Supplementary Table 2, Figure 3E**). Importantly this taxonomic feature i.e. the S24-7 family, was impacted by the Cur treatment. Altogether the S24-7 family could be considered as an important target of the RSV treatment which could explain the glycemic control induced by the polyphenol. The linear regression analysis showed a negative correlation between the glycemic index of glucose intolerance and the proportion of the bacteria (**Figure 3G**). Along the same line of investigation we analyzed the taxons which were increased by the HFD treatment but reduced by the RSV and that the reduction was prevented by the Cur (**Figure 3F**). We identified *Bifidobacterium pseudolongum* and a member of the Peptostreptococcaceae family.

To investigate potential microbial mechanisms of glycemic control, we used a computational approach (58) to predict the functional composition of the bacterial metagenomes derived from each dietary group. The 16S targeted metagenomics profiling information for the cecal contents of each mouse were used to predict which gene families were present and then combine gene families to estimate the composite metagenomes. The composite metagenomes were then parsed into KEGG derived modules for pathway prediction and structural complexes. The pathway and structural complex data were then analyzed by LEfSe for predicted gene enrichment using the same dietary group comparisons as for the taxonomic evaluations (**Figure 4**).

Predicted genes in cecal contents impacted by the HFD-treatment mice were most wide ranging and included those assigned to pathways generally involved in carbohydrate and amino acid utilization (**Figure 4A**). With NC diet pathways for glycan, glycosaminoglycan, and other carbohydrate metabolism were enriched. This could be expected given the fact that the amount of complex carbohydrate is substantially higher in NC compared to HFD. Similarly, NC diet appears to enrich for branched chain amino acid and purine/pyrimidine metabolism, as well as degradation of aromatic compounds. In contrast, the HFD is predicted to enrich for genes involved in nitrogen and sulfur metabolism, and biosynthesis of secondary metabolites including amino-acids. Out of the numerous pathways which were different between NC and HFD-fed mice, only some were reversed by the RSV treatment that includes the sulfur metabolism and the secondary metabolites from the amino-acids biosynthesis pathways (**Figure 4B and Supplementary Table 3**). Others, that we did not focus on since out of the scope, were impacted by Cur alone (**Figure 4C**). Two of the pathways impacted by RSV, notably the dissimilatory sulfur pathway, were antagonized by Cur (**Figure 4D and Supplementary Table 3**). A linear regression analysis showed that the proportion of the predicted dissimilatory sulfate reduction pathway was positively correlated with glycemia in the HFD-fed mice (**Figure 4G**). Venn diagram show that none of the pathways which were reduced by HFD and reversed by RSV while prevented by Cur were identified (**Figure 4E**). Conversely, we identified two pathways which were increased by the HFD and reversed by the RSV while prevented by Cur (**Figure 4F**). The first one was related to energy metabolism i.e. sulfur metabolism and the second was related to amino acid metabolism i.e. aromatic:tyrosine metabolism (**Supplementary Table 3**).

Eventually, similar to the predicted pathways, the predicted structural complex modules were most significant with NC diet mice compared to HFD mice (**Figure 5A**). Modules pertaining to energy metabolism, such as ATP synthesis and ABC type II transporter

systems, are predicted to be depleted by HFD, while components related to environmental signaling such as bacterial secretion systems were enriched. The impact of RSV on predicted gene enrichment compared to HFD alone was more limited (**Figure 5B**). The effect of RSV on the predicted metagenome was to reduce the genes related to sulfur metabolism and biosynthesis of metabolites. In comparison, the predicted impact of Cur on RSV was to reduce the HFD induced changes in glycan, glycosaminoglycan, and other carbohydrate metabolism as well as reduce contributions to nitrogen metabolism and biosynthesis of secondary metabolites (**Figure 5C**). An additional interesting feature of the Cur supplemented diet is the predicted reduction of lipopolysaccharide metabolism (**Figure 5C**). The HFD with RSV and Cur co-supplementation did not alter any predicted pathway modules compared to HFD with RSV supplementation alone (**Figure 5D**). We then analyzed the global impact of RSV on predicted structural complex modules. The impact of RSV supplementation with the HFD is less deep rooted in the predicted hierarchies, but includes a shift in various PTS (phosphotransferase system) carbohydrate specific transporters and a reduction of amino acid transport systems. The effect of Cur on the HFD is again broader ranging, but also includes PTS carbohydrate specific transporters a reduction of amino acid transport systems. In addition, the supplementation of Cur is predicted to reduce the abundance of pathogenicity related genes of gram negative bacteria, namely those of type III and type VI secretion systems (59).

Altogether, our data show that the polyphenol treatments improved the gut microbiota dysbiosis induced by the HFD by putatively impacting bacterial metabolic pathways. A recent set of data is available regarding the role of polyphenols on gut microbiota (60–63). However, our data bring more knowledge when compared to the literature since we identified microbiota-related pathway, thanks to the deep sequencing and bioinformatics analyses, which are linked to type 2 diabetes.

We further thought the antagonism of RSV and Cur at the level of glycemia homeostasis may be due to differential effect of the two polyphenols on gut microbiota. According to the 16S rDNA analysis results, several bacteria strains were selected according to the gut microbiota analysis and cultured in the presence or not of polyphenols added alone or in combination. Among seven bacteria strains tested belonging to four different genera (*Alistipes*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Odoribacter*), there was only *Alistipes putredinis* which was killed by RSV while Cur counteracted this effect (**Figure 5G**).

Polyphenols control colonic inflammatory markers

Since RSV and Cur impact gut microbiota we analyzed whether the polyphenols simultaneously regulate colonic inflammation. Table 1 shows that HFD moderately increase the expression of some gene involve in inflammation such as IL1 β , IL6, F4/80, CD36, and MMP7. RSV or Cur down regulated significantly most of them while adding Cur treatment to RSV almost blunted the impact of RSV on these gene expressions. Interestingly, another subset of gene expression was increased such as TNF α , TGF β , MMP9, and MMP13 by RSV and in some instances with Cur. Importantly, the RSV-induced gene expression was reversed when Cur was added to the RSV treatment.

Polyphenols control inflammation of CaCo2 and THP1 cells

We further analyzed the impact of polyphenols in an *in vitro* standardized model of human Caco2 intestinal epithelial cells and the monocyte THP1 cells. The anti-inflammatory activity of RSV, Cur, or RSV supplemented with Cur was evaluated by measuring the transcriptional level of different pro-inflammatory markers such as IL8, IL1 β , and ICAM-1 on cells challenged or not with TNF α or PMA (**Figure 6**). On Caco2 cells, TNF α and PMA markedly increased the expression of IL8, IL1 β , and ICAM-1 but this enhancement was inhibited by the treatment with either RSV or Cur (**Figure 6A-C**).

The co-treatment of RSV and Cur induced an additive inhibitory effect on most of gene expression stimulated by TNF α and PMA (**Figure 6A,C,E,F,G**). On THP1 cells, TNF α -induced IL1 β expression was reduced by RSV treatment (**Figure 6J**) while IL8 and ICAM1 expression was enhanced (**Figure 6I,K**). A co-treatment of polyphenols induced a synergic inhibitory effect on IL1 β expression of TNF α -stimulated THP1 cells (**Figure 6J**). However, Cur antagonized the RSV-enhanced IL8 and ICAM1 expression (**Figure 6I,K**).

Expression of TGF β was also analyzed. The expression of this cytokine, known as displaying anti-inflammatory properties, was induced by TNF α or PMA. RSV reduced the TNF α and PMA-induced TGF β expression on Caco2 cells (**Figure 6D,H**). When added to RSV, Cur induced an additive down regulation (**Figure 6D,H**). On THP1 cells, Cur antagonized the RSV-induced down regulation of TGF β expression (**Figure 6L**).

Zymography assays of THP1-conditioned culture media shown that the level of active MMP9 was either weakly diminished by RSV or strongly inhibited by Cur (**Supplementary Figures 1,2**). ROS production has been associated to inflammatory processes (64,65). Indeed it is well established that transcription factors such as NF- κ B and AP1 which control some genes involved in inflammation are regulated through Ox/Red mechanisms and specifically via ROS. THP1 cells in vitro differentiated into macrophages and challenged with PMA exhibited a large capability to deliver ROS (**Supplementary Figure 3**). This production was cut down following cell incubation in the presence of RSV or Cur indicating that ROS could be a target for polyphenols action (**Supplementary Figure 3**).

Polyphenols regulated AhR promotor activity

We previously shown that RSV and Cur are competitive AhR agonists (66,67). Since AhR has been shown to decrease GLP-1 expression (57) and also physically interact with NF- κ B factor (68), we thought to study the impact of each polyphenol alone or in association on the AhR promoter activity. Using reporter gene assay, we tested AhR-induced activation XRE sites on Luciferase expression. We found that BaP activated XRE sites via AhR activation as expected compared to control group (**Figure 6M**). RSV and Cur strongly inhibited both BaP-induced AhR activation and basal level of luciferase expression. However, Cur combined with RSV were not antagonistic but rather synergic.

Polyphenols regulates plasma metabolomics

To identify whether the polyphenols could have a systemic impact we performed metabolomics studies on plasma (61,69–71). The plasma GC/MS metabolomics fingerprinting was based on 57 extracted features, which is in the range of what is currently reported in such matrix with GCMS analysis (72,73). The impact of the polyphenols was examined by projection of latent structure-discriminant analysis (PLS-DA) (**Figure 7A**). Three significant components could be calculated after 7 fold cross-validation, explaining 57.7% to total observations variance ($R^2(X)$), 40% of group variance ($R^2(Y)$), and 23.2 % of predicted group variance ($Q^2(Y)$). The classes (dietary groups) were significantly heterogeneous ($P=0.003$ after cross-validation ANOVA). Class assignment ranged from 12.5 to 100% confidence ($P=7.7e-012$, fisher probability test), as reported in the confusion matrix (**Supplementary Table 5**). Finally, a permutation test assessing overfitting indicated that the discriminant model was not spurious (Q^2 values being negative at the intercept after 20 permutations) (**Supplementary Table 6**). The metabolic distance among the dietary groups were best displayed using the “c” vectors of the PLS-DA, correlating the class variables with the observations scores. It

indicates the “barycentric” coordinates of each class in the loading space, and summarizes a metabolome score for each dietary group (**Figure 7B**). Strikingly, figure 7B clearly showed that both HFD+RSV and HFD+Cur metabolomes clustered together with a low degree of dissimilarity (dissimilarity index values on the ordinate axis), and exhibited more proximity to the normal low fat chow diet than did the metabolome of both HFD alone or HFD+RSV+Cur. This representation also clearly showed that added both RSV and Cur to a high-fat diet almost completely abrogated the biological effect induced by each component separately. To get into more details, we then compared the metabolic impact of the diets pairwise, e.g. HFD vs HFD+RSV, and HFD+RSV vs HFD+RSV+Cur. In both cases, the PLS-DA models were robust, using 4 to 5 components describing over 98% and 83% of the explained (R²Y) and predicted (Q²Y) variances, respectively, and Q²Y values at the intercept being negative in the permutation test. A further improvement was obtained on the P values after CV-ANOVA (all P < 0.0007) after selection of the most discriminating variables (variable importance score criteria over 1.3, selected from a threshold over 80% confidence interval in a normal probability distribution) (**Figure 7C,D**).

Twelve metabolites were found discriminant among the HFD and the HFD+RSV (among them 4 could not be annotated), or HFD and HFD+Cur (among them 3 could not be annotated). When comparing the metabolites that shifted away from the HFD with either the addition of RSV or Cur, we identified metabolites involved in amino acid metabolism including branched chain amino acid isoleucine strongly increased in RSV treatment over HFD and aromatic amino acid proline (**Figure 7E**). Importantly, numerous short chain fatty acids were quantified in the blood of polyphenol treated mice suggesting a strong impact on gut microbiota dietary fiber fermentation.

Interestingly, out of the metabolites which were impacted by the RSV treatment and reversed by the Cur treatment, along the same line as the hyperglycemia, we identified

expectedly glucose, glucitol, and originally isoleucine which is tightly linked to gut microbiota dysbiosis (74,75) (**Figure 7E**). These data demonstrate the impact of gut polyphenols on gut microbiota dysbiosis at the intersection with metabolism.

Discussion

Throughout a pharmacological approach combining the impact of two polyphenol resveratrol and curcumin treatment on high-fat-diet induced type 2 diabetes in the mouse we here further confirm that resveratrol controls glycemia through a mechanism which is associated with a change in gut microbiota dysbiosis and metabolic inflammation. We here further added to the knowledge, thanks to deep sequencing of gut microbiota and bioinformatic/metabolomics analyses, that specific sulfur metabolism, and short chain fatty acid metabolism, and branched chain amino-acids could be mechanisms responsible for the impact of resveratrol on glycemia.

The role of polyphenols on the control of metabolism has been reported over decades. Numerous modes of action including anti-inflammatory and anti-oxidant activities have been demonstrated to be responsible for the metabolic impact (76). However, a novel mode of action has emerged recently which reconcile the anti-inflammatory/oxidant mode of action, the impact on metabolism, and the antibiotic activity of polyphenols (77,78). The role of gut microbiota on metabolic disease is now considered as a leading hypothesis (79). A gut microbiota dysbiosis characterizes type 2 diabetes (7,8) which, upon the induction of a metabolic endotoxemia (80) i.e. a raise in the blood concentration of the pro-inflammatory bacterial molecule lipopolysaccharides trigger the TLR4/CD14 pathway increases inflammation and induces insulin resistance (12,81). Other microbiota related mechanisms are currently being studied to interfere with inflammation such as the production of short chain fatty acids acetate, propionate butyrate. Dietary fermenting bacteria such as the Bifidobacterium strongly produce

SCFA from dietary fibers. Butyrate has been shown to reduce intestinal inflammation notably during inflammatory bowel disease (82–85) notably through a mechanism implying the activation of the anti-inflammatory IL10-producing TReg lymphocytes (86). Eventually, the role of branched chain amino-acid is emerging and is notably associated to the control of glycemia and hepatic steatosis (74,75,87,88).

Our present data are on the same line of evidence since we here show that the polyphenol resveratrol controls glycemia, inflammatory markers, and is associated with a specific change in gut microbiota ecology. We previously and initially reported that RSV controls glucose metabolism and gut microbiota ecology (18). We here reported that the S24-7 family was associated with diabetes protection irrespectively of the mouse treatment (89). Conversely, the Bifidobacteriaceae and the Peptostreptococcaceae negatively reduced in NC, RSV treatments. Ever since, numerous data comforted our observation (18,90–92). In addition to the bacterial taxons we here added to the knowledge that RSV impacts some microbial pathways controlling notably carbohydrate and amino-acid metabolism, as well as numerous phosphorylation systems, as shown by bioinformatics prediction of pathways and linear discrimination analyses. We here focused on the pathways which are associated with the glyceic control through linear regression. The mainly correlated pathway was related to the microbial sulfur metabolism. This pathway is related to the metabolism of bile acids (93,94) and has been previously shown in human to be a signature of type 2 diabetes (94,95). Sulfur can accept electrons in the respiratory chain instead of oxygen allowing the growth of strict anaerobes such as Bifidobacterium and therefore, prevent from the oxidative stress generated by oxygen. Our data here present a change in Bifidobacterium induced by RSV and is prevented by Cur which fits with the anti-diabetic effect of RSV. These first set of analyses reveal that RSV impacts the gut microbiota dysbiosis, notably the sulfur metabolism, and favors the growth of Bifidobacteria. A clear demonstration of

the role played by Bifidobacterium has been proposed on glycemia. The chronic treatment with a strain of Bifidobacterium improves the glyceemic control through a mechanism reducing inflammation, metabolic endotoxemia, and insulin resistance (14,96,97). These bacteria are important fermenters of dietary fibers that could be responsible for the metabolic control. This hypothesis is supported by our data which show through metabolomics studies that SCFA are increased in the blood of polyphenol fed mice. SCFA are important molecules to prone an anti-inflammatory effect on gut immune system (86). Recent data from our laboratory have causally demonstrated the role of an impaired intestinal immune defense and the development of type 2 diabetes (10). We identified that a reduced TReg lymphocyte frequency in the *lamina propria* of the small intestine was causally induced by the gut microbiota dysbiosis and could contribute to the development of hyperglycemia (10). Throughout a microbiota related vaccination strategy we could improve intestinal defense and immune system preventing therefore from the development of type 2 diabetes (98). Altogether, the role of gut microbiota on inflammation is now largely validated (7,99). Therefore, it is in line with the anti-inflammatory role of RSV. We here confirmed that RSV treatment is characterized by some decrease in inflammation since various inflammatory markers such as IL1 β and F4/80 and IL6 gene expression are reduced in various tissues. Interestingly, Cur treatment antagonized the anti-hyperglycemic effect of RSV and Cur as well as some anti-inflammatory effect of RSV such as the expression of IL1 β , TNF α , IL10, MMP7, and MMP9. This impact was observed *in vivo* in the colon and would be reproduced to some extent in intestinal epithelial cells Caco2 and in monocytes THP1 in response to TNF α and PMA, triggering the NF- κ B and AP1 pathway respectively, that we used as a model. The *in vitro* impact of RSV on metalloproteinase activity is consistent with the well-known anti-inflammatory effects of the polyphenols (2,100). Importantly, in addition to the impact of RSV on sulfur, and short chain fatty acid metabolism we also

observed changes in amino-acids and phosphorylation transport systems (PTS) of different amino-acids and carbohydrates showing that without changing the fat-enriched diet the RSV treatment strongly impacts the genetic predisposition to modify the energy metabolism of the bacteria and consequently interacts with the host. To validate the metagenomics hypotheses we performed metabolomics on blood samples and observed that isoleucine we increased uniquely in RSV and not in Cur-treated mice, while glucose and glucitol concentrations were reduced in RSV mice only. This observation parallels the glucose control suggesting a causal relationship. Isoleucine has been reported, in large meta-analyses, as associated with the type 2 diabetes (101), and derivatives such as hydroxyl-isoleucine were even characterized with hypoglycemic properties (102,103). This conclusion is consistent by our observation of the glucose lowering effect of RSV. We observed that Cur treatment reversed the glycemic control of RSV. We here notice as well that the relative distribution of Bifidobacteriaceae, the S24-7, and Peptostretococacceae were impacted by the HFD, reversed by the RSV, and where the Cur prevented the effect of RSV. To further explain the molecular mechanism corresponding to the antagonistic effect on Cur on RSV we explored the impact of both polyphenols on proglucagon gene expression regulation. We previously reported that RSV increases GLP-1 secretion (18). The mechanism could be linked to the impact of short chain fatty acids on GLP-1 secretion through GPR41/43 receptors (104,105). This hypothesis is supported by our present data since we detected an increased circulating concentration of short chain fatty acids and a change in Bifidobacteriaceae fermenting dietary fibers into these metabolites.

In addition, we hypothesized that the change in gut microbiota would trigger xenobiotic sensing system such as the AhR receptor. Therefore, we studied the crosstalk between GLP-1 i.e. proglucagon gene and AhR regulation. We found, using online cis-regulated predicting promoter sequences tool Conreal online server, six potential transcriptional

binding sites for Ahr-ARNT at -1000 position upstream of the pro-glucagon coding sequence. This displayed a possible involvement of these sites for the regulation of the proglucagon gene expression. Transfection assay using a reporter gene under the control of two XRE sites allowed us to identify that both polyphenols RSV and Cur inhibited the basal and the BaP-induced gene expression. In addition, the combination of RSV and Cur provided a synergic effect. So, at the level of gene regulation involving AhR no antagonism was found between these two polyphenols. Then, the reciprocal effect of RSV and Cur on gut microbiota was examined. Seven bacteria strains, abundance of which was modified in the presence of polyphenols, have been selected from sequencing analysis results and then cultured on plate in the presence or not of polyphenols. As a result, we have found a clear inhibition of the growing of *Alistipes putredini*, an *Alistipes* species, and an antagonist effect of Cur on the inhibition induced by RSV. In a previous study (18), we have also found that the abundance of this species was increased by HFD which was normalized following the treatment with RSV. Altogether, gut microbiota, especially *Alistipes putredinis*, might play the leading role on T2D pathogenesis and the inhibition effect of Cur on RSV on glucose homeostasis.

References

1. Park E-J, Pezzuto JM. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2015 Jun;1852(6):1071–113.
2. Csiszar A, Smith K, Labinskyy N, Orosz Z, Rivera A, Ungvari Z. Resveratrol attenuates TNF- α -induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF- κ B inhibition. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 2006 Oct 1;291(4):H1694–9.
3. Zhu J, Yong W, Wu X, Yu Y, lv J, Liu C, et al. Anti-inflammatory effect of resveratrol on TNF- α -induced MCP-1 expression in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 May 2;369(2):471–7.
4. Shakibaei M, Csaki C, Nebrich S, Mobasheri A. Resveratrol suppresses interleukin-1 β -induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: Potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol.* 2008 Dec 1;76(11):1426–39.
5. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006 Jul 3;116(7):1793–801.
6. Bouloumié A, Casteilla L, Lafontan M. Adipose Tissue Lymphocytes and Macrophages in Obesity and Insulin Resistance Makers or Markers, and Which Comes First? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Jul 1;28(7):1211–3.
7. Burcelin R, Garidou L, Pomié C. Immuno-microbiota cross and talk: The new paradigm of metabolic diseases. *Semin Immunol.* 2012 Feb;24(1):67–74.
8. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012 Oct 4;490(7418):55–60.
9. Serino M, Fernández-Real JM, Fuentes EG, Queipo-Ortuño M, Moreno-Navarrete JM, Sánchez Á, et al. The gut microbiota profile is associated with insulin action in humans. *Acta Diabetol.* 2013;50(5):753–61.
10. Garidou L, Pomié C, Klopp P, Waget A, Charpentier J, Aloulou M, et al. The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing ROR γ t and Controls Metabolic Disease. *Cell Metab.* 2015 Jul 7;22(1):100–12.
11. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006 Dec 21;444(7122):1027–131.
12. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007 Jul;56(7):1761–72.
13. Luche E, Cousin B, Garidou L, Serino M, Waget A, Barreau C, et al. Metabolic endotoxemia directly increases the proliferation of adipocyte precursors at the onset of metabolic diseases through a CD14-dependent mechanism. *Mol Metab.* 2013 Jul 4;2(3):281–91.

14. Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermúdez-Humarán LG, et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol Med*. 2011 Sep;3(9):559–72.
15. Burcelin R, Serino M, Chabo C, Garidou L, Pomié C, Courtney M, et al. Metagenome and metabolism: the tissue microbiota hypothesis. *Diabetes Obes Metab*. 2013 Sep 1;15(s3):61–70.
16. Bereswill S, Muñoz M, Fischer A, Plickert R, Haag L-M, Otto B, et al. Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol, Curcumin and Simvastatin in Acute Small Intestinal Inflammation. *PLoS ONE*. 2010 Dec 3;5(12):e15099.
17. Larrosa M, Yañez-Gascón MJ, Selma MV, González-Sarrías A, Toti S, Cerón JJ, et al. Effect of a Low Dose of Dietary Resveratrol on Colon Microbiota, Inflammation and Tissue Damage in a DSS-Induced Colitis Rat Model. *J Agric Food Chem*. 2009 Mar 25;57(6):2211–20.
18. Dao T-MA, Waget A, Klopp P, Serino M, Vachoux C, Pechere L, et al. Resveratrol Increases Glucose Induced GLP-1 Secretion in Mice: A Mechanism which Contributes to the Glycemic Control. *PLoS ONE*. 2011 Jun 6;6(6):e20700.
19. Etxeberria U, Arias N, Boqué N, Macarulla MT, Portillo MP, Martínez JA, et al. Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. *J Nutr Biochem*. 2015 Jun;26(6):651–60.
20. Qiao Y, Sun J, Xia S, Tang X, Shi Y, Le G. Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity. *Food Funct*. 2014 May 28;5(6):1241–9.
21. Etxeberria U, Arias N, Boqué N, Romo-Hualde A, Macarulla MT, Portillo MP, et al. Metabolic faecal fingerprinting of trans-resveratrol and quercetin following a high-fat sucrose dietary model using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Food Funct*. 2015 Aug 5;6(8):2758–67.
22. Bode LM, Bunzel D, Huch M, Cho G-S, Ruhland D, Bunzel M, et al. In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota. *Am J Clin Nutr*. 2013 Feb 1;97(2):295–309.
23. Argmann C, Auwerx J. Insulin Secretion: SIRT4 Gets in on the Act. *Cell*. 2006 Aug 9;126(5):837–9.
24. Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, et al. Regulation of Insulin Secretion by SIRT4, a Mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*. 2007 Nov 16;282(46):33583–92.
25. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*. 2005 Mar 3;434(7029):113–8.
26. Nayagam VM, Wang X, Tan YC, Poulsen A, Goh KC, Ng T, et al. SIRT1 Modulating Compounds from High-Throughput Screening as Anti-Inflammatory and Insulin-Sensitizing Agents. *J Biomol Screen*. 2006 Dec 1;11(8):959–67.

27. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*. 2007 Nov 29;450(7170):712–6.
28. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006 Nov 16;444(7117):337–42.
29. Chang G-R, Chen P-L, Hou P-H, Mao FC. Resveratrol protects against diet-induced atherosclerosis by reducing low-density lipoprotein cholesterol and inhibiting inflammation in apolipoprotein E-deficient mice. *Iran J Basic Med Sci*. 2015 Nov;18(11):1063–71.
30. Chen M, Yi L, Zhang Y, Zhou X, Ran L, Yang J, et al. Resveratrol Attenuates Trimethylamine-N-Oxide (TMAO)-Induced Atherosclerosis by Regulating TMAO Synthesis and Bile Acid Metabolism via Remodeling of the Gut Microbiota. *mBio*. 2016 Apr 5;7(2):e02210–5.
31. Strimpakos AS, Sharma RA. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Mar;10(3):511–45.
32. Buhrmann C, Mobasher A, Busch F, Aldinger C, Stahlmann R, Montaseri A, et al. Curcumin modulates nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-mediated inflammation in human tenocytes in vitro: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem*. 2011 Aug 12;286(32):28556–66.
33. Kim K-H, Lee EN, Park JK, Lee J-R, Kim J-H, Choi H-J, et al. Curcumin attenuates TNF- α -induced expression of intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1 and proinflammatory cytokines in human endometriotic stromal cells. *Phytother Res PTR*. 2012 Jul;26(7):1037–47.
34. Soetikno V, Sari FR, Veeraveedu PT, Thandavarayan RA, Harima M, Sukumaran V, et al. Curcumin ameliorates macrophage infiltration by inhibiting NF- κ B activation and proinflammatory cytokines in streptozotocin induced-diabetic nephropathy. *Nutr Metab*. 2011 Jun 10;8:35.
35. Salh B, Assi K, Templeman V, Parhar K, Owen D, Gómez-Muñoz A, et al. Curcumin attenuates DNB-induced murine colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 Jul;285(1):G235–43.
36. Ukil A, Maity S, Karmakar S, Datta N, Vedasiromoni JR, Das PK. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Br J Pharmacol*. 2003 May;139(2):209–18.
37. Arun N, Nalini N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant Foods Hum Nutr*. 2002 Mar;57(1):41–52.
38. Murugan P, Pari L. Influence of Tetrahydrocurcumin on Hepatic and Renal Functional Markers and Protein Levels in Experimental Type 2 Diabetic Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007 Oct 1;101(4):241–5.

39. El-Moselhy MA, Taye A, Sharkawi SS, El-Sisi SFI, Ahmed AF. The antihyperglycemic effect of curcumin in high fat diet fed rats. Role of TNF- α and free fatty acids. *Food Chem Toxicol*. 2011 May;49(5):1129–40.
40. Amiot MJ, Romier B, Anh Dao T-M, Fanciullino R, Ciccolini J, Burcelin R, et al. Optimization of trans-Resveratrol bioavailability for human therapy. *Biochimie*. 2013 Jun;95(6):1233–8.
41. Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2002 Apr 1;282(4):E834–42.
42. Martin J-C, Maillot M, Mazerolles G, Verdu A, Lyan B, Migné C, et al. Can we trust untargeted metabolomics? Results of the metabo-ring initiative, a large-scale, multi-instrument inter-laboratory study. *Metabolomics*. 2015;11(4):807–21.
43. Begley P, Francis-McIntyre S, Dunn WB, Broadhurst DI, Halsall A, Tseng A, et al. Development and Performance of a Gas Chromatography–Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis for Large-Scale Nontargeted Metabolomic Studies of Human Serum. *Anal Chem*. 2009 Aug 15;81(16):7038–46.
44. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc*. 2011 Jun;6(7):1060–83.
45. van der Kloet FM, Bobeldijk I, Verheij ER, Jellema RH. Analytical Error Reduction Using Single Point Calibration for Accurate and Precise Metabolomic Phenotyping. *J Proteome Res*. 2009 Nov 6;8(11):5132–41.
46. Giacomoni F, Corguillé GL, Monsoor M, Landi M, Pericard P, Pétéra M, et al. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics*. 2015 May 1;31(9):1493–5.
47. Lluch J, Servant F, Païssé S, Valle C, Valière S, Kuchly C, et al. The Characterization of Novel Tissue Microbiota Using an Optimized 16S Metagenomic Sequencing Pipeline. *PLoS ONE*. 2015 Nov 6;10(11):e0142334.
48. Païssé S, Valle C, Servant F, Courtney M, Burcelin R, Amar J, et al. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. *Transfusion (Paris)*. 2016 Feb 1;56(5):1138–47.
49. Branchereau M, Reichardt F, Loubieres P, Marck P, Waget A, Azalbert V, et al. Periodontal dysbiosis linked to periodontitis is associated with cardio-metabolic adaptation to high-fat diet in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016 Mar 31;ajpgi.00424.2015.
50. Vallee S, Laforest S, Fouchier F, Montero MP, Penel C, Champion S. Cytokine-induced upregulation of NF- κ B, IL-8, and ICAM-1 is dependent on colonic cell polarity: implication for PKC δ . *Exp Cell Res*. 2004 Jul 1;297(1):165–85.
51. Makon-Sébastien N, Francis F, Eric S, Henri VP, François LJ, Laurent P, et al. Lycopene Modulates THP1 and Caco2 Cells Inflammatory State through

Transcriptional and Nontranscriptional Processes. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:507272.

52. Fallone F, Villard P-H, Sérée E, Rimet O, Nguyen QB, Bourgarel-Rey V, et al. Retinoids repress Ah receptor CYP1A1 induction pathway through the SMRT corepressor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Sep 17;322(2):551–6.
53. Çadirci BH, Çitak S. A comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria. *Pak J Nutr.* 2005;4(4):237–41.
54. Dubourg G, Elsayi Z, Raoult D. Assessment of the in vitro antimicrobial activity of *Lactobacillus* species for identifying new potential antibiotics. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Nov;46(5):590–3.
55. Martin J-C, Canlet C, Delplanque B, Agnani G, Lairon D, Gottardi G, et al. ¹H NMR metabonomics can differentiate the early atherogenic effect of dairy products in hyperlipidemic hamsters. *Atherosclerosis.* 2009 Sep;206(1):127–33.
56. Wang J, Tang H, Zhang C, Zhao Y, Derrien M, Rocher E, et al. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J.* 2015 Jan;9(1):1–15.
57. Khalil A, Villard P-H, Dao MA, Burcelin R, Champion S, Fouchier F, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons potentiate high-fat diet effects on intestinal inflammation. *Toxicol Lett.* 2010 Jul 15;196(3):161–7.
58. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol.* 2013 Sep;31(9):814–21.
59. Martin DA, Bolling BW. A review of the efficacy of dietary polyphenols in experimental models of inflammatory bowel diseases. *Food Funct.* 2015 Jun;6(6):1773–86.
60. Núñez-Sánchez MA, González-Sarrías A, Romo-Vaquero M, García-Villalba R, Selma MV, Tomás-Barberán FA, et al. Dietary phenolics against colorectal cancer--From promising preclinical results to poor translation into clinical trials: Pitfalls and future needs. *Mol Nutr Food Res.* 2015 Jul;59(7):1274–91.
61. Stevens JF, Maier CS. The Chemistry of Gut Microbial Metabolism of Polyphenols. *Phytochem Rev Proc Phytochem Soc Eur.* 2016 Jun;15(3):425–44.
62. Morais CA, Rosso VV de, Estadella D, Pisani LP. Anthocyanins as inflammatory modulators and the role of the gut microbiota. *J Nutr Biochem.* 2016 Jul 1;33:1–7.
63. Ozdal T, Sela DA, Xiao J, Boyacioglu D, Chen F, Capanoglu E. The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. *Nutrients.* 2016 Feb 6;8(2):78.
64. Costanzo A, Moretti F, Burgio VL, Bravi C, Guido F, Levrero M, et al. Endothelial activation by angiotensin II through NFκB and p38 pathways: Involvement of NFκB-inducible kinase (NIK), free oxygen radicals, and selective inhibition by aspirin. *J Cell Physiol.* 2003 Jun;195(3):402–10.

65. Li Q, Engelhardt JF. Interleukin-1 β Induction of NF κ B Is Partially Regulated by H₂O₂-mediated Activation of NF κ B-inducing Kinase. *J Biol Chem.* 2006 Jan 20;281(3):1495–505.
66. Frötschl R, Chichmanov L, Kleeberg U, Hildebrandt AG, Roots I, Brockmöller J. Prediction of aryl hydrocarbon receptor-mediated enzyme induction of drugs and chemicals by mRNA quantification. *Chem Res Toxicol.* 1998 Dec;11(12):1447–52.
67. Amakura Y, Tsutsumi T, Nakamura M, Kitagawa H, Fujino J, Sasaki K, et al. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Some Vegetable Constituents Determined Using in Vitro Reporter Gene Assay. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(4):532–9.
68. Vogel CFA, Khan EM, Leung PSC, Gershwin ME, Chang WLW, Wu D, et al. Cross-talk between Aryl Hydrocarbon Receptor and the Inflammatory Response. *J Biol Chem.* 2014 Jan 17;289(3):1866–75.
69. Lou Y, Zheng J, Hu H, Lee J, Zeng S. Application of ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry to identify curcumin metabolites produced by human intestinal bacteria. *J Chromatogr B.* 2015 Mar 15;985:38–47.
70. Chiniforush N, Pourhajibagher M, Shahabi S, Bahador A. Clinical Approach of High Technology Techniques for Control and Elimination of Endodontic Microbiota. *J Lasers Med Sci.* 2015;6(4):139–50.
71. Dall'Acqua S, Stocchero M, Boschiero I, Schiavon M, Golob S, Uddin J, et al. New findings on the in vivo antioxidant activity of *Curcuma longa* extract by an integrated 1H NMR and HPLC–MS metabolomic approach. *Fitoterapia.* 2016 Mar;109:125–31.
72. Laborde CM, Mourino-Alvarez L, Posada-Ayala M, Alvarez-Llamas G, Serranillos-Reus MG, Moreu J, et al. Plasma metabolomics reveals a potential panel of biomarkers for early diagnosis in acute coronary syndrome. *Metabolomics.* 2014;10(3):414–24.
73. Zeng M, Xiao Y, Liang Y, Wang B, Chen X, Cao D, et al. Metabolic alterations of impaired fasting glucose by GC/MS based plasma metabolic profiling combined with chemometrics. *Metabolomics.* 2010 Jan 6;6(2):303–11.
74. Saad MJA, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology.* 2016 Jul 1;31(4):283–93.
75. Neis EPJG, Dejong CHC, Rensen SS. The Role of Microbial Amino Acid Metabolism in Host Metabolism. *Nutrients.* 2015 Apr 16;7(4):2930–46.
76. Bagul PK, Middela H, Matapally S, Padiya R, Bastia T, Madhusudana K, et al. Attenuation of insulin resistance, metabolic syndrome and hepatic oxidative stress by resveratrol in fructose-fed rats. *Pharmacol Res.* 2012 Sep;66(3):260–8.
77. Su Y, Ma L, Wen Y, Wang H, Zhang S. Studies of the in Vitro Antibacterial Activities of Several Polyphenols against Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules.* 2014 Aug 19;19(8):12630–9.

78. Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K. Bactericidal Activity of Curcumin I Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane. *PLoS ONE*. 2015 Mar 26;10(3):e0121313.
79. Burcelin R. Regulation of Metabolism: A Cross Talk Between Gut Microbiota and Its Human Host. *Physiology*. 2012 Oct 1;27(5):300–7.
80. Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, Alessi MC, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2008 May 1;87(5):1219–23.
81. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*. 2008 Jun 1;57(6):1470–81.
82. Ohnmacht C, Park J-H, Cording S, Wing JB, Atarashi K, Obata Y, et al. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ t+ T cells. *Science*. 2015 Aug 28;349(6251):989–93.
83. Farkas AM, Panea C, Goto Y, Nakato G, Galan-Diez M, Narushima S, et al. Induction of Th17 cells by segmented filamentous bacteria in the murine intestine. *J Immunol Methods*. 2015 Jun;421:104–11.
84. Atarashi K, Tanoue T, Ando M, Kamada N, Nagano Y, Narushima S, et al. Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell*. 2015 Oct 8;163(2):367–80.
85. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al. Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science*. 2011 Jan 21;331(6015):337–41.
86. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013 Dec 19;504(7480):446–50.
87. Tso S-C, Gui W-J, Wu C-Y, Chuang JL, Qi X, Skvorak KJ, et al. Benzothiophene Carboxylate Derivatives as Novel Allosteric Inhibitors of Branched-chain α -Ketoacid Dehydrogenase Kinase. *J Biol Chem*. 2014 Jul 25;289(30):20583–93.
88. Guo Y, Darshi M, Ma Y, Perkins GA, Shen Z, Haushalter KJ, et al. Quantitative Proteomic and Functional Analysis of Liver Mitochondria from High Fat Diet (HFD) Diabetic Mice. *Mol Cell Proteomics*. 2013 Dec 1;12(12):3744–58.
89. Krych Ł, Nielsen DS, Hansen AK, Hansen CHF. Gut microbial markers are associated with diabetes onset, regulatory imbalance, and IFN- γ level in NOD Mice. *Gut Microbes*. 2015 Mar 4;6(2):101–9.
90. Parkar SG, Stevenson DE, Skinner MA. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *Int J Food Microbiol*. 2008 Jun 10;124(3):295–8.

91. Tzounis X, Vulevic J, Kuhnle GGC, George T, Leonczak J, Gibson GR, et al. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *Br J Nutr.* 2008 Apr;99(04):782–92.
92. Selma MV, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health. *J Agric Food Chem.* 2009 Aug 12;57(15):6485–501.
93. Devkota S, Chang EB. Interactions between diet, bile acid metabolism, gut microbiota, and Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis Basel Switz.* 2015;33(3):351–6.
94. Hwang SR, Seo D-H, Al-Hilal TA, Jeon O-C, Kang JH, Kim S-H, et al. Orally active desulfated low molecular weight heparin and deoxycholic acid conjugate, 6ODS-LHbD, suppresses neovascularization and bone destruction in arthritis. *J Controlled Release.* 2012 Nov 10;163(3):374–84.
95. Walker A, Lucio M, Pfitzner B, Scheerer MF, Neschen S, de Angelis MH, et al. Importance of Sulfur-Containing Metabolites in Discriminating Fecal Extracts between Normal and Type-2 Diabetic Mice. *J Proteome Res.* 2014 Oct 3;13(10):4220–31.
96. Stenman LK, Waget A, Garret C, Briand F, Burcelin R, Sulpice T, et al. Probiotic B420 and prebiotic polydextrose improve efficacy of antidiabetic drugs in mice. *Diabetol Metab Syndr.* 2015 Sep 12;7:75.
97. Stenman L k, Waget A, Garret C, Klopp P, Burcelin R, Lahtinen S. Potential probiotic *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* 420 prevents weight gain and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Benef Microbes.* 2014 Jul 25;5(4):437–45.
98. Pomié C, Blasco-Baque V, Klopp P, Nicolas S, Waget A, Loubières P, et al. Triggering the adaptive immune system with commensal gut bacteria protects against insulin resistance and dysglycemia. *Mol Metab.* 2016 Mar 28;5(6):392–403.
99. Holmes E, Kinross J, Gibson GR, Burcelin R, Jia W, Pettersson S, et al. Therapeutic Modulation of Microbiota-Host Metabolic Interactions. *Sci Transl Med.* 2012 Jun 6;4(137):137rv6–137rv6.
100. ABE Y, HASHIMOTO S, HORIE T. Curcumin Inhibition Of Inflammatory Cytokine Production By Human Peripheral Blood Monocytes And Alveolar Macrophages. *Pharmacol Res.* 1999 Jan;39(1):41–7.
101. Guasch-Ferré M, Hruby A, Toledo E, Clish CB, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, et al. Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care.* 2016 May 1;39(5):833–46.
102. Zafar MI, Gao F. 4-Hydroxyisoleucine: A Potential New Treatment for Type 2 Diabetes Mellitus. *BioDrugs.* 2016 May 5;1–8.
103. Fuller S, Stephens JM. Diosgenin, 4-Hydroxyisoleucine, and Fiber from Fenugreek: Mechanisms of Actions and Potential Effects on Metabolic Syndrome. *Adv Nutr Int Rev J.* 2015 Mar 1;6(2):189–97.

104. Cani PD, Everard A, Duparc T. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Curr Opin Pharmacol*. 2013 Dec;13(6):935–40.
105. Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, Parker HE, Habib AM, Diakogiannaki E, et al. Short-Chain Fatty Acids Stimulate Glucagon-Like Peptide-1 Secretion via the G-Protein-Coupled Receptor FFAR2. *Diabetes*. 2012 Feb;61(2):364–71.

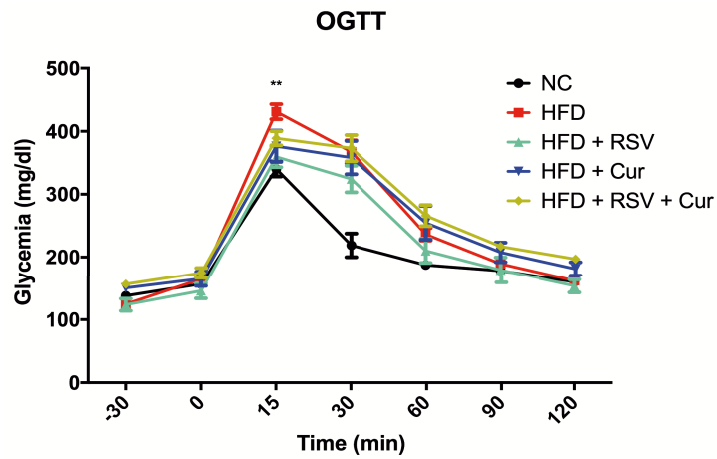


Figure 1. Glycemic profiles by oral test glucose tolerance (OGTT) for five weeks of diet: NC (n=7), HFD (n=8), HFD+RSV (n=8), HFD+Cur (n=8), HFD+RSV+Cur (n=8). Data are presented as mean \pm S.E.M; ** statistically different between HFD and HFD+RSV groups when $p < 0.01$ as analyzed by Two-way ANOVA followed by Tukey test.

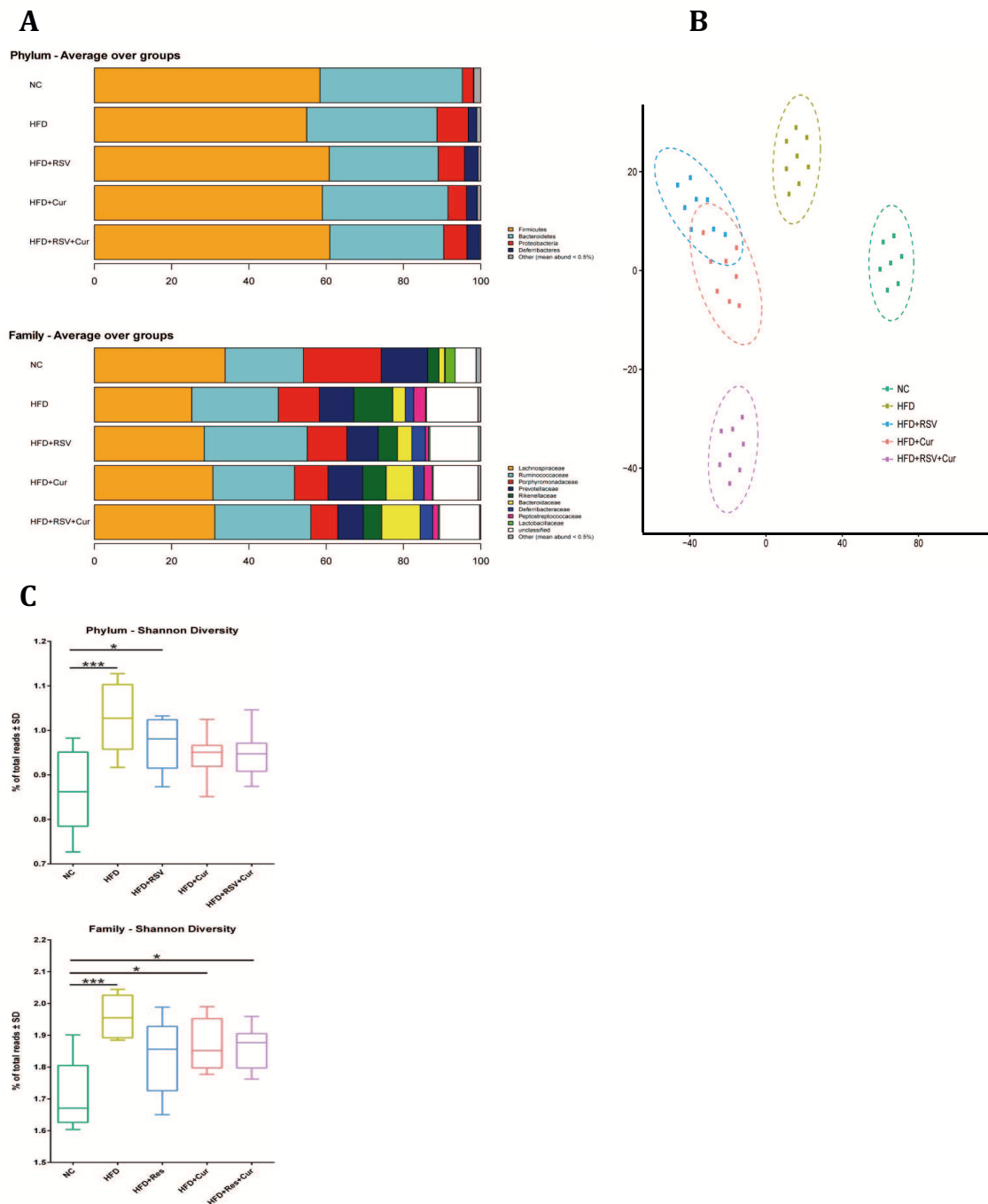


Figure 2. Relative abundance, diversity, and dimensional reduction plot of cecal content microbiomes. A) Stacked column bar graphs depicting the dietary group average relative abundances and distribution of the most highly abundant resolved taxa at the phylum and family level for this study. **B)** Dimensional reduction plot (t-distributed stochastic neighbor embedding, t-SNE) depicting the relationships between the microbiomes for each cecal content sample with respect to the five dietary groups. **C)** Plot of microbiome diversity (Shannon index) for each cecal content sample with respect to the five dietary groups.

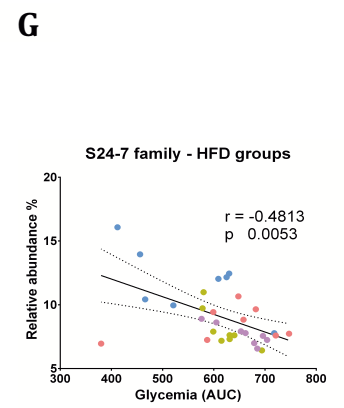
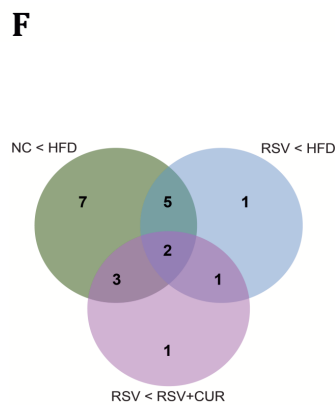
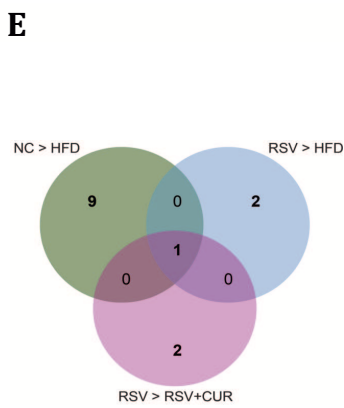
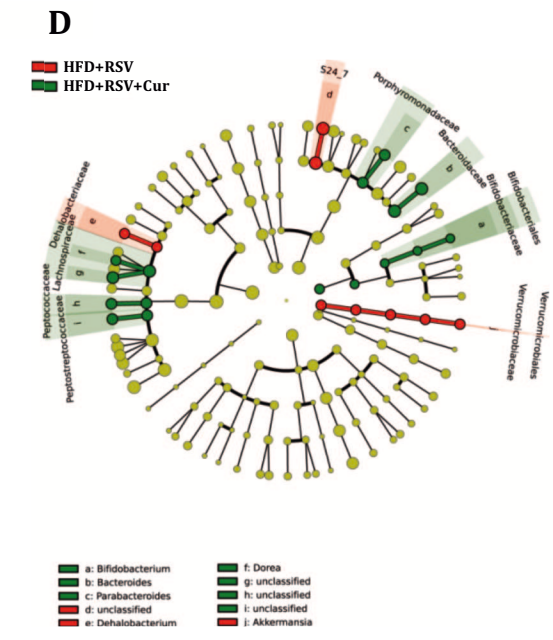
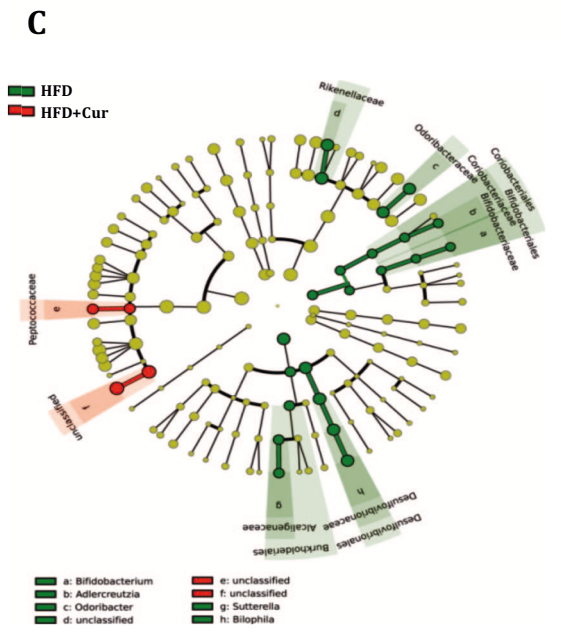
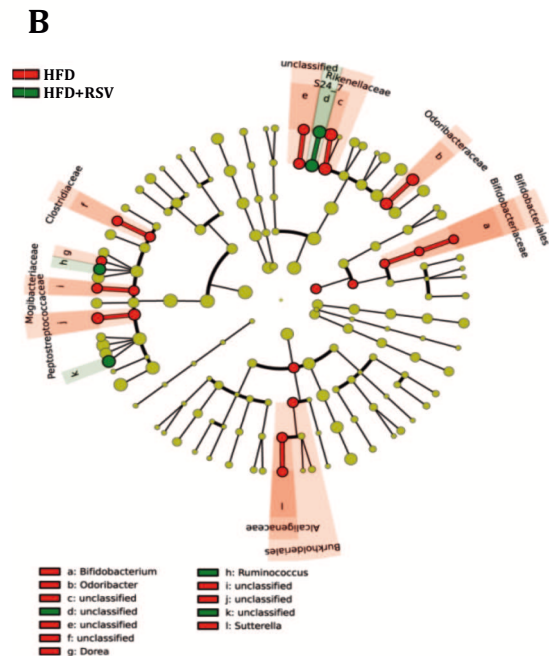
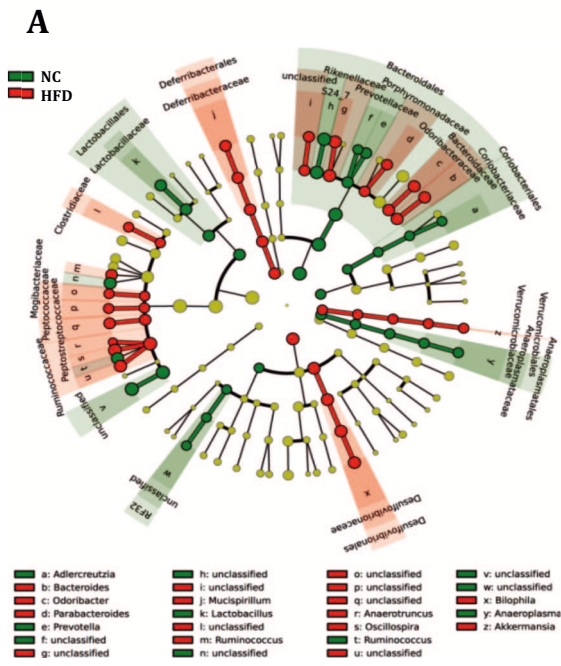


Figure 3.

- **Differential abundances of bacterial taxa in cecal contents.** Cladograms derived from pairwise group LEfSe analysis of 16S sequences from cecal contents after 5 weeks of diet: NC (n=7), HFD (n=8), HFD+RSV (n=8), HFD+Cur (n=8), HFD+RSV+Cur. **A)** NC vs. HFD, **B)** HFD vs. HFD+RSV, **C)** HFD vs. HFD+Cur, and **D)** HFD+RSV vs. HFD+RSV+Cur. The cladograms show the taxonomic levels represented by rings with phyla at the innermost ring and genera at the outermost ring, and each circle is a member within that level. Taxa at each level are shaded (red or green) according to the dietary group in which it is more abundant ($P < 0.05$; LDA score 2.0).

- **Microbiome enrichment common between groups.** Commonality of microbiome enrichment results positively and negatively associated with glycemic index by group. The taxonomic groups were identified from pairwise group LEfSe analysis of 16S targeted metagenomic sequencing data derived from cecal contents after 5 weeks of diet. **E)** Venn diagram of taxonomic groups enhanced by NC or HFD+RSV diets in comparison to HFD or HFD+RSV+Cur diets (HFD+Cur modules excluded), **F)** taxonomic groups enhanced by HFD or HFD+RSV+Cur diets in comparison to NC or HFD+RSV diets, and **G)** regression analysis for the S24-7 family (Bacteroidales order) which demonstrates a strong negative correlation with glycemia area under curve (AUC).

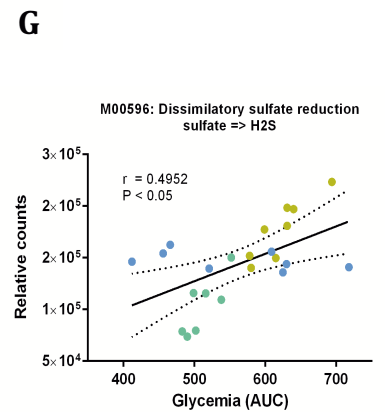
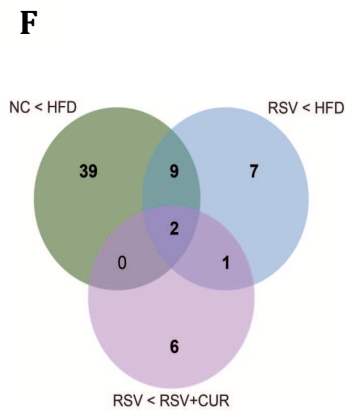
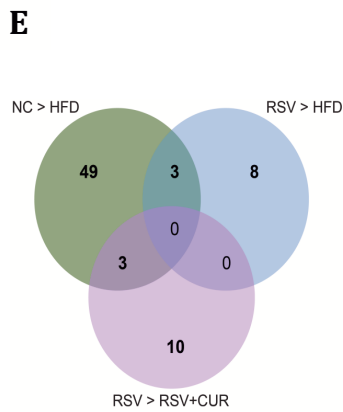
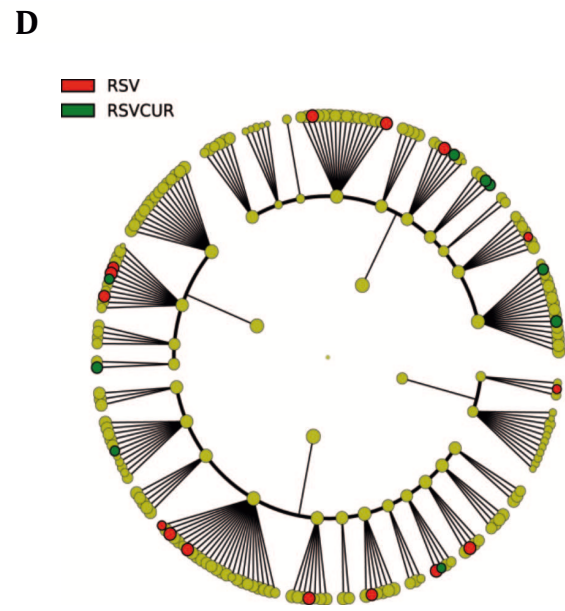
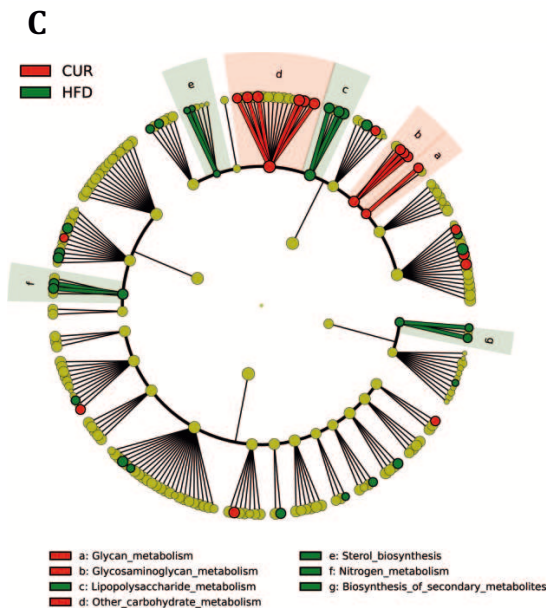
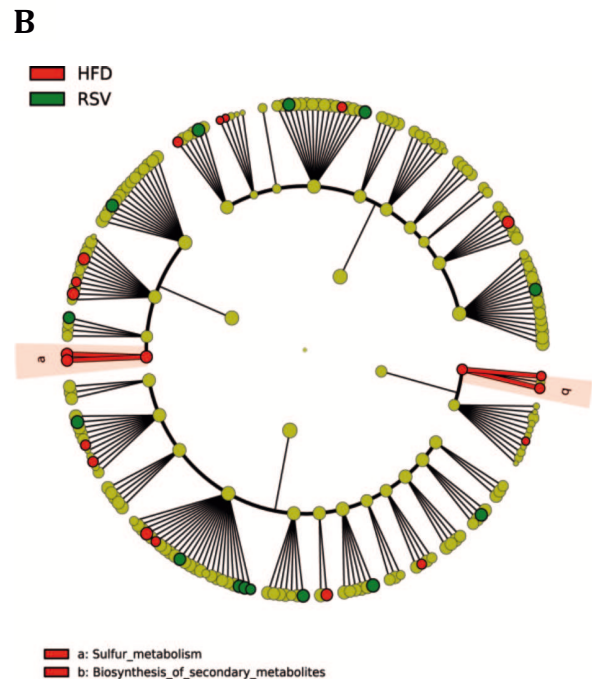
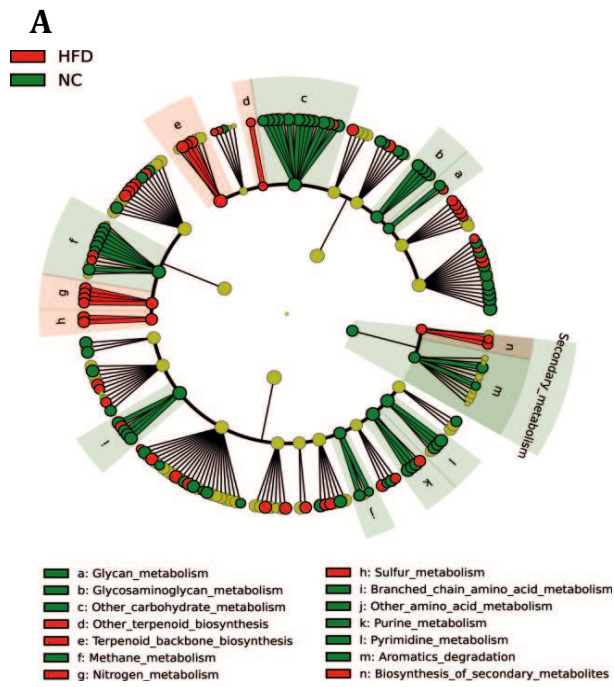
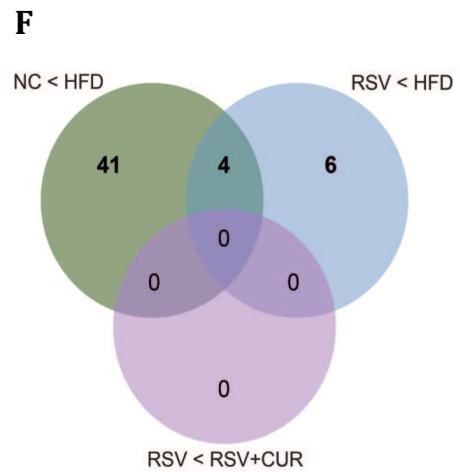
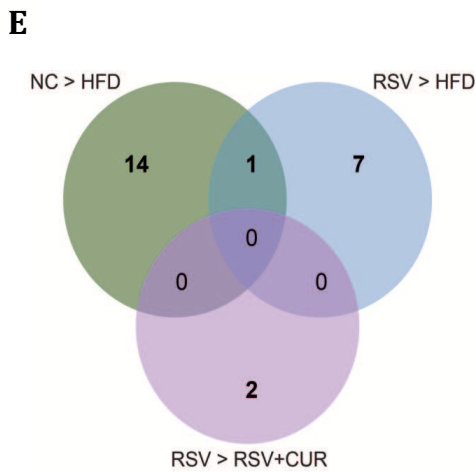
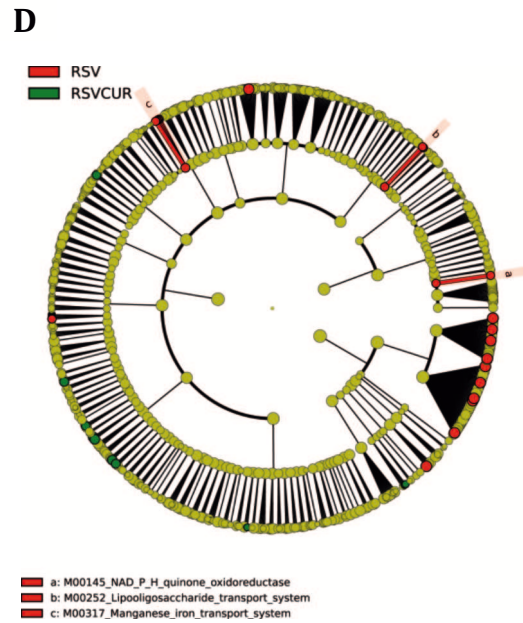
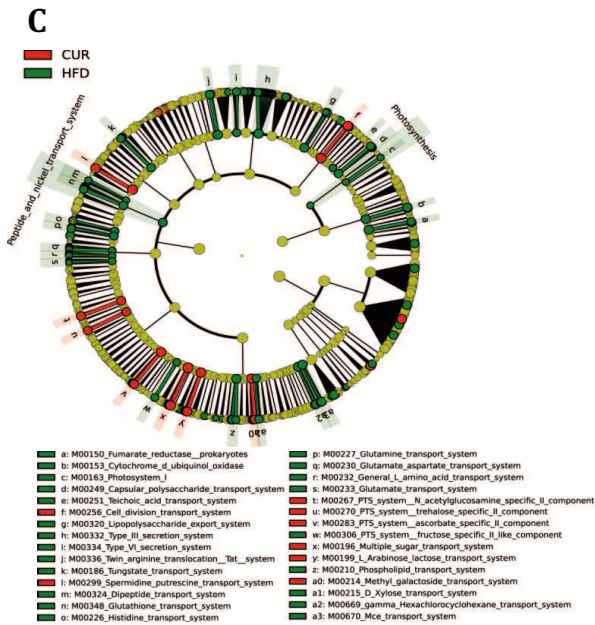
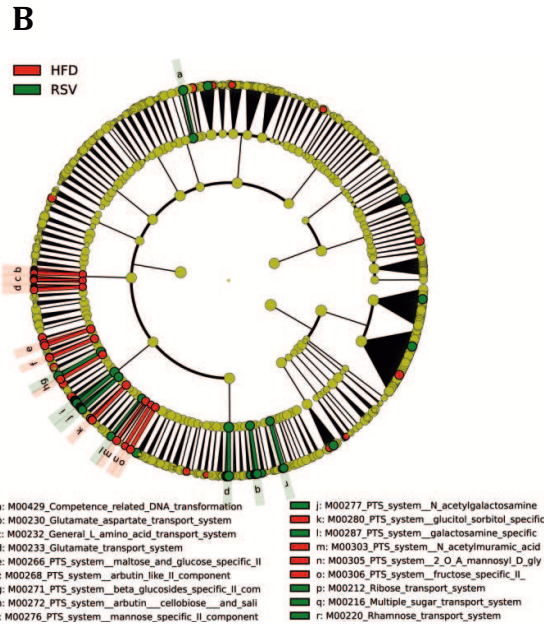
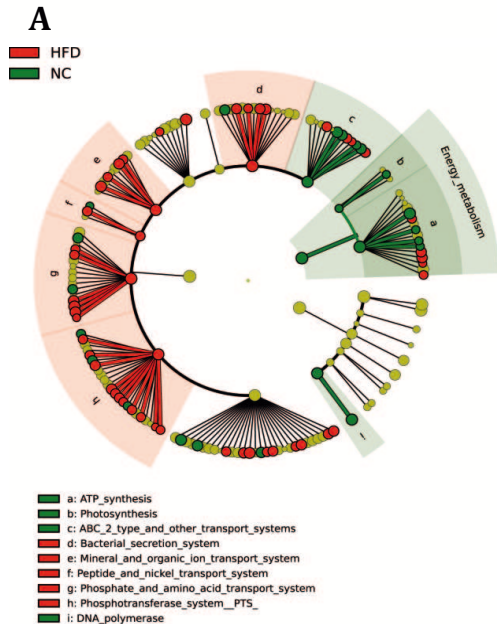


Figure 4.

- **Predicted gene enrichment of pathways.** Cladograms derived from pairwise group LEfSe analysis of PICRUSt data derived from sequencing of cecal contents after 5 weeks of diet: NC (n=7), HFD (n=8), HFD+RSV (n=8), HFD+Cur (n=8), HFD+RSV+Cur. **A)** NC vs. HFD, **B)** HFD vs. HFD+RSV, **C)** HFD vs. HFD+Cur, and **D)** HFD+RSV vs. HFD+RSV+Cur. The cladograms show the pathway hierarchy represented by rings with pathway modules at outermost ring. Pathway hierarchies at each level are shaded (red or green) according to the dietary group in which the PICRUSt analysis predicted higher gene abundance ($P < 0.05$; LDA score 2.0).

- **Pathway enrichment common between groups.** Commonality of KEGG pathway module enrichment results positively and negatively associated with glycemic index by group. The pathway modules were predicted from pairwise group LEfSe analysis of PICRUSt data derived from sequencing of cecal contents after 5 weeks of diet. **E)** Venn diagram of KEGG pathway modules enhanced by NC or HFD+RSV diets in comparison to HFD or HFD+RSV+Cur diets (HFD+Cur modules excluded), **F)** KEGG pathway modules enhanced by HFD or HFD+RSV+Cur diets in comparison to NC or HFD+RSV diets, and **G)** regression analysis for dissimilatory sulfate reduction module.



G

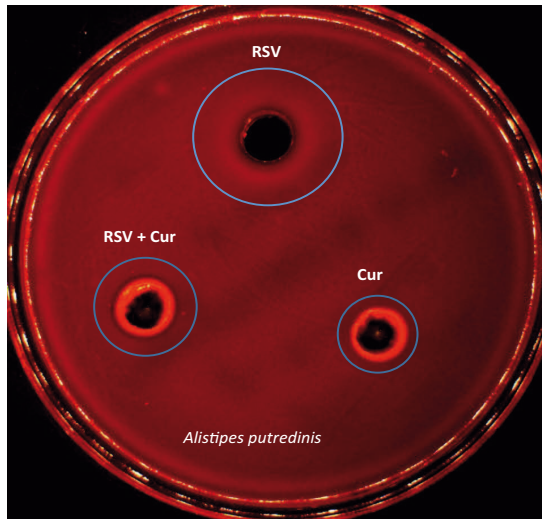
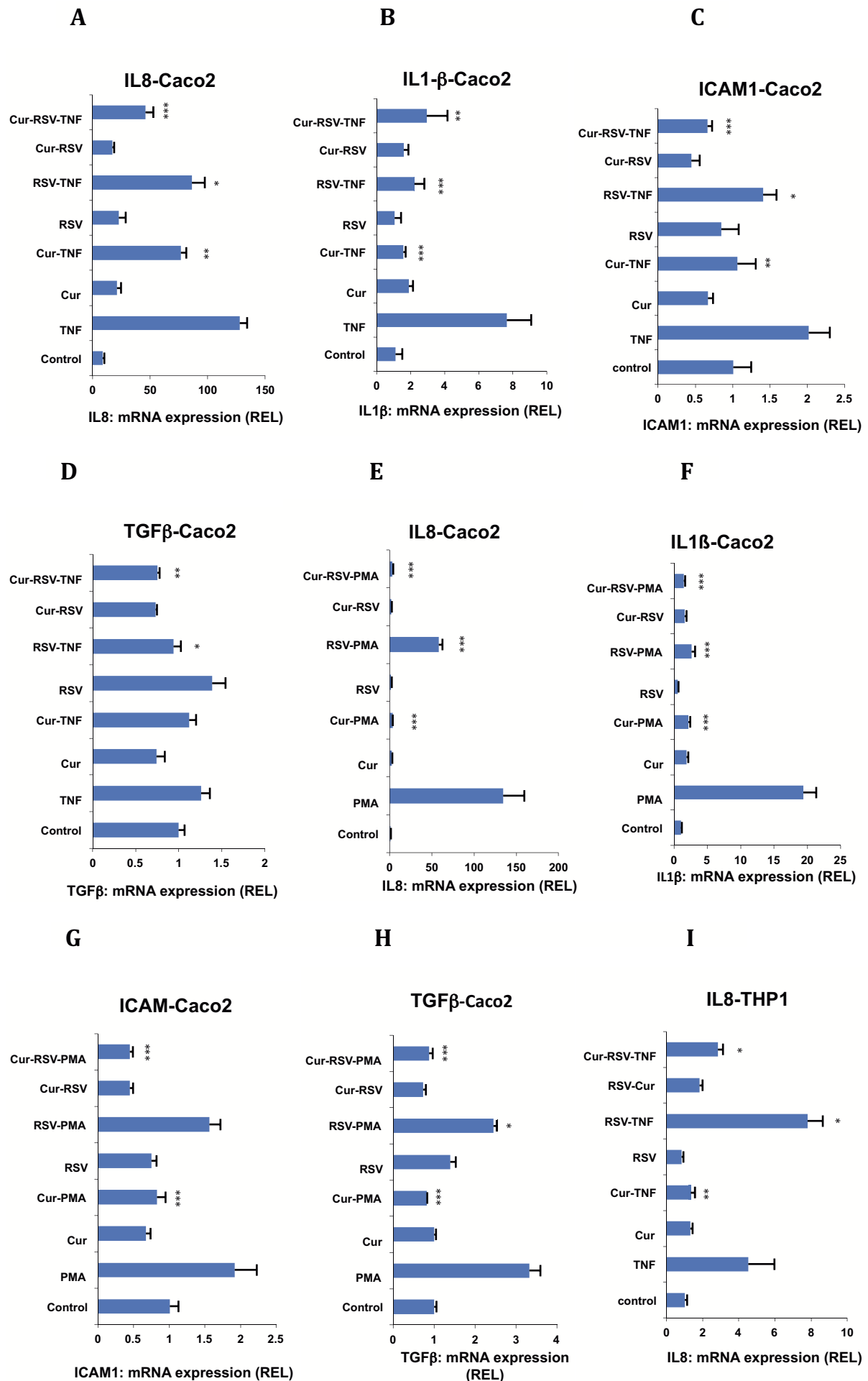


Figure 5.

- **Predicted gene enrichment of structural complexes.** Cladograms derived from pairwise group LEfSe analysis of PICRUSt data derived from sequencing of cecal contents after 5 weeks of diet: NC (n=7), HFD (n=8), HFD+RSV (n=8), HFD+Cur (n=8), HFD+RSV+Cur. **A)** NC vs. HFD, **B)** HFD vs. HFD+RSV, **C)** HFD vs. HFD+Cur, and **D)** HFD+RSV vs. HFD+RSV+Cur. The cladograms show the structural complex hierarchy represented by rings with modules at outermost ring. Structural complex hierarchies at each level are shaded (red or green) according to the dietary group in which the PICRUSt analysis predicted higher gene abundance ($P < 0.05$; LDA score 2.0).

- **Structural complex enrichment common between groups.** Commonality of KEGG structural complex module enrichment results positively and negatively associated with glycemic index by group. The structural complex modules were predicted from pairwise group LEfSe analysis of PICRUSt data derived from sequencing of cecal contents after 5 weeks of diet. **E)** Venn diagram of KEGG structural complex modules enhanced by NC or HFD+RSV diets in comparison to HFD or HFD+RSV+Cur diets (HFD+Cur modules excluded), and **F)** KEGG structural complex modules enhanced by HFD or HFD+RSV+Cur diets in comparison to NC or HFD+RSV diets.

- **G)** Antibiotic effect of RSV, Cur and RSV+Cur on *Alistipes putredinis*. 100 μ M RSV, 100 μ M Cur and 100 μ M RSV + 100 μ M Cur were used in this susceptibility test.



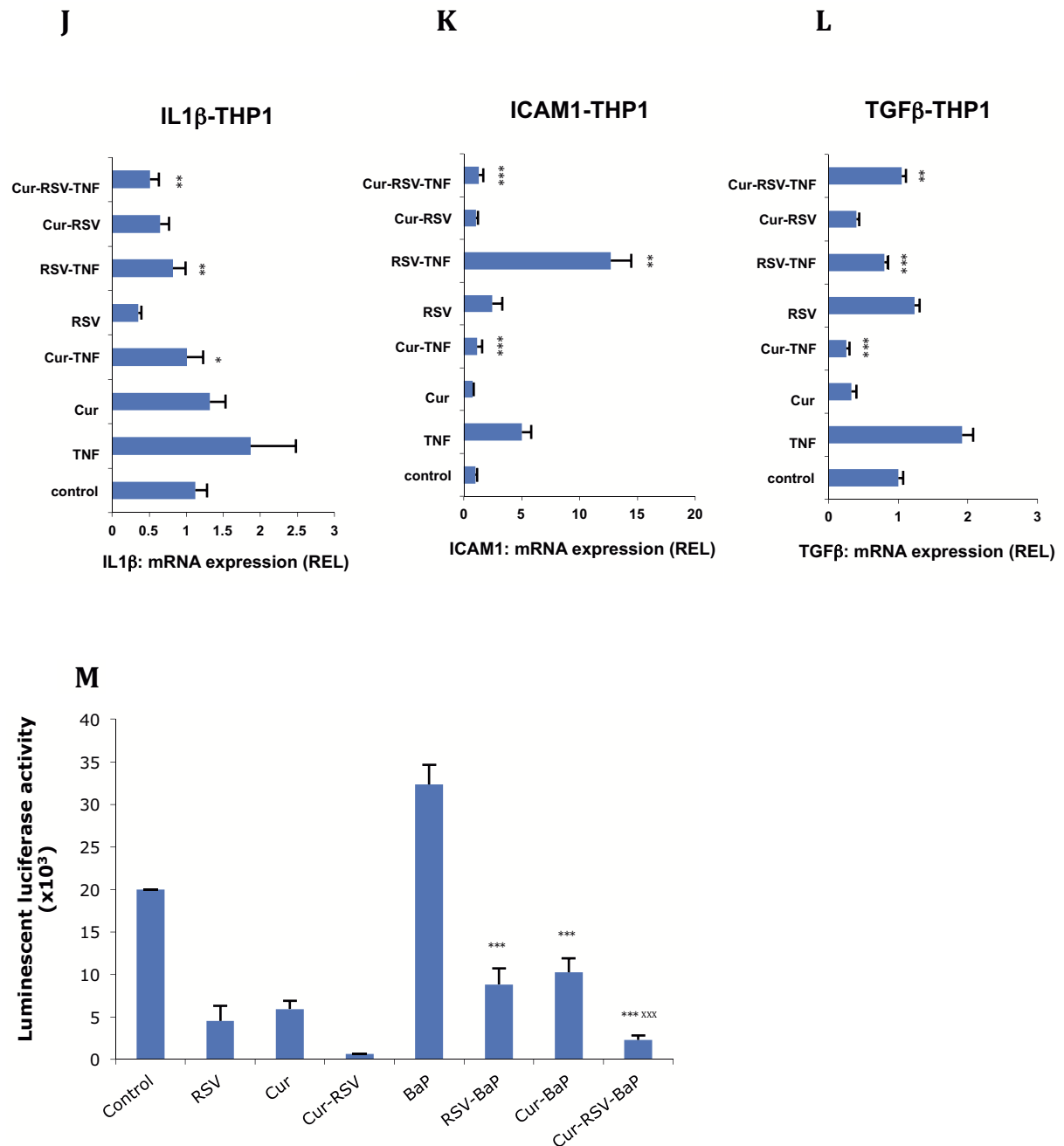
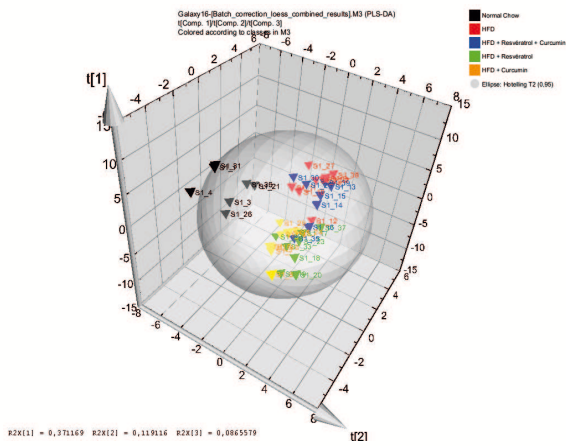


Figure 6.

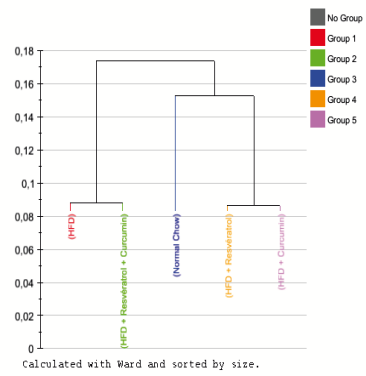
- **Effect of RSV, Cur, RSV+Cur on genes expression of different inflammatory markers on Caco2 and THP1 cells.** Caco2 cells were stimulated either with TNF α (A-D) or with PMA (E-H). THP1 cells were stimulated by PMA (I-L). The relative expression level (REL) of IL8 mRNA levels (A,E,I); IL1 β mRNA levels (B,F,J); ICAM1 mRNA levels (C,G,K); and TGF β mRNA levels (D,H,L) were evaluated. Data are presented as mean \pm S.E.M; *, **, and *** statistically different between positive control groups (TNF α or PMA) and treatment groups when $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively, as analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey test.

- L) Effect of RSV, Cur, and RSV+Cur on AhR promoter activation, Caco-2 cells were transfected by XRE-TK-LUC and treated with 2 μ M BaP +/- 20 μ M RSV +/- 10 μ M Cur. Control : cells treated with solvent. Data are presented as mean \pm S.E.M; *** : BaP vs Polyphenol group, ^{xxx} : BaP-RSV/BaP-Cur vs BaP-RSV-Cur, statistically different when $p < 0.001$, as analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey test.

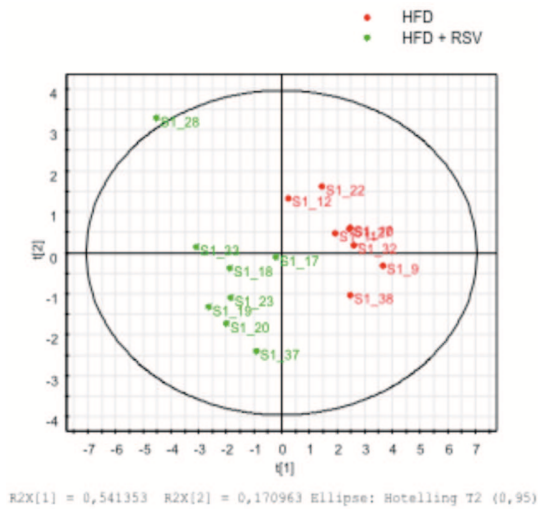
A



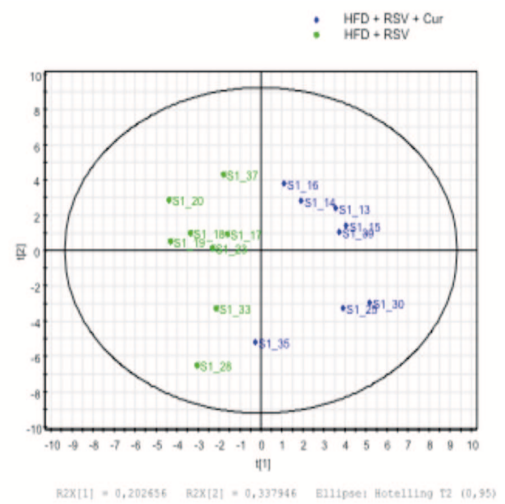
B



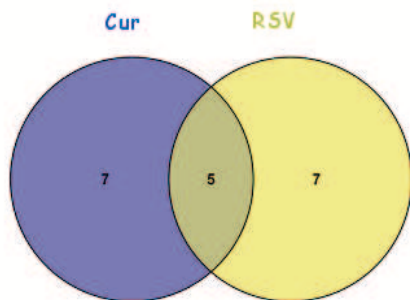
C



D



E



urea (up in C)
 proline (down in C)
 tri-hydroxy-butiric acid (down in C)
 glucuronic acid (up in C)
 cholesterol (down in C)

acetic acid (up in R and C)
 butanoic acid (up in R and C)
 serine (down in R and C)
 gluconic or butanedioc acid (down in R and C)

isoleucine (up in R)
 glucose (down in R)
 glucitol (down in R)
 glucose (down in R)

Figure 7.

- **Characterization of plasma metabolic changes induced by HFD alone (red) or supplement with RSV (green), Cur (yellow) or RSV+Cur (blue) comparing to NC (black).** **A)** Tri-dimensional PLS-DA score plot showing group discrimination according to dietary treatment. **B)** Clustering analysis of summarized metabolome score for each dietary with degree of dissimilarity,
- **Characterization of plasma metabolic changes induced by HFD supplemented with RSV comparing to HFD alone or HFD+RSV+Cur.** **C)** Di-dimensional PLS-DA score plot showing the discrimination between HFD supplemented RSV (green) and HFD (red). **D)** Di-dimensional PLS-DA score plot showing the discrimination between HFD supplemented RSV (green) and HFD+RSV+Cur (blue).
- **E) Venn plot showing the shift metabolites of polyphenol supplemented comparing with HFD.** 5 of 7 metabolites from mice group treated with RSV were identified (**Right side**); 3 of 7 metabolites from mice group treated with Cur were identified (**Left side**); and 4 of 5 common metabolites from mice group treated with Cur and from mice group treated with RSV were identified (**in the middle**).

Table 1. Gene expression levels of inflammatory markers in colon.

| | NC | HFD | HFD-RSV | HFD-Cur | HFD-RSV-Cur |
|--------------|-----------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| IL1 β | 0.92 \pm 0.13 | 1.60 \pm 0.20 ⁺ | 1.02 \pm 0.10 | 1.03 \pm 0.13 | 1.23 \pm 0.18 |
| IL6 | 2.49 \pm 0.36 | 2.44 \pm 0.27 | 1.01 \pm 0.12** | 2.57 \pm 0.23 | 1.65 \pm 0.27 |
| TNF α | 0.98 \pm 0.13 | 1.06 \pm 0.12 | 1.24 \pm 0.15 | 1.48 \pm 0.15 | 0.89 \pm 0.09 |
| IL10 | 0.98 \pm 0.12 | 1.28 \pm 0.17 | 1.04 \pm 0.15 | 1.26 \pm 0.21 | 1.36 \pm 0.19 |
| TGF β | 1.01 \pm 0.21 | 1.29 \pm 0.18 | 1.37 \pm 0.14 | 1.11 \pm 0.17 | 1.31 \pm 0.15 |
| ICAM1 | 0.93 \pm 0.02 | 1.10 \pm 0.03 | 1.07 \pm 0.12 | 1.05 \pm 0.05 | 1.01 \pm 0.09 |
| F4/80 | 0.97 \pm 0.09 | 1.56 \pm 0.11 ⁺⁺ | 1.08 \pm 0.12* | 0.94 \pm 0.14** | 1.00 \pm 0.12* |
| CD36 | 0.89 \pm 0.11 | 1.54 \pm 0.28 | 1.35 \pm 0.22 | 1.15 \pm 0.14 | 1.20 \pm 0.18 |
| MMP7 | 0.45 \pm 0.10 | 1.79 \pm 0.29 ⁺ | 1.41 \pm 0.28 | 1.68 \pm 0.35 | 2.23 \pm 0.51** |
| MMP9 | 0.96 \pm 0.13 | 1.10 \pm 0.18 | 1.19 \pm 0.13 | 1.09 \pm 0.14 | 1.35 \pm 0.16 |
| MMP13 | 1.95 \pm 0.42 | 1.55 \pm 0.28 | 2.23 \pm 0.43 | 1.21 \pm 0.31 | 1.44 \pm 0.31 |

Mice were fed for five weeks of diet: NC (n=7), HFD (n=8), HFD+RSV (n=8), HFD+Cur (n=8), HFD+RSV+Cur (n=8). Data are presented as mean \pm S.E.M; + and ++: HFD vs NC; * and **: HFD vs Polyphenol groups, statistically different when p<0.05 (+) or (*) and p<0.01 (++) or (***) respectively, as analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey test.

Supplementary Data

Figure 1: zymogramme of RSV effect on MMP9 activity

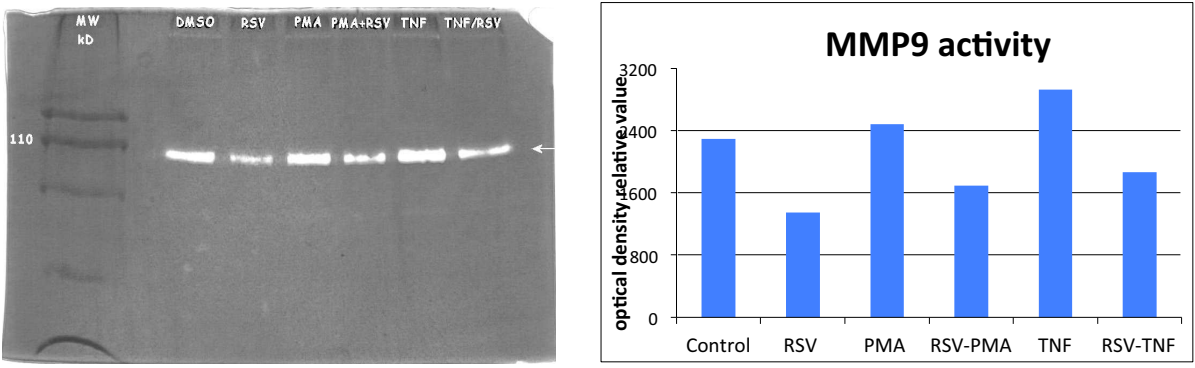


Figure 2: zymogramme of Cur effect on MMP9 activity

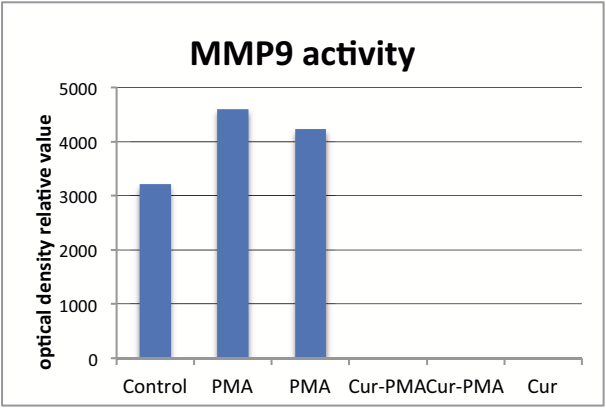


Figure 3: RSV and Cur effect on ROS production

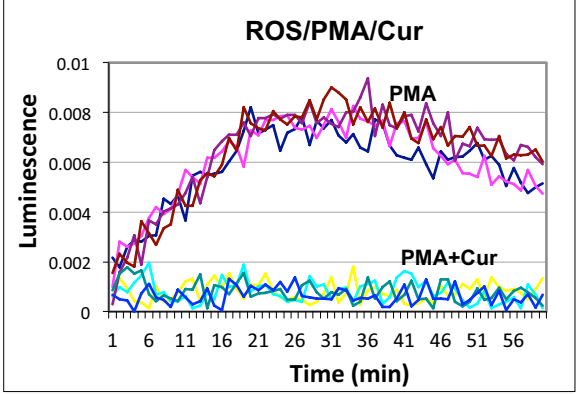
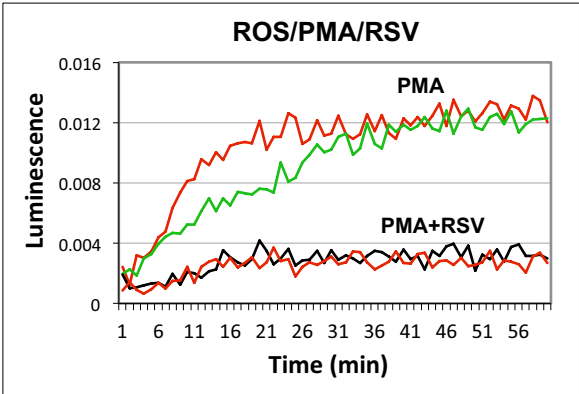


Table 1. Primers Used.

| Genes | Forward sequence (5'-3') | Reverse sequence (5'-3') | Probe UPL |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------|
| Mice | | | |
| β 2-actin | 5'-ACACCCGCCACCAGTTC-3' | 5'-TACAGCCCCGGGAGCAT-3' | |
| IL1 β | 5'-CAAAAGATGAAGGGCTGCTT-3' | 5'-GAAGCTGGATGCTCTCATCA-3' | |
| IL6 | 5'-ACGGCCTTCCCTACTTCAC-3' | 5'-ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT-3' | |
| TNF α | 5'-GGGACAGTGACCTGGACTGT-3' | 5'-TTCGAAAGCCATTTGAGT-3' | |
| IL10 | 5'-CACAAAGCAGCCTTGCAGAA-3' | 5'-GAGCAGGCAGCATAGCAGTG-3' | |
| TGF β | 5'-CTATGCTAAAGAGGTCACCCG-3' | 5'-ACTGCTTCCCGAATGTCTG-3' | |
| ICAM1 | 5'-TGCCTCTGAAGCTCGGATATAC-3' | 5'-TCTGTCGAACTCCTCAGTCAC-3' | |
| F4/80 | 5'-TGACAACCAGACGGCTTGTG-3' | 5'-GCAGGCGAGGAAAAGATAGTGT-3' | |
| CD36 | 5'-GTAAACAAAGAGGTCCTTACACA-3' | 5'-CAGTGAAGGCTCAAAGATGGC-3' | |
| MMP7 | 5'-CACATCAGTGGGAACAGGC-3' | 5'-GCATTTCTTGAGGTTGTCC-3' | |
| MMP9 | 5'-CTGGACAGCCAGACACTA-3' | 5'-CTCGCGCAAGTCTTCAGAG-3' | |
| MMP13 | 5'-CTTCTTCTGTTGAGCTGGACTC-3' | 5'-CTGTGGAGGTCACTGTAGACT-3' | |
| Human | | | |
| β 2-hemoglobin | 5'-TTCTGGCCTGGAGGCTATC-3' | 5'-TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC-3' | 42 |
| IL1 β | 5'-AACAGGCTGCTCTGGGATT-3' | 5'-TGGCTGCTTCAGACACTTGA-3' | 41 |
| IL8 | 5'-AGACAGCAGAGCACACAAGC-3' | 5'-ATGGTTCCTTCCGGTGGT3' | 72 |
| ICAM1 | 5'-CCTTCCTCACCGTGTACTGG-3' | 5'-AGCGTAGGGTAAGGTTCTTGC-3' | 71 |
| TGF β | 5'-ACTACTACGCCAAGGAGGTCAC-3' | 5'-TGCTTGAACCTGTCATAGATTTTCG-3' | 31 |

Table 2: Taxonomic differences between groups.

| Phylum | Class | Order | Family | Genus | Species | NC > HFD | RSV > HFD | RSV > RSV+Cur | |
|-----------------|---------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|-----------------|--------------|---------------|---|
| Actinobacteria | Actinobacteria | Bifidobacteriales | Bifidobacteriaceae | Bifidobacterium | animalis | • | | | |
| | Coriobacteriia | Coriobacteriales | Coriobacteriaceae | Adlercreutzia | unclassified | • | | | |
| Bacteroidetes | Bacteroidia | Bacteroidales | S24_7 | unclassified | unclassified | • | • | • | |
| | | | Prevotellaceae | Prevotella | unclassified | • | | | |
| Firmicutes | Bacilli | Lactobacillales | Lactobacillaceae | Lactobacillus | unclassified | • | | | |
| | | | Clostridia | Clostridiales | Dehalobacteriaceae | Dehalobacterium | unclassified | | • |
| | | | Lachnospiraceae | Ruminococcus | gnavus | | • | | |
| | | | | unclassified | unclassified | • | | | |
| | | | Ruminococcaceae | Ruminococcus | unclassified | • | | | |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | RF32 | unclassified | unclassified | unclassified | • | | | |
| Tenericutes | Mollicutes | Anaeroplasmatales | Anaeroplasmataceae | Anaeroplasma | unclassified | • | | | |
| Verrucomicrobia | Verrucomicrobiae | Verrucomicrobiales | Verrucomicrobiaceae | Akkermansia | muciniphila | | | • | |
| Phylum | Class | Order | Family | Genus | Species | NC < HFD | RSV < HFD | RSV < RSV+Cur | |
| Actinobacteria | Actinobacteria | Bifidobacteriales | Bifidobacteriaceae | Bifidobacterium | pseudolongum | • | • | • | |
| Bacteroidetes | Bacteroidia | Bacteroidales | Bacteroidaceae | Bacteroides | unclassified | • | | • | |
| | | | Odoribacteraceae | Odoribacter | unclassified | • | • | | |
| | | | Porphyromonadaceae | Parabacteroides | unclassified | • | | • | |
| | | | Rikenellaceae | unclassified | unclassified | • | • | | |
| | | | unclassified | unclassified | unclassified | • | • | | |
| Deferribacteres | Deferribacteres | Deferribacterales | Deferribacteraceae | Mucispirillum | schaedleri | • | | | |
| Firmicutes | Clostridia | Clostridiales | Clostridiaceae | unclassified | unclassified | • | • | | |
| | | | Lachnospiraceae | Dorea | unclassified | | • | • | |
| | | | | Ruminococcus | gnavus | • | | | |
| | | | | unclassified | unclassified | | | • | |
| | | | | Mogibacteriaceae | unclassified | unclassified | • | • | |
| | | | | Peptococcaceae | unclassified | unclassified | • | | • |
| | | | | Peptostreptococcaceae | unclassified | unclassified | • | • | • |
| | | | | Ruminococcaceae | Anaerotruncus | unclassified | • | | |
| | | | | | Oscillospira | unclassified | • | | |
| | | | | | unclassified | unclassified | • | | |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria | Burkholderiales | Alcaligenaceae | Sutterella | unclassified | | • | | |
| | Deltaproteobacteria | Desulfovibrionales | Desulfovibrionaceae | Bilophila | unclassified | • | | | |
| Verrucomicrobia | Verrucomicrobiae | Verrucomicrobiales | Verrucomicrobiaceae | Akkermansia | muciniphila | • | | | |

Table 3: Predicted metabolic pathway differences between groups

| Pathway - Level 1 | Pathway - Level 2 | Pathway Module | NC > HFD | RSV > HFD | RSV > RSV+Cur |
|--|---|---|----------|-----------|---------------|
| Energy_metabolism | Methane_metabolism | M00356_Methanogenesis,_methanol_=>_methane | • | | • |
| Energy_metabolism | Methane_metabolism | M00357_Methanogenesis,_acetate_=>_methane | • | | • |
| Nucleotide_and_ami no_acid_metabolism | Aromatic_amino_acid_ metabolism | M00023_Tryptophan_biosynthesis,_chorismate_=>_tryp tophan | • | • | |
| Nucleotide_and_ami no_acid_metabolism | Cofactor_and_vitamin_ biosynthesis | M00622_Nicotinate_degradation,_nicotinate_=>_fumar ate | • | • | |
| Nucleotide_and_ami no_acid_metabolism | Purine_metabolism | M00049_Adenine_ribonucleotide_biosynthesis,_IMP_=> _ADP,ATP | • | | • |
| Nucleotide_and_ami no_acid_metabolism | Pyrimidine_metabolism | M00052_Pyrimidine_ribonucleotide_biosynthesis,_UMP _=>_UDP_UTP,CDP_CTP | • | • | |
| Pathway - Level 1 | Pathway - Level 2 | Pathway Module | NC < HFD | RSV < HFD | RSV < RSV+Cur |
| Carbohydrate_and_li pid_metabolism | Fatty_acid_metabolism | M00086_beta-Oxidation,_acyl-CoA_synthesis | • | • | |
| Carbohydrate_and_li pid_metabolism | Sterol_biosynthesis | M00107_Steroid_hormone_biosynthesis,_cholesterol_ =>_prognenolone_=>_progesterone | • | • | |
| Carbohydrate_and_li pid_metabolism | Sterol_biosynthesis | M00110_C19_C18- Steroid_hormone_biosynthesis,_pregnenolone_=>_andr ostenedione_=>_estrone | • | • | |
| Energy_metabolism | Methane_metabolism | M00422_Acetyl-CoA_pathway,_CO2_=>_acetyl-CoA | • | • | |
| Energy_metabolism | Sulfur_metabolism | M00176_Assimilatory_sulfate_reduction,_sulfate_=>_H2 S | • | • | |
| Energy_metabolism | Sulfur_metabolism | M00596_Dissimilatory_sulfate_reduction,_sulfate_=>_H 2S | • | • | • |
| Nucleotide_and_ami no_acid_metabolism | Aromatic_amino_acid_ metabolism | M00040_Tyrosine_biosynthesis,_prephanate_=>_pretyr osine_=>_tyrosine | • | • | • |
| Nucleotide_and_ami no_acid_metabolism | Aromatic_amino_acid_ metabolism | M00350_Capsaicin_biosynthesis,_L- Phenylalanine_=>_Capsaicin | • | • | |
| Nucleotide_and_ami no_acid_metabolism | Cofactor_and_vitamin_ biosynthesis | M00116_Menaquinone_biosynthesis,_chorismate_=>_m enaquinone | • | • | |
| Nucleotide_and_ami no_acid_metabolism | Histidine_metabolism | M00045_Histidine_degradation,_histidine_=>_N- formiminoglutamate_=>_glutamate | • | • | |
| Nucleotide_and_ami no_acid_metabolism | Polyamine_biosynthesis | M00134_Polyamine_biosynthesis,_arginine_=>_ornithi ne_=>_putrescine | | • | • |
| Secondary_metabolis m | Biosynthesis_of_second ary_metabolites | M00039_Monolignol_biosynthesis,_phenylalanine__tyro sine_=>_monolignol | • | • | |

Table 4: Predicted structural complex enrichment

| Pathway - Level 1 | Pathway - Level 2 | Pathway Module | NC > HFD | RSV > HFD | RSV > RSV+Cur |
|--------------------------------------|---------------------------------|---|----------|-----------|---------------|
| Environmental_information_processing | Bacterial_secretion_system | M00429_Compentence_related_DNA_transformation_transporter | • | • | |
| | | | | | |
| Pathway - Level 1 | Pathway - Level 2 | Pathway Module | NC < HFD | RSV < HFD | RSV < RSV+Cur |
| Environmental_information_processing | Phosphotransferase_system__PTS_ | M00266_PTS_system__maltose_and__glucose_specific_II_component | • | • | |
| Environmental_information_processing | Phosphotransferase_system__PTS_ | M00280_PTS_system__glucitol_sorbitol_specific_II_component | • | • | |
| Environmental_information_processing | Phosphotransferase_system__PTS_ | M00305_PTS_system__2_O_A_mannosyl_D_glycerate_specific_II_component | • | • | |
| Environmental_information_processing | Phosphotransferase_system__PTS_ | M00306_PTS_system__fructose_specific_II_like_component | • | • | |

Table 5. Confusion matrix.

| | Members | Correct | NC | HFD | HFD + RSV+ Cur | HFD + RSV | HFD + Cur | No class (YPred < 0) |
|-----------------|----------|---------|----|-----|----------------|-----------|-----------|----------------------|
| NC | 7 | 100% | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HFD | 8 | 87.5% | 0 | 7 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| HFD + RSV + Cur | 8 | 12.5% | 0 | 5 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| HFD + RSV | 8 | 87.5% | 0 | 0 | 0 | 7 | 1 | 0 |
| HFD + Cur | 8 | 62.5% | 0 | 0 | 0 | 3 | 5 | 0 |
| No class | 8 | | 2 | 2 | 1 | 3 | 0 | 0 |
| Total | 47 | 69.23% | 9 | 14 | 2 | 16 | 6 | 0 |
| Fishers prob. | 7.7e-012 | | | | | | | |

NC: Normal Chow, HFD: High Fat diet, RSV: Resveratrol, Cur: Curcumin, Fisher prob.: Fisher probability test.

Table 6. Overfitting assessment by permutation test.

| | R2Y | Q2Y |
|--------------------|------------|------------|
| NC | 0.173502 | -0.31554 |
| HFD | 0.191104 | -0.212949 |
| HFD+RSV+Cur | 0.218409 | -0.185283 |
| HFD+RSV | 0.206613 | -0.245007 |
| HFD+Cur | 0.253312 | -0.201189 |

R2Y: observed group variance; Q2Y: predicted group variance.

II. Les résultats supplémentaires

1. Résultats des cytochromes

Les cytochromes P450 (Cyps) sont surtout connus pour leur activité dans le métabolisme de certains médicaments. Cependant leur rôle endogène sur le métabolisme général de l'organisme est largement inconnu. De nombreuses études ont montré l'implication de différents Cyps dans le métabolisme lipidique, en particulier dans ce qu'on appelle le phénomène de détoxification par les Cyps. De ce fait, nous avons fait l'hypothèse selon laquelle un régime riche en graisses pourrait modifier l'expression de certains Cyps chez la souris. D'après la bibliographie et les données de la phylogénie, plusieurs Cyps susceptibles de participer au métabolisme des AGs ont été choisis en vue d'étudier leur régulation par le RSV, la Cur et la combinaison de ces deux polyphénols. Le foie et les différentes parties de l'intestin ont été examinés afin de détecter la présence et/ou la modification de l'expression de ces Cyps.

1.1. Expression des Cyps dans l'intestin

○ Le Colon

La présence de divers Cyps a été recherchée dans le colon des souris traitées ou non avec les polyphénols en utilisant la PCR (polymerase chain reaction) classique et/ou la PCR quantitative. L'expression des Cyp2b9, 2c50, et 2c54 n'est pas détectable par la PCR classique. Le Cyp1a1 est exprimé mais en faible quantité. Les Cyp2c55, 2u1 et 2e1 sont bien exprimés et le Cyp2c55 s'avère le plus représenté (Figure 22). Quels que soient les traitements aucune modification de leur expression n'a été trouvée.

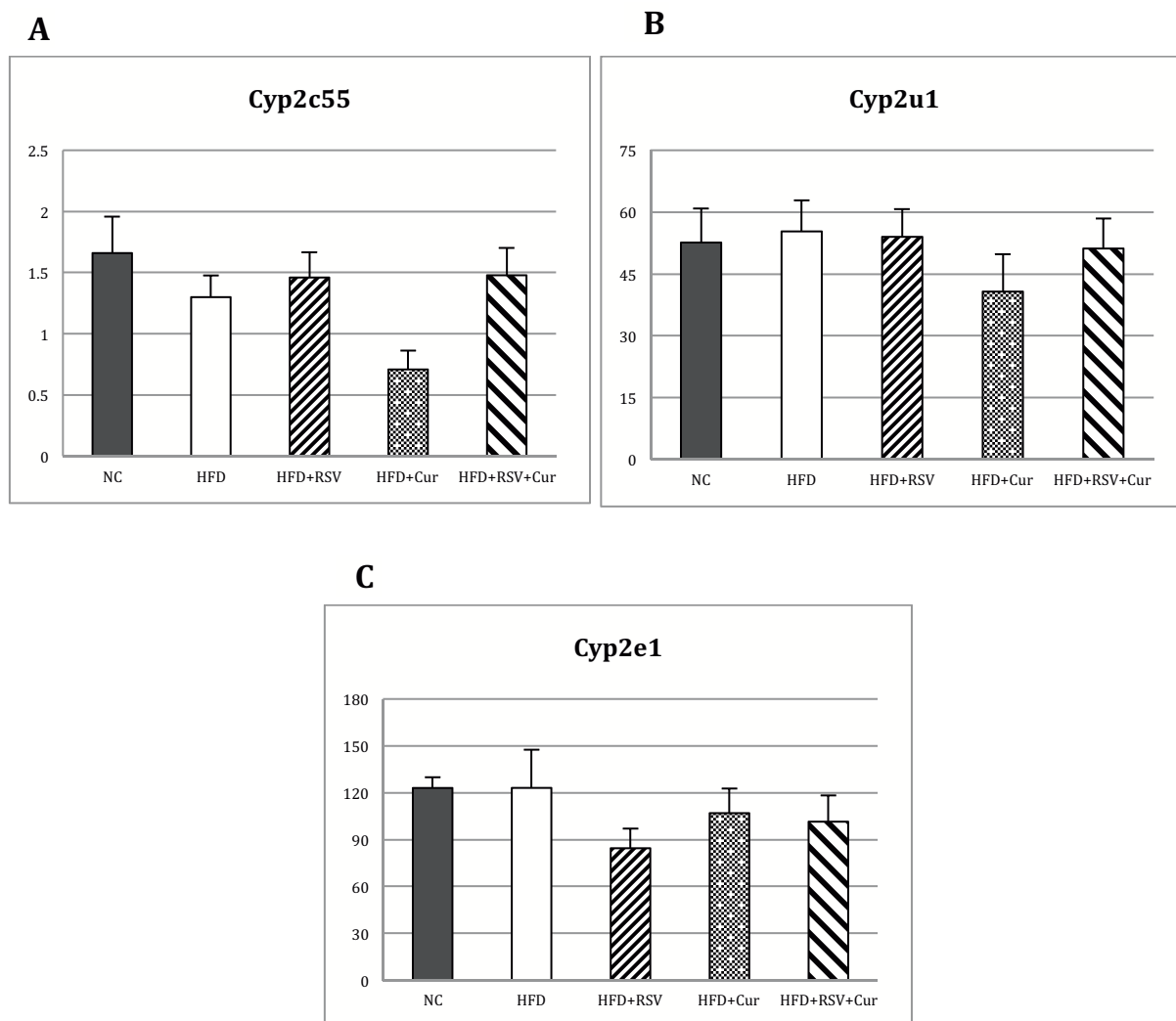


Figure 22: Expression de Cyps dans le colon.
Cyp2c55 (A), Cyp2u1 (B) et Cyp2e1 (C).

○ Iléon

De la même façon, nous avons examiné l'expression des différents Cyps dans l'iléon des souris. Le taux de Cyp2u1 est peu modifié sous l'action du régime riche gras (HFD) ou par la supplémentation de l'alimentation en polyphénols (Figure 23B). Pourtant, les expressions du Cyp2c55 et du Cyp2e1 sont fortement diminuées dans ce tissu par le HFD; le RSV ainsi que la Cur renforcent cet effet (Figure 23A,C). Cependant, l'association des deux polyphénols a tendance à annuler l'effet des polyphénols sur l'expression de ces deux Cyps sans affecter l'effet du régime HFD. Les résultats obtenus concernant l'expression ces deux cytochromes Cyp2c55 et Cyp2e1 sont similaires mais on observe une grande variabilité interindividuelle dans chaque groupe de souris sur l'expression du Cyp2e1.

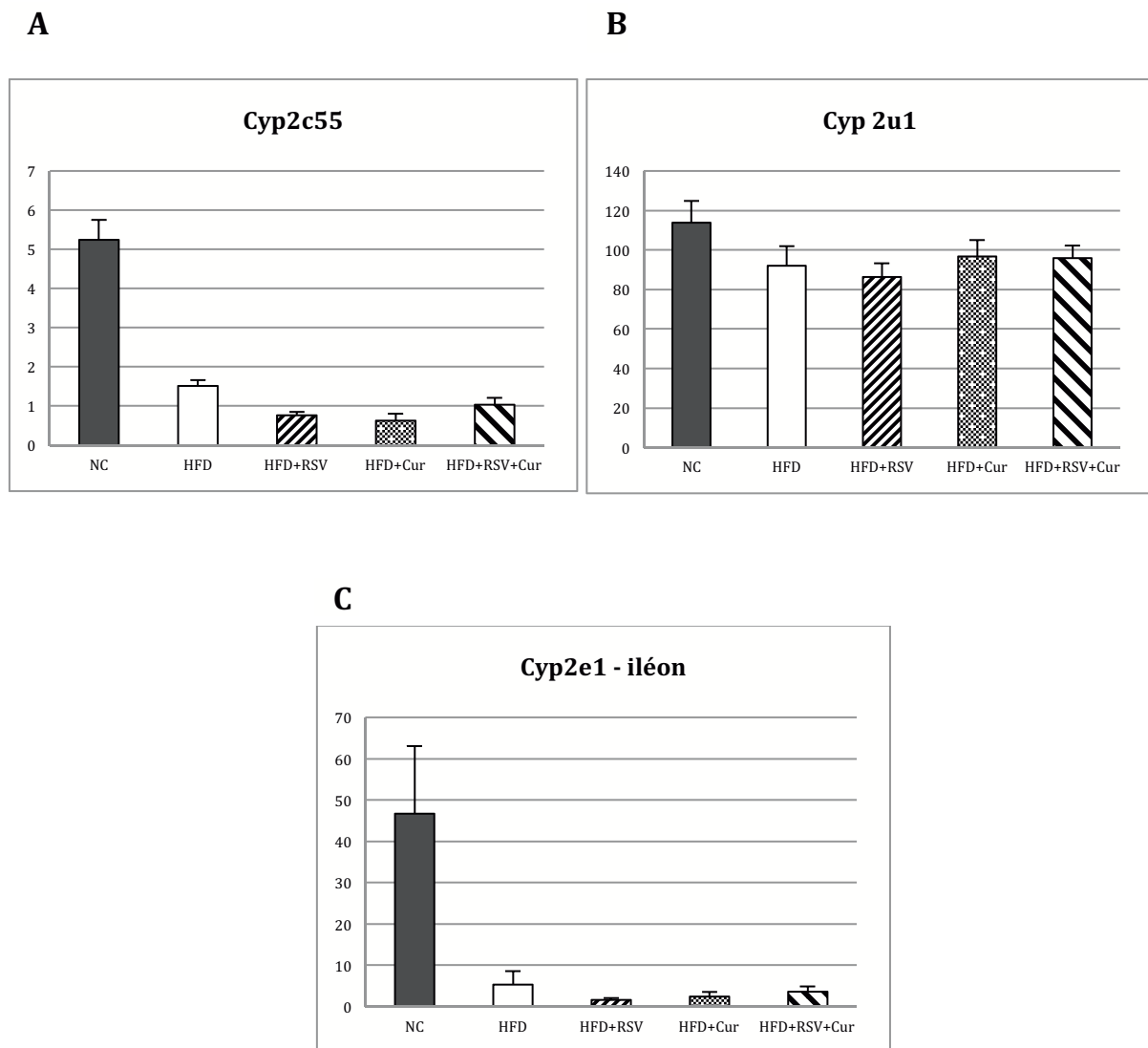


Figure 23: Expression de Cyps dans l'iléon.
Cyp2c55 (A), Cyp2u1 (B), et Cyp2e1 (C)

1.2. Expression des Cyps dans le foie

Dans le foie, contrairement au colon et à l'iléon, le Cyp2c55 et le Cyp2u1 sont faiblement exprimés. Le RSV augmente légèrement l'expression du Cyp1a1 dans ce tissu tandis que le HFD et la Cur n'ont aucun effet. Pourtant la Cur a tendance à diminuer l'effet du RSV lors de l'association des deux polyphénols (Figure 24A). Par contre, la Cur augmente le taux de Cyp2e1 alors que le RSV ne l'affecte pas. La combinaison des deux polyphénols n'affecte pas l'effet de la Cur (Figure 24B).

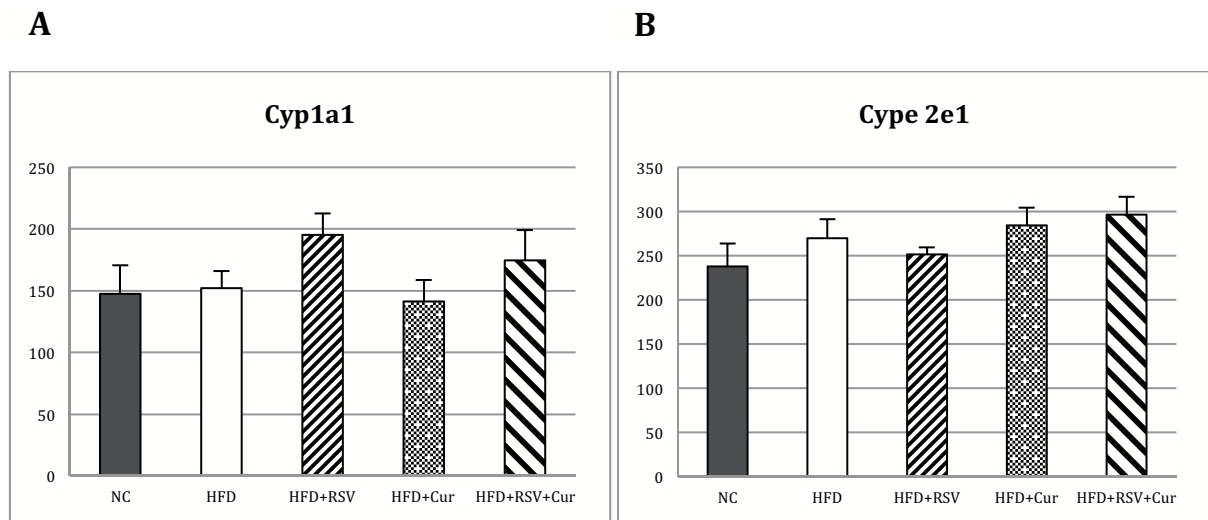


Figure 24: Expression de Cyps dans le foie.
Cyp1a1 (A), Cyp2e1 (B).

1.3. Expression du Cyp2c55 dans l'iléon de différents phénotypes de souris

Le HFD et les polyphénols réduisent l'expression du Cyp2c55 et du Cyp2e1 dans l'iléon. Cela nous a suggéré l'hypothèse selon laquelle cette réduction serait liée à la modification de la flore bactérienne dans l'iléon sous l'influence du HFD et des polyphénols. Nous avons donc examiné le niveau de ces Cyps dans différents types de souris, les unes se différenciant par leur microbiote, tels que les souris axéniques et les souris sous traitement d'une combinaison de trois antibiotiques différents (Ampicilline + Néomycine + Métronidazole), et d'autres montrant un défaut des processus inflammatoires, à savoir des souris KO CX3CR1^{-/-} symbiotiques ou non symbiotiques, le CX3CR1 étant un récepteur du CX3CRL (fractalkine ligand), une chimiokine impliquée dans l'adhésion et la migration des leucocytes.

Comme prévu, l'expression du Cyp2c55 est fortement diminuée chez les trois types de souris, axéniques ou traitées par les antibiotiques et les souris CX3CR1^{-/-}. Il y a une augmentation de l'expression du Cyp2c55 chez les souris KO CX3CR1^{-/-} symbiotiques (Figure 25A-C). Par contre, les résultats sur l'expression de Cyp2e1 sont assez complexes car chez les souris axéniques, on constate une diminution similaire de l'expression du Cyp2e1 tandis que chez les souris traitées avec les antibiotiques on constate une augmentation (Figure 25D,E). D'ailleurs, la déplétion de CX3CR1 associée ou pas à une supplémentation par le symbiotique augmente l'expression du Cyp2e1

dans l'iléon (Figure 25F). Notons l'existence dans chaque groupe concernant l'expression de Cyp2e1, d'une grande variabilité interindividuelle.

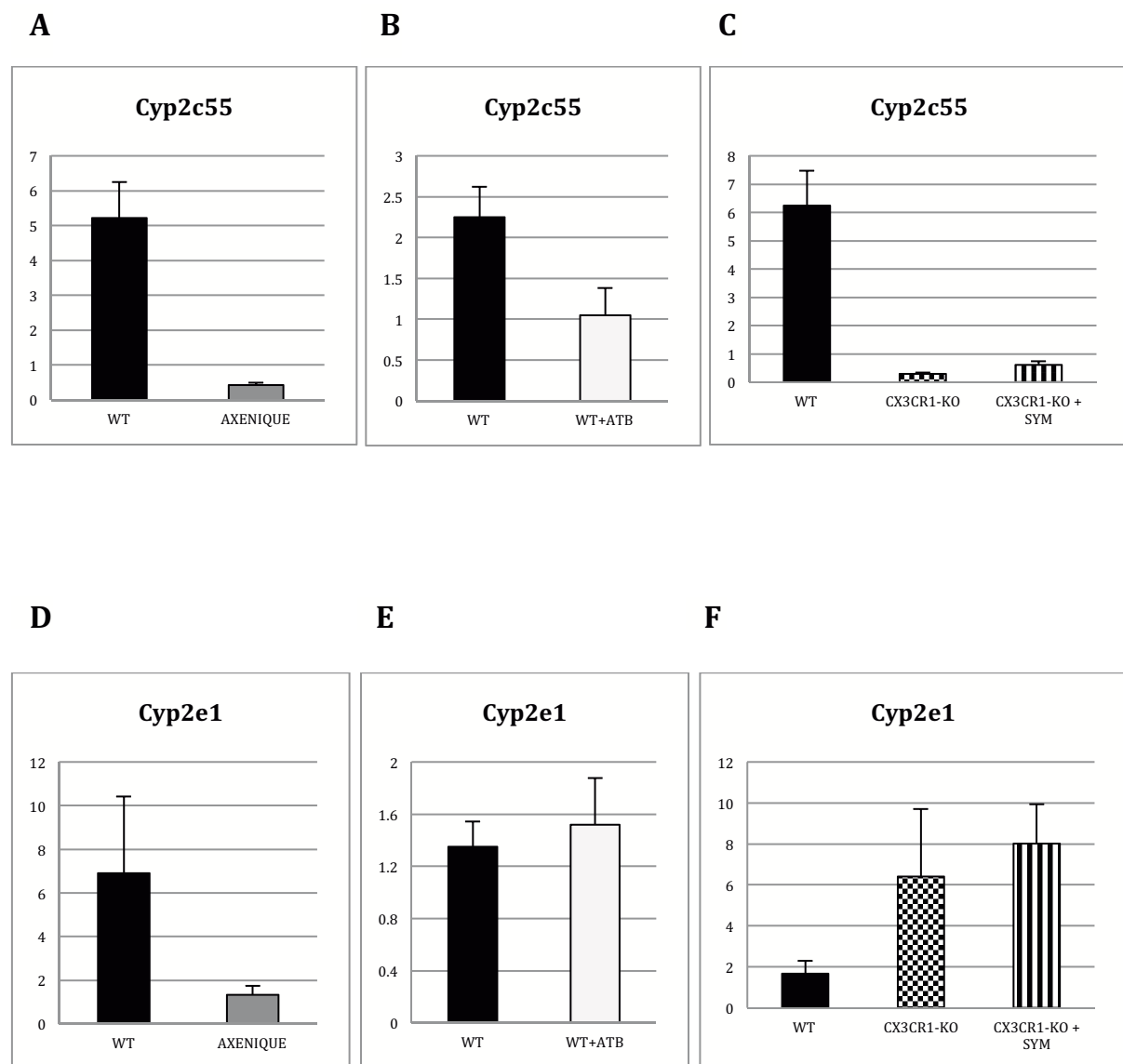


Figure 25: Expression de Cyp2c55 et Cyp2e1 dans différents types de souris.

Les souris axéniques/souris conventionnelles (A, D), les souris traitées par les antibiotiques/souris conventionnelles (B, E), les souris CX3CR1^{-/-}/CX3CR1^{-/-}+symbiotiques/souris conventionnelles (C, F).

2. Discussion

Nos résultats montrent l'expression de divers Cyps dans différentes parties de l'intestin et le foie. La variation du niveau d'expression de ces Cyps selon l'organe pourrait être reliée à leur activité dans le métabolisme des AGs. Dans le colon ainsi que dans le foie, nous n'avons pas trouvé de modifications notables concernant l'expression des Cyps connus pour être impliqués dans la détoxification comme le Cyp2e1 et le Cyp2u1. Cependant, dans l'iléon, nous avons observé une modification importante de l'expression du Cyp2c55 et du Cyp2e1 induite par le HFD. Les polyphénols utilisés, le RSV ainsi que la Cur, renforcent l'effet du HFD tandis que leur combinaison annule l'effet de chacun d'eux. Les résultats métagénomiques ont montré que le HFD aussi bien que les polyphénols (RSV et Cur) peuvent moduler la flore intestinale et cela pourrait être impliqué dans la modification d'expression de ces Cyps.

Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons étudié différents modèles de souris présentant différentes perturbations de la flore intestinale. Comme prévu, le niveau d'expression du Cyp2c55 augmente parallèlement avec la quantité et la diversité de la flore bactérienne présente dans l'iléon (souris axéniques vs souris KO CX3CR1^{-/-} symbiotique vs souris traitées par des antibiotiques). De ce fait, l'expression du Cyp2c55 dans l'iléon est reliée, soit directement soit indirectement, à l'abondance et la diversité de la flore intestinale. Par contre, les résultats sur l'expression de Cyp2e1 sont inattendus. L'expression du Cyp2e1 est presque quasiment supprimée chez les souris axéniques mais elle est augmentée suite au traitement avec des antibiotiques ainsi qu'avec les souris KO CX3CR1 traitées ou non par le symbiotique. Il est intéressant de noter que certains champignons existant dans l'intestin tels que le *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de produire l'éthanol et que celui-ci a été décrit comme pouvant induire l'expression du Cyp2e1 (471). Cela pourrait expliquer une partie des résultats. En effet, l'absence totale de flore intestinale chez les souris axéniques est associée à une baisse de l'expression du Cyp2e1, tandis que le traitement par des antibiotiques provoque une augmentation du taux de champignons dans l'intestin qui induit l'expression de ce Cyp2e1.

Discussion et Perspectives

Cette étude montre des effets antagonistes entre deux polyphénols, le resvératrol (RSV) et la curcumine (Cur), sur différents paramètres liés à la tolérance au glucose et elle permet de mettre en évidence les principaux facteurs qui pourraient être impliqués dans cet antagonisme.

Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie métabolique caractérisée tout d'abord par l'intolérance au glucose. Cette étude montre qu'une supplémentation de la nourriture de souris par un polyphénol, le RSV améliore l'intolérance au glucose induit par un régime riche en graisses (HFD), tandis qu'un autre polyphénol, la Cur ne l'améliore pas, ou très peu. De façon surprenante, la Cur inhibe l'effet du RSV sur l'amélioration de la tolérance au glucose lors de la combinaison des deux polyphénols.

Comme montré sur la figure 26, le HFD peut induire l'intolérance au glucose, via des changements au niveau de divers paramètres moléculaires, cellulaires et physiologiques. L'action des polyphénols peut donc provenir de modifications sur l'un ou l'autre de ces paramètres.

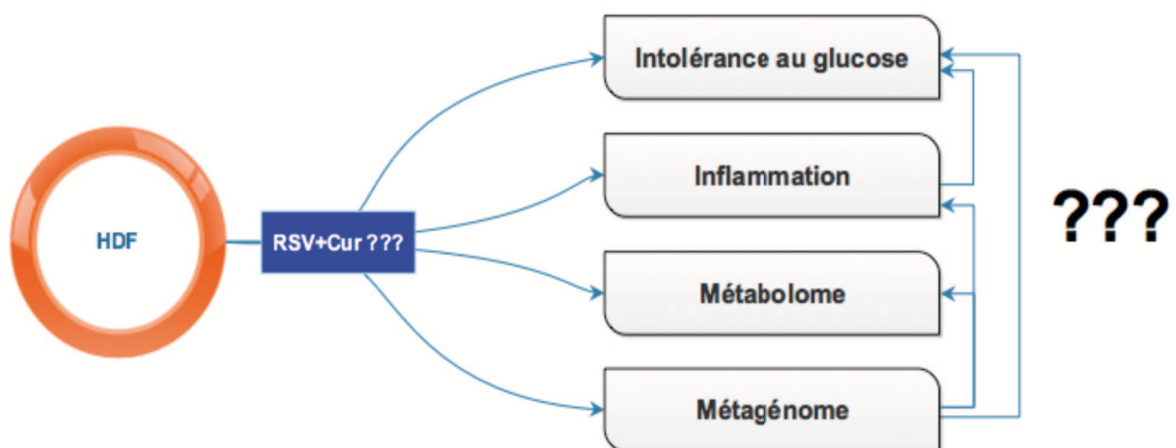


Figure 26: Sites d'action possibles du HFD et des polyphénols

- L'inflammation

Notre hypothèse sur l'efficacité des polyphénols dans le traitement du DT2 est fondée essentiellement sur les propriétés anti-inflammatoires attribuées à ces composés. En effet, le DT2 présente une composante inflammatoire qui est supposée comme importante dans l'apparition et l'évolution de cette maladie métabolique.

Nous avons mené des expériences *in vitro* afin de confirmer l'effet anti-inflammatoire du RSV et de la Cur en mesurant l'expression de diverses cytokines et d'autres marqueurs de l'inflammation. Ces expériences ont permis, en même temps, d'évaluer l'efficacité de la combinaison de ces deux polyphénols. Dans ces modèles expérimentaux, l'expression transcriptionnelle de marqueurs inflammatoires a été considérée comme une mesure de la capacité proinflammatoire du modèle. Comme on fait l'hypothèse qu'une inflammation intestinale participerait à l'établissement du DT2, les cellules épithéliales intestinales Caco2 et des monocytes THP1, qui correspondent aux deux types cellulaires principaux trouvés dans le côlon, ont été utilisés comme modèles. Le TNF α et le PMA ont été utilisés comme stimulateurs de l'inflammation, dans le but de mimer *in vitro* divers processus inflammatoires physiologiques observés *in vivo*. En effet, le TNF α agit plutôt sur la voie NF- κ B alors que le PMA induit essentiellement la voie AP-1. Dans les expériences *in vitro*, nous observons, en général, que les deux polyphénols, le RSV et la Cur, exercent chacun un effet nettement anti-inflammatoire. Cet effet est plus ou moins important selon le type cellulaire considéré et le stimulateur (le TNF α ou le PMA) utilisé. La combinaison du RSV et de la Cur donne en général un effet synergique ou additif sur la modulation de l'expression de certains gènes proinflammatoires, mais plus rarement un effet antagoniste. De ce fait, nos résultats expérimentaux *in vitro* concernant l'expression de gènes des marqueurs inflammatoires, des ROS et de l'activité de la métalloprotéinase sont compatibles avec les effets anti-inflammatoires de ces polyphénols déjà reportés dans la littérature (355,437).

Les données obtenues concernant l'inflammation du colon de souris sont ambiguës. En effet, le taux d'inflammation induit par le HFD reste plutôt faible dans ce tissu et donc les modulations possibles de ce taux sont limitées. On observe une légère diminution de divers marqueurs inflammatoires tels que IL-1 β et F4/80 dans le groupe de souris traitées par la Cur ou tels que IL-1 β , F4/80 et IL-6 dans le groupe traité par le RSV. La combinaison du RSV et de la Cur ne crée pas de synergie par rapport aux effets obtenus par un traitement avec chacun des polyphénols utilisé isolément. On observe

plutôt, en fait, que chaque polyphénol présente, dans la plupart des cas, des effets antagonistes par rapport à l'autre (i.e., expression of IL-1 β , TNF α , IL-10, MMP7, et MMP9).

Un résultat tout à fait original de l'étude *in vitro* concerne l'effet antagoniste sur l'expression de certains gènes induit par la combinaison de ces deux polyphénols qui rappelle évidemment les effets antagonistes des deux polyphénols que nous avons observé *in vivo* pour les paramètres physiologiques et métaboliques.

Comment rendre compte de la différence entre l'effet anti-inflammatoire notable obtenu *in vitro* et l'effet modeste observé *in vivo*? Cette différence pourrait être liée à plusieurs facteurs:

- Premièrement, la coopération entre des différents types de tissus et cellules *in vivo* pourrait être la source d'une complexité physiologique qui masquerait l'effet direct des polyphénols sur chacune de ses cellules cibles.
- Deuxièmement, la régulation des gènes observés *in vivo* est plus complexe que celle qui se produit *in vitro* et vu que ces polyphénols sont capables de moduler de nombreuses voies de signalisation, les 'cross talk' de régulation intracellulaires pourraient être différents dans les deux situations *in vivo* et *in vitro*.
- Troisièmement, l'induction du processus inflammatoire est obtenue de manière différente *in vivo* et *in vitro*. *In vitro*, le TNF α et le PMA ont été utilisés comme inducteurs des marqueurs de l'inflammation alors qu'*in vivo*, le HFD utilisé a été choisi pour induire le DT2 sans induire l'obésité, ce qui expliquerait l'effet modeste de ce régime observé sur l'inflammation.
- Enfin, la dose efficace et la biodisponibilité des polyphénols pourraient également jouer un rôle important dans cette différence.

- **Le métabolome**

Les effets des polyphénols sont multiples et les relations entre leurs différentes cibles ne sont pas connues (352,405). Les effets du RSV sur la tolérance au glucose peuvent être liés à une modulation métabolique ayant un lien ou non avec leur effet anti-inflammatoire. Nous avons recherché les influences pouvant être apportées par le RSV et la Cur au niveau du métabolome des souris traitées. L'analyse par GC-MS des molécules issues du métabolisme des souris traitées par les polyphénols montre une normalisation du profil métabolique des souris soumises au régime HFD. Cette analyse

permet, en outre, de suggérer que la Cur agirait de manière non spécifique sur diverses voies métaboliques tandis que le RSV agirait de manière préférentielle sur les voies du métabolisme glucidique. De plus, les données obtenues par cette étude métabolomique ont confirmé, à nouveau, l'effet antagoniste entre le RSV et la Cur. C'est-à-dire que chez les souris ayant reçu un mélange des deux polyphénols, il est observé une absence de normalisation du profil métabolique.

Le groupe de souris ayant reçu une nourriture supplémentée avec la Cur montre une modulation de certains métabolites plasmatiques comme une diminution du taux de cholestérol et d'acide β -hydroxy butyrique. En effet, la Cur est connue comme un agent anti-hyperlipidémique et l'une de ses actions est similaire à celle de la statine, ce qui se traduit par une diminution du cholestérol hépatique via l'inhibition de la biosynthèse de la HMG-CoA réductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A) (472-474). La diminution de l'acide β -hydroxy butyrique, un des corps cétoniques, induite par la Cur est aussi cohérente avec de précédentes études (475). De ce fait, bien que la Cur n'induit aucune modification du taux de lipides plasmatiques, comme ceci est constaté par des tests biochimiques (voir l'annexe), nos résultats métabolomiques confirment l'activité anti-hyperlipidémique de la Cur. Cette contradiction peut être due à la courte période de traitement utilisée dans notre étude. En outre, la Cur réduit également le taux de différents acides aminés (proline et la sérine) et augmente des acides gras à chaîne courte (AGCCs) comme l'acide acétique et l'acide butanoïque.

Le RSV réduit le taux de glucose et de glucitol dans le plasma. Cela est en accord avec l'effet du RSV au niveau de la tolérance au glucose observée dans notre étude.

De façon similaire à la Cur, le RSV augmente le taux des AGCCs ainsi que celui de l'isoleucine mais diminue celui de la sérine. Il est à souligner que l'administration par voie orale de l'isoleucine a été rapportée comme étant un des acides aminés qui réduit le taux du glucose plasmatique (476,477) et cette observation est cohérente avec l'effet hypoglycémiant du RSV. Les AGCCs sont produits principalement par certaines bactéries intestinales et peuvent être utilisés par l'hôte en tant que source énergétique pour les cellules intestinales. Ces AGCCs joueraient également un rôle important dans la lutte contre l'inflammation intestinale (478).

- Le métagénome

Les effets des polyphénols constatés sur les marqueurs de l'évolution du DT2 comme l'inflammation, la tolérance au glucose ainsi que le métabolome pourraient être liés à des changements intervenant au niveau du microbiote de l'animal.

Le microbiote intestinal joue un rôle important sur le métabolisme et la santé de l'hôte car, comme rappelé dans l'introduction, il est constitué d'environ 100 trillions de bactéries, ce qui correspond à environ 1,5-2 kg du poids corporel total (479). Au cours des dernières années, des études ont été conduites concernant les effets de la modulation du microbiote intestinal sur des maladies métaboliques. Différentes méthodes ont été utilisées telles que le changement du régime alimentaire, l'ingestion de prébiotique (480), ou de probiotique (481), ou l'administration de divers médicaments (482). Les polyphénols présents dans l'alimentation sont connus pour moduler la flore intestinale et leurs bienfaits en terme de santé pourraient être liés à cette propriété (399,483-485). Dans notre étude, nous avons constaté que le HFD induit une dysbiose du microbiote intestinal, ce qui est en accord avec d'autres études (399,480). La supplémentation du régime avec les polyphénols (RSV ou Cur) améliore significativement cette dysbiose induite par le HFD. Nos données concernant la caractérisation du microbiote intestinal par l'analyse des séquences ADNr 16S indiquent que la composition du microbiote des souris du groupe traité avec le RSV ou la Cur seuls et nourris avec le HFD s'approche de celle du groupe contrôle ayant reçu une alimentation standard, alors le microbiote des souris du groupe traité avec la combinaison RSV et Cur apparaît plus éloigné de ce groupe contrôle. Cet effet antagoniste des deux polyphénols sur la composition du microbiote est cohérent avec celui obtenu concernant les effets de ces composés sur la tolérance au glucose.

Une étude détaillée des résultats portant sur la modification des taux des différents genres de bactéries, montre que les traitements par soit le RSV, soit la Cur ou la combinaison de RSV et Cur augmentent le nombre de bactéries du genre *Bacteroides* (voir l'annexe). Des résultats similaires ont été rapportés par des études antérieures dans lesquelles le RSV et les polyphénols du vin rouge augmentent la prolifération de cette souche (400,486). Cependant, dans l'étude de Neyrinck et al. (487), aucun changement du genre *Bacteroides* ainsi que d'autres genres de bactéries n'a été trouvé en réponse au traitement par la Cur. Les bénéfices potentiels pouvant être apportés par l'abondance de ce genre de bactéries ont été suggérés à la suite de divers travaux. Ainsi, des études cliniques réalisées sur des adolescents obèses ont permis de mettre en

évidence que l'augmentation de Bacteroïdes est corrélée avec une perte de poids, suite à une intervention sur le régime alimentaire (488,489).

D'ailleurs, dans notre étude, après cinq semaines de traitement, les polyphénols provoquent une diminution du nombre de bactéries de certains genres tels que Alistipes, Odoribacter ainsi que les Clostridium du group XI. Toutefois, leur efficacité sur chaque type de population bactérienne est différente. Les études précédentes utilisant le RSV ou des polyphénols du vin rouge ont montré des résultats similaires sur la population de Clostridium XI (486) et aussi sur d'autres espèces de Clostridium (490). Il est connu que l'augmentation du nombre de bactéries du genre Alistipes est positivement corrélée avec l'intensité de la douleur chez les patients présentant le syndrome du côlon irrité (491). Une étude portant sur des patients diabétiques d'origine chinoise ayant ingéré une formulation à base de plantes chinoises a également permis de constater une réduction des populations d'Alistipes et d'Odoribacter. Les auteurs supposent que cette réduction pourrait être impliquée dans l'amélioration du DT2 (492). *Clostridium difficile*, un des clostridium du groupe XI, est connu comme un agent pathogène opportuniste qui est impliqué dans différentes maladies auxquelles sont associées des diarrhées (493). L'abondance d'une autre espèce de Clostridium du groupe XI, *Clostridium lituseburense*, est diminuée chez des adolescents obèses soumis à une restriction calorique. La diminution de cette espèce pourrait être associée à la perte de poids constatée (489).

Nous avons également montré que le RSV seul augmente de manière significative la population des bactéries du genre Anaerotruncus tandis que la Cur et la combinaison du RSV et de la Cur réduisent cette population. Il a été montré que le taux d'Anaerotruncus est plus important chez des individus sains par rapport à des patients atteints d'IBD, une maladie inflammatoire de l'intestin (494). L'abondance de ce genre bactérien aurait également un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie intestinale comme il a été constaté lors d'une transplantation fécale chez des patients souffrants d'une colite induite par des antibiotiques (495).

L'ensemble de la littérature ainsi que nos résultats suggèrent que l'effet prébiotique du RSV et de la Cur pourraient intervenir, d'une part, via l'enrichissement en bactéries telles que Bacteroïdes et Anaerotruncus qui influent positivement sur le métabolisme énergétique et, d'autre part, via la diminution des populations de bactéries pathogènes comme celles des genres Alistipes, Odoribacter ou les Clostridium du groupe XI.

- **Relations entre les changements du Métagénome et du Métabolome**

Les données résultant de notre étude indiquent que le métagénome, ainsi que le métabolome, sont affectés par les différents traitements. Une question fondamentale reste sans réponse: existe-t-il un lien direct entre la modulation du microbiote et celle du métabolome, ou bien, les changements observés au niveau du métabolome seraient une conséquence directe des traitements par les polyphénols, ceci indépendamment des modifications induites au niveau du microbiote? En effet, on sait que les bactéries métabolisent des composés dont les métabolites peuvent être réabsorbés et agir comme messagers secondaires ou comme co-métabolites en favorisant d'autres voies métaboliques. Ces messagers/co-métabolites pourraient affecter en retour le métabolome. Par exemple, l'espèce *Anaerotruncus*, dont la population est augmentée par le RSV, est connue pour fermenter le glucose et produire en abondance les acides acétiques et butanoïques (des AGCCs). Certaines espèces d'*Alistipes* peuvent métaboliser des acides aminés tels que la proline, l'isoleucine et la serine (REF: KEGG pathway).

Afin de tenter d'apporter une réponse, une expérience envisageable serait, par exemple, de réaliser un traitement de souris axéniques avec du RSV associé ou pas à une nourriture HFD, ceci afin de pouvoir mettre en évidence un effet direct de ce polyphénol sur le métabolome.

- **Le mécanisme d'action du RSV et de la Cur dans l'antagonisme de la tolérance au glucose**

Nous avons tenté de comprendre au niveau moléculaire l'effet antagoniste entre la Cur et le RSV sur la tolérance au glucose. Deux mécanismes peuvent être envisagés. L'un fait intervenir une régulation de l'expression de gènes liés au récepteur aux hydrocarbures (AhR) et l'autre dépendrait d'une modification du microbiote intestinal.

L'analyse de la région 'enhancer' et promotrice du gène codant pour le proglucagon nous a permis de détecter six sites potentiels pour la fixation du facteur de transcription AhR (données non montrées). Ces sites pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression du GLP-1 et par conséquent dans la régulation de la glycémie. De fait, le RSV et la Cur ont été décrits comme étant un agoniste compétitif de AhR (380,381), et dans une étude antérieure (399), notre laboratoire a montré que le RSV induit l'expression du GLP-1. Par ailleurs, il est à noter que les indoles sont aussi des ligands de AhR, et que ces derniers sont liés au métabolisme de la flore intestinale (496).

Nous avons effectué, sur des cellules Caco2, une transfection d'un gène rapporteur placé sous la dépendance de deux sites XRE, qui sont des cibles pour AhR. Cette expérience montre que le RSV et la Cur inhibent à la fois l'expression génétique de base et aussi celle induite par le BaP, un ligand de AhR. En outre, la combinaison du RSV et de la Cur donne un effet synergique. Donc, au niveau de la régulation génétique impliquant AhR, aucun effet antagoniste entre ces deux polyphénols n'a pu être détecté. Pourtant, l'indole, produit par des bactéries qui sont modulées par le RSV ou la Cur, pourrait être impliqué dans cet antagonisme.

Par la suite, nous avons analysé l'effet du RSV et de la Cur sur le microbiote intestinal. En présence de polyphénols, on constate, à partir de l'analyse métagénomique, une modification importante au niveau de sept souches de bactéries. Ces souches ont été sélectionnées à partir d'une banque et mises en culture en présence ou non des polyphénols seuls ou en association. Nous avons observé une forte inhibition par le RSV de la croissance d'une espèce d'Alistipes, *Alistipes putredinis*. On observe que cet effet inhibiteur du RSV est bloqué par la Cur. Ajoutons que, lors d'une étude précédente réalisée par notre équipe, nous avons montré que l'abondance de cette espèce d'Alistipes amplifiée par le HFD peut être normalisée lors d'un traitement avec le RSV. L'ensemble de nos résultats montre que *Anaerotruncus* et *Alistipes putredinis* pourraient jouer le rôle principal dans la pathogenèse du DT2. Ceci est en accord avec le fait que le polyphénol RSV améliore la tolérance au glucose associé à son effet antibiotique sur ces souches.

A partir des résultats de cette étude, on peut modifier la figure 26 en tentant de hiérarchiser les effets du HFD et des polyphénols comme le montre la figure 27: ainsi, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle les divers changements induits par le HFD et responsables de l'apparition du DT2 auraient pour origine une modification de la flore intestinale. C'est cette modification qui aurait pour conséquence la mise en place d'un processus inflammatoire. Ce processus inflammatoire participerait sans doute à la mise en place d'une intolérance au glucose mais n'en représenterait pas le facteur essentiel. Les modifications constatées au niveau du métabolome seraient la résultante de la dysbiose mais en retour les modifications du métabolome pourraient influencer la flore. Ce serait la conjonction et l'interaction des changements intervenant au niveau de ces deux facteurs, flore et métabolome, qui seraient responsables de l'apparition de l'intolérance au glucose.

Bien que présentant tous les deux une capacité anti-inflammatoire, les polyphénols agissent très différemment sur l'intolérance au glucose et sont même antagonistes concernant ce paramètre. Ce qui montre bien que l'inflammation ne représente pas la cause essentielle de l'apparition de l'intolérance au glucose. Cette intolérance, provoquée selon notre hypothèse par la dysbiose, est améliorée par le RSV qui, de fait, tend à normaliser le profil de certaines espèces de la flore. Les changements induits sur cette flore et sur le métabolome par la Cur sont différents de ceux induits par le RSV. Ainsi, alors que le RSV semble affecter plus particulièrement le métabolisme des glucides, la Cur agit sur diverses voies. L'effet du RSV sur le métabolisme glucidique est en correspondance avec son effet sur certaines espèces bactériennes connues pour participer à ce métabolisme.

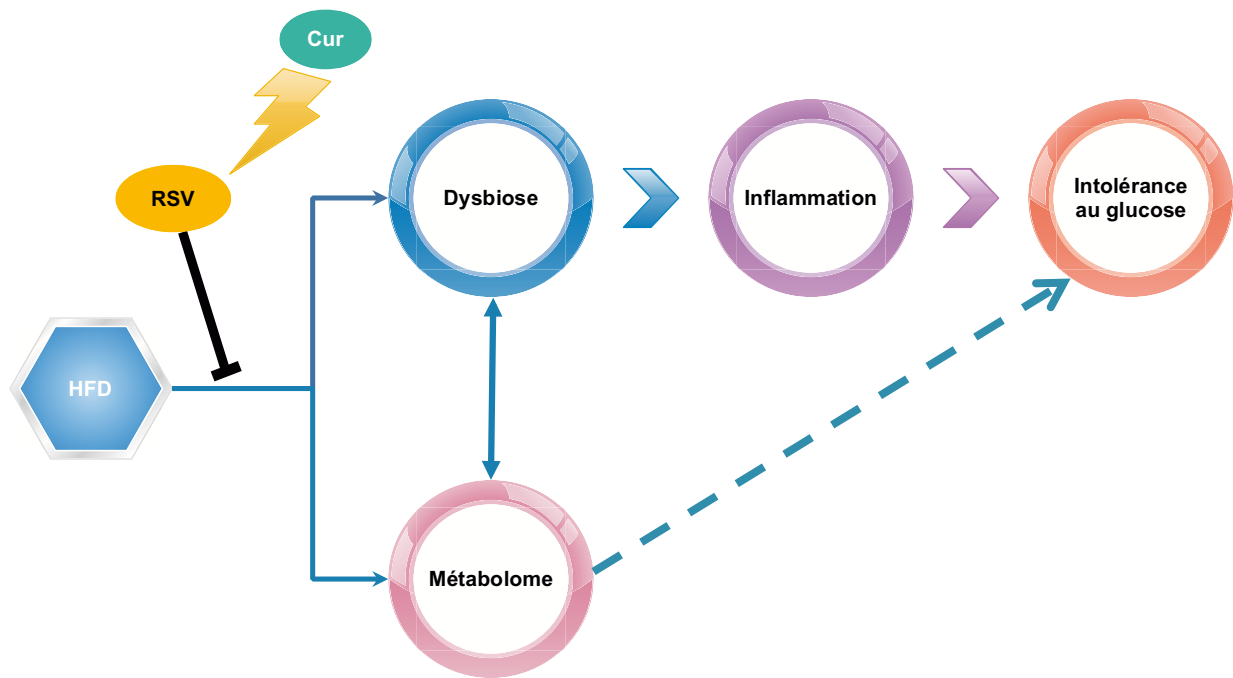


Figure 27: Hypothèse concernant les sites d'action possibles du HFD et des polyphénols et leurs relations hiérarchiques.

Nos résultats confortent l'hypothèse selon laquelle certains polyphénols comme le RSV préviennent le syndrome métabolique ou l'apparition du diabète de type 2. Il serait donc intéressant de pouvoir donner accès aux populations à risque à un régime riche en polyphénols, ou bien à l'utilisation de compléments alimentaires renfermant ces composés. Dans ce cadre, notons la vigilance qui devra être apportée au contenu exact

des associations de polyphénols proposées, car notre étude montre clairement l'existence d'effets antagonistes.

Enfin, cette étude permet d'envisager que deux genres de bactéries, *Anaerotruncus* et *Alistipes putredinis*, pourraient être impliqués dans le DT2. Dans cette perspective, nous envisageons de poursuivre cette étude en implantant ces souches bactériennes chez des souris axéniques et d'examiner les conséquences de cet apport sur l'installation et l'évolution du DT2 chez ces animaux.

Bibliographie

1. Migrenne S, Marsollier N, Cruciani-Guglielmacci C, Magnan C. Importance of the gut-brain axis in the control of glucose homeostasis. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Dec;6(6):592-7.
2. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000 Jul 15;106(2):165-9.
3. Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2009 Apr 1;296(4):E581-91.
4. Voliovitch H, Schindler DG, Hadari YR, Taylor SI, Accili D, Zick Y. Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 in Vivo Depends upon the Presence of Its Pleckstrin Homology Region. *J Biol Chem*. 1995 Jul 28;270(30):18083-7.
5. Wolf G, Trüb T, Ottinger E, Groninga L, Lynch A, White MF, et al. PTB Domains of IRS-1 and Shc Have Distinct but Overlapping Binding Specificities. *J Biol Chem*. 1995 Nov 17;270(46):27407-10.
6. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):799-806.
7. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Feb;7(2):85-96.
8. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease. *Endocr Rev*. 2009 Oct 1;30(6):586-623.
9. Khan A, Pessin J. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia*. 2002 Nov;45(11):1475-83.
10. Roith DL, Zick Y. Recent Advances in Our Understanding of Insulin Action and Insulin Resistance. *Diabetes Care*. 2001 Mar 1;24(3):588-97.
11. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Galloway L, Moscat J, Farese RV. Evidence for Involvement of Protein Kinase C (PKC)- ζ and Noninvolvement of Diacylglycerol-Sensitive PKCs in Insulin-Stimulated Glucose Transport in L6 Myotubes. *Endocrinology*. 1997 Nov 1;138(11):4721-31.
12. Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR, et al. Protein Kinase B/Akt Participates in GLUT4 Translocation by Insulin in L6 Myoblasts. *Mol Cell Biol*. 1999 Jun;19(6):4008-18.
13. Lebovitz HE. Insulin: Potential Negative Consequences of Early Routine Use in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2011 May;34(Suppl 2):S225-30.
14. Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995 Dec 28;378(6559):785-9.
15. Newgard CB, Brady MJ, O'Doherty RM, Saltiel AR. Organizing glucose disposal: emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1. *Diabetes*. 2000 Dec 1;49(12):1967-77.
16. S J Pilkis, Granner and DK. Molecular Physiology of the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis. *Annu Rev Physiol*. 1992;54(1):885-909.
17. Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK, Saklatvala J, Cohen P, White MF. New Connections in the Regulation of PEPCK Gene Expression by Insulin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1996 Feb 29;351(1336):191-9.

18. Anthonsen MW, Rönstrand L, Wernstedt C, Degerman E, Holm C. Identification of Novel Phosphorylation Sites in Hormone-sensitive Lipase That Are Phosphorylated in Response to Isoproterenol and Govern Activation Properties in Vitro. *J Biol Chem.* 1998 Jan 2;273(1):215–21.
19. Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, et al. Insulin-Induced Phosphorylation and Activation of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 3B by the Serine-Threonine Kinase Akt. *Mol Cell Biol.* 1999 Sep;19(9):6286–96.
20. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell.* 2012 Feb 3;148(5):852–71.
21. Zick Y. Ser/Thr Phosphorylation of IRS Proteins: A Molecular Basis for Insulin Resistance. *Sci Signal.* 2005 Jan 25;2005(268):pe4–pe4.
22. Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, et al. A molecular basis for insulin resistance elevated Serine/Threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced Tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1997 Nov 21;272(47):29911–8.
23. Pederson TM, Kramer DL, Rondinone CM. Serine/Threonine Phosphorylation of IRS-1 Triggers Its Degradation Possible Regulation by Tyrosine Phosphorylation. *Diabetes.* 2001 Jan 1;50(1):24–31.
24. Mothe I, Obberghen EV. Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 on Multiple Serine Residues, 612, 632, 662, and 731, Modulates Insulin Action. *J Biol Chem.* 1996 May 10;271(19):11222–7.
25. Tirosh A, Potashnik R, Bashan N, Rudich A. Oxidative Stress Disrupts Insulin-induced Cellular Redistribution of Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphatidylinositol 3-Kinase in 3T3-L1 Adipocytes A Putative Cellular Mechanism For Impaired Protein Kinase B Activation And GLUT4 Translocation. *J Biol Chem.* 1999 Apr 9;274(15):10595–602.
26. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF- α - and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Science.* 1996 Feb 2;271(5249):665–70.
27. Fea KD, Roth RA. Modulation of Insulin Receptor Substrate-1 Tyrosine Phosphorylation and Function by Mitogen-activated Protein Kinase. *J Biol Chem.* 1997 Dec 12;272(50):31400–6.
28. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature.* 2004 Sep 9;431(7005):200–5.
29. Ravichandran LV, Esposito DL, Chen J, Quon MJ. Protein Kinase C- ζ Phosphorylates Insulin Receptor Substrate-1 and Impairs Its Ability to Activate Phosphatidylinositol 3-Kinase in Response to Insulin. *J Biol Chem.* 2001 Feb 2;276(5):3543–9.
30. Lee S, Lynn EG, Kim J, Quon MJ. Protein Kinase C- ζ Phosphorylates Insulin Receptor Substrate-1, -3, and -4 But Not -2: Isoform Specific Determinants of Specificity in Insulin Signaling. *Endocrinology.* 2008 May;149(5):2451–8.
31. Eldar-Finkelman H, Krebs EG. Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 2;94(18):9660–4.

32. Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, et al. Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 by Inhibitor κ B Kinase Complex. *J Biol Chem*. 2002 Dec 13;277(50):48115–21.
33. Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Mediates Feedback Inhibition of the Insulin Signaling Cascade. *J Biol Chem*. 2003 Jan 31;278(5):2896–902.
34. Kim J, Yeh DC, Ver M, Li Y, Carranza A, Conrads TP, et al. Phosphorylation of Ser24 in the Pleckstrin Homology Domain of Insulin Receptor Substrate-1 by Mouse Pelle-like Kinase/Interleukin-1 Receptor-associated Kinase Cross-Talk Between Inflammatory Signaling And Insulin Signaling That May Contribute To Insulin Resistance. *J Biol Chem*. 2005 Jun 17;280(24):23173–83.
35. Tzatsos A, Tschlis PN. Energy Depletion Inhibits Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling and Induces Apoptosis via AMP-activated Protein Kinase-dependent Phosphorylation of IRS-1 at Ser-794. *J Biol Chem*. 2007 Jun 22;282(25):18069–82.
36. Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, et al. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci*. 1998 Jan 6;95(1):114–9.
37. Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. SOCS-1 and SOCS-3 Block Insulin Signaling by Ubiquitin-mediated Degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem*. 2002 Nov 1;277(44):42394–8.
38. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, et al. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to TNF- α in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem*. 2001 Oct 16;276(51):47944–9.
39. Mooney RA, Senn J, Cameron S, Inamdar N, Boivin LM, Shang Y, et al. Suppressors of Cytokine Signaling-1 and -6 Associate with and Inhibit the Insulin Receptor A Potential Mechanism For Cytokine-Mediated Insulin Resistance. *J Biol Chem*. 2001 Jul 13;276(28):25889–93.
40. Lebrun P, Van Obberghen E. SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiol*. 2008 Jan 1;192(1):29–36.
41. Dasgupta S, Bhattacharya S, Maitra S, Pal D, Majumdar SS, Datta A, et al. Mechanism of lipid induced insulin resistance: Activated PKC ϵ is a key regulator. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2011 Apr;1812(4):495–506.
42. Ahmad F, Considine RV, Goldstein BJ. Increased abundance of the receptor-type protein-tyrosine phosphatase LAR accounts for the elevated insulin receptor dephosphorylating activity in adipose tissue of obese human subjects. *J Clin Invest*. 1995 Jun;95(6):2806–12.
43. Ahmad F, Azevedo JL, Cortright R, Dohm GL, Goldstein BJ. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J Clin Invest*. 1997 Jul 15;100(2):449–58.
44. Draznin B. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Increased Expression of p85 α The Two Sides of a Coin. *Diabetes*. 2006 Aug 1;55(8):2392–7.
45. Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Ceramide Mediates Insulin Resistance by Tumor Necrosis Factor- α in Brown Adipocytes by Maintaining Akt in an Inactive Dephosphorylated State. *Diabetes*. 2001 Nov 1;50(11):2563–71.

46. Fox TE, Houck KL, O'Neill SM, Nagarajan M, Stover TC, Pomianowski PT, et al. Ceramide Recruits and Activates Protein Kinase C ζ (PKC ζ) within Structured Membrane Microdomains. *J Biol Chem.* 2007 Apr 27;282(17):12450–7.
47. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet Lond Engl.* 1963 Apr 13;1(7285):785–9.
48. Jucker BM, Rennings AJM, Cline GW, Shulman GI. ¹³C and ³¹P NMR Studies on the Effects of Increased Plasma Free Fatty Acids on Intramuscular Glucose Metabolism in the Awake Rat. *J Biol Chem.* 1997 Apr 18;272(16):10464–73.
49. Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, et al. Impaired Glucose Transport as a Cause of Decreased Insulin-Stimulated Muscle Glycogen Synthesis in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 1999 Jul 22;341(4):240–6.
50. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest.* 1999 Jan 15;103(2):253–9.
51. Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and Lipid Signaling in the Etiology of Insulin Resistance. *Cell Metab.* 2012 Feb 5;15(5):635–45.
52. Boden G, Jadali F, White J, Liang Y, Mozzoli M, Chen X, et al. Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J Clin Invest.* 1991 Sep;88(3):960–6.
53. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest.* 1996 Jun 15;97(12):2859–65.
54. Fielding BA, Callow J, Owen RM, Samra JS, Matthews DR, Frayn KN. Postprandial lipemia: the origin of an early peak studied by specific dietary fatty acid intake during sequential meals. *Am J Clin Nutr.* 1996 Jan 1;63(1):36–41.
55. Hwang D, Rhee SH. Receptor-mediated signaling pathways: potential targets of modulation by dietary fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 1999 Oct 1;70(4):545–56.
56. Nguyen MTA, Satoh H, Favelyukis S, Babendure JL, Imamura T, Sbodio JI, et al. JNK and Tumor Necrosis Factor- α Mediate Free Fatty Acid-induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes. *J Biol Chem.* 2005 Oct 21;280(42):35361–71.
57. Nguyen MTA, Favelyukis S, Nguyen A-K, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. A Subpopulation of Macrophages Infiltrates Hypertrophic Adipose Tissue and Is Activated by Free Fatty Acids via Toll-like Receptors 2 and 4 and JNK-dependent Pathways. *J Biol Chem.* 2007 Nov 30;282(48):35279–92.
58. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, et al. Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):50230–6.
59. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. *J Biol Chem.* 2001 May 18;276(20):16683–9.
60. Schaeffler A, Gross P, Buettner R, Bollheimer C, Buechler C, Neumeier M, et al. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor- κ B pathway in

- adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology*. 2009 Feb;126(2):233–45.
61. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 30;388(4):621–5.
 62. Seimon TA, Nadolski MJ, Liao X, Magallon J, Nguyen M, Feric NT, et al. Atherogenic Lipids and Lipoproteins Trigger CD36-TLR2-Dependent Apoptosis in Macrophages Undergoing Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Metab*. 2010 Nov 3;12(5):467–82.
 63. Wong SW, Kwon M-J, Choi AMK, Kim H-P, Nakahira K, Hwang DH. Fatty Acids Modulate Toll-like Receptor 4 Activation through Regulation of Receptor Dimerization and Recruitment into Lipid Rafts in a Reactive Oxygen Species-dependent Manner. *J Biol Chem*. 2009 Oct 2;284(40):27384–92.
 64. Holzer RG, Park E-J, Li N, Tran H, Chen M, Choi C, et al. Saturated Fatty Acids Induce c-Src Clustering within Membrane Subdomains, Leading to JNK Activation. *Cell*. 2011 Sep 30;147(1):173–84.
 65. Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2012 Aug;18(8):1279–85.
 66. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim J-Y, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of Toll-like Receptors 2 and 4 in Cellular Activation by High Mobility Group Box 1 Protein. *J Biol Chem*. 2004 Feb 27;279(9):7370–7.
 67. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT-H, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol*. 2011 May;12(5):408–15.
 68. Ting JP-Y, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):372–9.
 69. Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, Kahn M, Beddow SA, Chu X, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Sep 27;108(39):16381–5.
 70. Neschen S, Morino K, Hammond LE, Zhang D, Liu Z-X, Romanelli AJ, et al. Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance in mitochondrial acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 knockout mice. *Cell Metab*. 2005 Jan 7;2(1):55–65.
 71. Nagle CA, An J, Shiota M, Torres TP, Cline GW, Liu Z-X, et al. Hepatic Overexpression of Glycerol-sn-3-phosphate Acyltransferase 1 in Rats Causes Insulin Resistance. *J Biol Chem*. 2007 May 18;282(20):14807–15.
 72. Krssak M, Petersen KF, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, et al. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia*. 1999 Jan;42(1):113–6.
 73. Liu L, Zhang Y, Chen N, Shi X, Tsang B, Yu Y-H. Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2007 Jun 1;117(6):1679–89.
 74. Krssak M, Petersen KF, Bergeron R, Price T, Laurent D, Rothman DL, et al. Intramuscular Glycogen and Intramyocellular Lipid Utilization during Prolonged Exercise and Recovery in Man: A ¹³C and ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Feb 1;85(2):748–54.

75. Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal Muscle Lipid Content and Insulin Resistance: Evidence for a Paradox in Endurance-Trained Athletes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Dec 1;86(12):5755–61.
76. Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem.* 1990 Oct 5;265(28):16880–5.
77. Holland WL, Brozinick JT, Wang L-P, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, et al. Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Metab.* 2007 Mar 7;5(3):167–79.
78. Ussher JR, Koves TR, Cadete VJJ, Zhang L, Jaswal JS, Swyrd SJ, et al. Inhibition of De Novo Ceramide Synthesis Reverses Diet-Induced Insulin Resistance and Enhances Whole-Body Oxygen Consumption. *Diabetes.* 2010 Oct 1;59(10):2453–64.
79. Chibalin AV, Leng Y, Vieira E, Krook A, Björnholm M, Long YC, et al. Downregulation of Diacylglycerol Kinase Delta Contributes to Hyperglycemia-Induced Insulin Resistance. *Cell.* 2008 Aug 2;132(3):375–86.
80. Itani SI, Ruderman NB, Schmieler F, Boden G. Lipid-Induced Insulin Resistance in Human Muscle Is Associated With Changes in Diacylglycerol, Protein Kinase C, and IκB-α. *Diabetes.* 2002 Jul 1;51(7):2005–11.
81. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes.* 1999 Jun 1;48(6):1270–4.
82. Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, Kim D-W, et al. PKC-θ knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2004 Sep 15;114(6):823–7.
83. Gao Z, Wang Z, Zhang X, Butler AA, Zuberi A, Gawronska-Kozak B, et al. Inactivation of PKCθ leads to increased susceptibility to obesity and dietary insulin resistance in mice. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2007 Jan 1;292(1):E84–91.
84. Raddatz K, Turner N, Frangioudakis G, Liao BM, Pedersen DJ, Cantley J, et al. Time-dependent effects of Prkce deletion on glucose homeostasis and hepatic lipid metabolism on dietary lipid oversupply in mice. *Diabetologia.* 2011 Feb 24;54(6):1447–56.
85. Lam TKT, Yoshii H, Haber CA, Bogdanovic E, Lam L, Fantus IG, et al. Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-δ. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2002 Oct 1;283(4):E682–91.
86. Frangioudakis G, Burchfield JG, Narasimhan S, Cooney GJ, Leitges M, Biden TJ, et al. Diverse roles for protein kinase C δ and protein kinase C ε in the generation of high-fat-diet-induced glucose intolerance in mice: regulation of lipogenesis by protein kinase C δ. *Diabetologia.* 2009 Oct 7;52(12):2616–20.
87. Bezy O, Tran TT, Pihlajamäki J, Suzuki R, Emanuelli B, Winnay J, et al. PKCδ regulates hepatic insulin sensitivity and hepatosteatosis in mice and humans. *J Clin Invest.* 2011 Jun 1;121(6):2504–17.
88. Li Y, Soos TJ, Li X, Wu J, DeGennaro M, Sun X, et al. Protein Kinase C θ Inhibits Insulin Signaling by Phosphorylating IRS1 at Ser1101. *J Biol Chem.* 2004 Oct 29;279(44):45304–7.

89. Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide Generation Is Sufficient to Account for the Inhibition of the Insulin-stimulated PKB Pathway in C2C12 Skeletal Muscle Cells Pretreated with Palmitate. *J Biol Chem.* 1999 Aug 20;274(34):24202–10.
90. Stratford S, Hoehn KL, Liu F, Summers SA. Regulation of Insulin Action by Ceramide Dual Mechanisms Linking Ceramide Accumulation To The Inhibition Of Akt/Protein Kinase B. *J Biol Chem.* 2004 Aug 27;279(35):36608–15.
91. Powell DJ, Hajdуч E, Kular G, Hundal HS. Ceramide Disables 3-Phosphoinositide Binding to the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B (PKB)/Akt by a PKC ζ -Dependent Mechanism. *Mol Cell Biol.* 2003 Nov;23(21):7794–808.
92. Blouin CM, Prado C, Takane KK, Lasnier F, Garcia-Ocana A, Ferré P, et al. Plasma Membrane Subdomain Compartmentalization Contributes to Distinct Mechanisms of Ceramide Action on Insulin Signaling. *Diabetes.* 2010 Mar;59(3):600–10.
93. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jul;8(7):519–29.
94. Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J.* 2002 Sep 1;366(Pt 2):585–94.
95. Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res.* 2007 Sep 1;48(9):1905–14.
96. Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Özdelen E, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science.* 2004 Oct 15;306(5695):457–61.
97. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Is Reduced in Tissues of Obese Subjects After Weight Loss. *Diabetes.* 2009 Mar;58(3):693–700.
98. Özcan U, Yilmaz E, Özcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, et al. Chemical Chaperones Reduce ER Stress and Restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. *Science.* 2006 Aug 25;313(5790):1137–40.
99. Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. Autocrine Tumor Necrosis Factor Alpha Links Endoplasmic Reticulum Stress to the Membrane Death Receptor Pathway through IRE1 α -Mediated NF- κ B Activation and Down-Regulation of TRAF2 Expression. *Mol Cell Biol.* 2006 Apr;26(8):3071–84.
100. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science.* 2000 Jan 28;287(5453):664–6.
101. Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil GS. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 11;103(28):10741–6.
102. Jiang H-Y, Wek SA, McGrath BC, Scheuner D, Kaufman RJ, Cavener DR, et al. Phosphorylation of the α Subunit of Eukaryotic Initiation Factor 2 Is Required for Activation of NF- κ B in Response to Diverse Cellular Stresses. *Mol Cell Biol.* 2003 Aug;23(16):5651–63.

103. Wu S, Tan M, Hu Y, Wang J-L, Scheuner D, Kaufman RJ. Ultraviolet Light Activates NF κ B through Translational Inhibition of I κ B α Synthesis. *J Biol Chem*. 2004 Aug 13;279(33):34898–902.
104. Deng J, Lu PD, Zhang Y, Scheuner D, Kaufman RJ, Sonenberg N, et al. Translational Repression Mediates Activation of Nuclear Factor Kappa B by Phosphorylated Translation Initiation Factor 2. *Mol Cell Biol*. 2004 Dec;24(23):10161–8.
105. Yamazaki H, Hiramatsu N, Hayakawa K, Tagawa Y, Okamura M, Ogata R, et al. Activation of the Akt-NF- κ B Pathway by Subtilase Cytotoxin through the ATF6 Branch of the Unfolded Protein Response. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Jul 15;183(2):1480–7.
106. Nakamura T, Furuhashi M, Li P, Cao H, Tuncman G, Sonenberg N, et al. Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase Links Pathogen Sensing with Stress and Metabolic Homeostasis. *Cell*. 2010 Feb 5;140(3):338.
107. Bonnet MC, Weil R, Dam E, Hovanessian AG, Meurs EF. PKR Stimulates NF- κ B Irrespective of Its Kinase Function by Interacting with the I κ B Kinase Complex. *Mol Cell Biol*. 2000 Jul;20(13):4532–42.
108. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29(1):415–45.
109. Clowes GH, Martin H, Walji S, Hirsch E, Gazitua R, Goodfellow R. Blood insulin responses to blood glucose levels in high output sepsis and septic shock. *Am J Surg*. 1978 Apr;135(4):577–83.
110. Wichterman KA, Chaudry IH, Baue AE. Studies of peripheral glucose uptake during sepsis. *Arch Surg*. 1979 Jun 1;114(6):740–5.
111. Iochida LC, Tominaga M, Matsumoto M, Sekikawa A, Sasaki H. Insulin resistance in septic rats--a study by the euglycemic clamp technique. *Life Sci*. 1989;45(17):1567–73.
112. Shangraw RE, Jahoor F, Miyoshi H, Neff WA, Stuart CA, Herndon DN, et al. Differentiation between septic and postburn insulin resistance. *Metabolism*. 1989 Oct;38(10):983–9.
113. Bahtiyar G, Shin JJ, Aytaman A, Sowers JR, McFarlane SI. Association of diabetes and hepatitis C infection: epidemiologic evidence and pathophysiologic insights. *Curr Diab Rep*. 2004 Jun;4(3):194–8.
114. Pao V, Lee GA, Grunfeld C. HIV Therapy, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Risk. *Curr Atheroscler Rep*. 2008 Feb;10(1):61–70.
115. Sidiropoulos PI, Karvounaris SA, Boumpas DT. Metabolic syndrome in rheumatic diseases: epidemiology, pathophysiology, and clinical implications. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(3):207.
116. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 Jan 1;259(5091):87–91.
117. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 Dec 15;112(12):1796–808.

118. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003 Dec 15;112(12):1821–30.
119. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007 Jan 2;117(1):175–84.
120. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006 Dec 14;444(7121):860–7.
121. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest.* 2008 Sep 2;118(9):2992–3002.
122. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med.* 2012 Mar;18(3):363–74.
123. Stephens JM, Pekala PH. Transcriptional repression of the C/EBP-alpha and GLUT4 genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. Regulations is coordinate and independent of protein synthesis. *J Biol Chem.* 1992 Jul 5;267(19):13580–4.
124. Holland WL, Bikman BT, Wang L-P, Yuguang G, Sargent KM, Bulchand S, et al. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest.* 2011 May 2;121(5):1858–70.
125. Lin Y, Berg AH, Iyengar P, Lam TKT, Giacca A, Combs TP, et al. The Hyperglycemia-induced Inflammatory Response in Adipocytes The Role Of Reactive Oxygen Species. *J Biol Chem.* 2005 Feb 11;280(6):4617–26.
126. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006 Nov 1;116(11):3015–25.
127. Johnson AMF, Olefsky JM. The Origins and Drivers of Insulin Resistance. *Cell.* 2013 Feb 14;152(4):673–84.
128. Gordon S, Martinez FO. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity.* 2010 May 28;32(5):593–604.
129. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec;8(12):958–69.
130. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of Th2 inflammation. *Science.* 2011 Jun 10;332(6035):1284–8.
131. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006 Jun 1;116(6):1494–505.
132. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest.* 2006 Jan 4;116(1):115–24.
133. Obstfeld AE, Soguru E, Thearle M, Francisco A-M, Gayet C, Ginsberg HN, et al. C-C Chemokine Receptor 2 (CCR2) Regulates the Hepatic Recruitment of Myeloid Cells That Promote Obesity-Induced Hepatic Steatosis. *Diabetes.* 2010 Apr;59(4):916–25.
134. Oh DY, Morinaga H, Talukdar S, Bae EJ, Olefsky JM. Increased Macrophage Migration Into Adipose Tissue in Obese Mice. *Diabetes.* 2012 Feb;61(2):346–54.

135. Klein I, Cornejo JC, Polakos NK, John B, Wuensch SA, Topham DJ, et al. Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow-derived and sessile hepatic macrophages. *Blood*. 2007 Dec 1;110(12):4077–85.
136. Neyrinck AM, Cani PD, Dewulf EM, De Backer F, Bindels LB, Delzenne NM. Critical role of Kupffer cells in the management of diet-induced diabetes and obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Jul 31;385(3):351–6.
137. Lanthier N, Molendi-Coste O, Horsmans Y, Rooijen N van, Cani PD, Leclercq IA. Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Jan 1;298(1):G107–16.
138. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, DeFuria J, Jick Z, et al. Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications. *Diabetes*. 2007 Dec 1;56(12):2910–8.
139. Kosteli A, Sogari E, Haemmerle G, Martin JF, Lei J, Zechner R, et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest*. 2010 Oct 1;120(10):3466–79.
140. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):914–20.
141. Miller R, Wen X, Dunford B, Wang X, Suzuki Y. Cytokine Production of CD8+ Immune T Cells but Not of CD4+ T Cells from Toxoplasma gondii-Infected Mice Is Polarized to a Type 1 Response Following Stimulation with Tachyzoite-Infected Macrophages. *J Interferon Cytokine Res*. 2006 Nov 1;26(11):787–92.
142. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006 Aug 1;212(1):8–27.
143. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of Obesity-Associated Insulin Resistance through Immunotherapy: CD4+ T Cells Control Glucose Homeostasis. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):921–9.
144. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):930–9.
145. Cipolletta D, Feuerer M, Li A, Kamei N, Lee J, Shoelson SE, et al. PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature*. 2012 Jun 28;486(7404):549–53.
146. Ohmura K, Ishimori N, Ohmura Y, Tokuhara S, Nozawa A, Horii S, et al. Natural Killer T Cells Are Involved in Adipose Tissues Inflammation and Glucose Intolerance in Diet-Induced Obese Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Feb 1;30(2):193–9.
147. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, et al. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med*. 2011 May;17(5):610–7.
148. Gri G, Frossi B, D’Inca F, Danelli L, Betto E, Mion F, et al. Mast Cell: An Emerging Partner in Immune Interaction. *Front Immunol*. 2012 May 25;3:120.
149. Otsuka A, Kubo M, Honda T, Egawa G, Nakajima S, Tanizaki H, et al. Requirement of Interaction between Mast Cells and Skin Dendritic Cells to Establish Contact Hypersensitivity. *PLoS ONE*. 2011 Sep 30;6(9):e25538.

150. Xu J-M, Shi G-P. Emerging Role of Mast Cells and Macrophages in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Endocr Rev.* 2012 Feb;33(1):71–108.
151. Altintas MM, Azad A, Nayer B, Contreras G, Zaias J, Faul C, et al. Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. *J Lipid Res.* 2011 Mar 1;52(3):480–8.
152. Altintas MM, Nayer B, Walford EC, Johnson KB, Gaidosh G, Reiser J, et al. Leptin deficiency-induced obesity affects the density of mast cells in abdominal fat depots and lymph nodes in mice. *Lipids Health Dis.* 2012 Feb 7;11:21.
153. Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clément K, Glickman JN, et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med.* 2009 Aug;15(8):940–5.
154. Tanaka A, Nomura Y, Matsuda A, Ohmori K, Matsuda H. Mast cells function as an alternative modulator of adipogenesis through 15-deoxy-delta-12, 14-prostaglandin J2. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2011 Dec 1;301(6):C1360–7.
155. Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Kojima K, Yano M, Yano Y, et al. Adventitial Mast Cells Contribute to Pathogenesis in the Progression of Abdominal Aortic Aneurysm. *Circ Res.* 2008 Jun 6;102(11):1368–77.
156. Triggiani M, Granata F, Frattini A, Marone G. Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A2. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 2006 Nov;1761(11):1289–300.
157. Talukdar S, Oh DY, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med.* 2012 Sep;18(9):1407–12.
158. Wu D, Molofsky AB, Liang H-E, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, et al. Eosinophils Sustain Adipose Alternatively Activated Macrophages Associated with Glucose Homeostasis. *Science.* 2011 Apr 8;332(6026):243–7.
159. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 May 24;91(11):4854–8.
160. Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor Necrosis Factor- α -induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes Is Accompanied by a Loss of Insulin Receptor Substrate-1 and GLUT4 Expression without a Loss of Insulin Receptor-mediated Signal Transduction. *J Biol Chem.* 1997 Jan 10;272(2):971–6.
161. Engelman JA, Berg AH, Lewis RY, Lisanti MP, Scherer PE. Tumor Necrosis Factor α -Mediated Insulin Resistance, but Not Dedifferentiation, Is Abrogated by MEK1/2 Inhibitors in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2000 Oct 1;14(10):1557–69.
162. Kawakami M, Murase T, Ogama H, Ishibashi S, Mori N, Takaku F, et al. Human Recombinant TNF Suppresses Lipoprotein Lipase Activity and Stimulates Lipolysis in 3T3-L1 Cells. *J Biochem (Tokyo).* 1987 Feb 1;101(2):331–8.
163. Franchini M, Monnais E, Seboek D, Radimerski T, Zini E, Kaufmann K, et al. Insulin Resistance and Increased Lipolysis in Bone Marrow Derived Adipocytes Stimulated with Agonists of Toll-like Receptors. *Horm Metab Res.* 2010 Sep;42(10):703–9.
164. Feingold KR, Doerrler W, Dinarello CA, Fiers W, Grunfeld C. Stimulation of lipolysis in cultured fat cells by tumor necrosis factor, interleukin-1, and the

- interferons is blocked by inhibition of prostaglandin synthesis. *Endocrinology*. 1992 Jan 1;130(1):10–6.
165. Rydén M, Dicker A, Harmelen V van, Hauner H, Brunnberg M, Perbeck L, et al. Mapping of Early Signaling Events in Tumor Necrosis Factor- α -mediated Lipolysis in Human Fat Cells. *J Biol Chem*. 2002 Jan 11;277(2):1085–91.
166. Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS. Tumor Necrosis Factor- α Stimulates Lipolysis in Differentiated Human Adipocytes Through Activation of Extracellular Signal-Related Kinase and Elevation of Intracellular cAMP. *Diabetes*. 2002 Oct 1;51(10):2929–35.
167. Granneman JG, Moore H-PH, Granneman RL, Greenberg AS, Obin MS, Zhu Z. Analysis of Lipolytic Protein Trafficking and Interactions in Adipocytes. *J Biol Chem*. 2007 Feb 23;282(8):5726–35.
168. Granneman JG, Moore H-PH, Krishnamoorthy R, Rathod M. Perilipin Controls Lipolysis by Regulating the Interactions of AB-hydrolase Containing 5 (Abhd5) and Adipose Triglyceride Lipase (Atgl). *J Biol Chem*. 2009 Dec 11;284(50):34538–44.
169. Bézaire V, Mairal A, Anesia R, Lefort C, Langin D. Chronic TNF α and cAMP pre-treatment of human adipocytes alter HSL, ATGL and perilipin to regulate basal and stimulated lipolysis. *FEBS Lett*. 2009 Sep 17;583(18):3045–9.
170. Laurencikiene J, Harmelen V van, Nordström EA, Dicker A, Blomqvist L, Näslund E, et al. NF- κ B is important for TNF- α -induced lipolysis in human adipocytes. *J Lipid Res*. 2007 May 1;48(5):1069–77.
171. Ranjit S, Boutet E, Gandhi P, Prot M, Tamori Y, Chawla A, et al. Regulation of fat specific protein 27 by isoproterenol and TNF- α to control lipolysis in murine adipocytes. *J Lipid Res*. 2011 Feb 1;52(2):221–36.
172. Yang X, Zhang X, Heckmann BL, Lu X, Liu J. Relative Contribution of Adipose Triglyceride Lipase and Hormone-sensitive Lipase to Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)-induced Lipolysis in Adipocytes. *J Biol Chem*. 2011 Nov 25;286(47):40477–85.
173. Zu L, He J, Jiang H, Xu C, Pu S, Xu G. Bacterial Endotoxin Stimulates Adipose Lipolysis via Toll-Like Receptor 4 and Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway. *J Biol Chem*. 2009 Feb 27;284(9):5915–26.
174. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 May;9(5):367–77.
175. Trujillo ME, Scherer PE. Adiponectin – journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med*. 2005 Feb 1;257(2):167–75.
176. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nat Med*. 2005 Feb;11(2):183–90.
177. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li Z-W, Long JM, et al. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005 Feb;11(2):191–8.
178. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002 Nov 21;420(6913):333–6.

179. Sabio G, Cavanagh-Kyros J, Ko HJ, Jung DY, Gray S, Jun JY, et al. Prevention of Steatosis by Hepatic JNK1. *Cell Metab.* 2009 Dec;10(6):491–8.
180. Feingold KR, Grunfeld C. Tumor necrosis factor-alpha stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo. *J Clin Invest.* 1987 Jul;80(1):184–90.
181. Grunfeld C, Adi S, Soued M, Moser A, Fiers W, Feingold KR. Search for Mediators of the Lipogenic Effects of Tumor Necrosis Factor: Potential Role for Interleukin 6. *Cancer Res.* 1990 Jul 15;50(14):4233–8.
182. Feingold KR, Staprans I, Memon RA, Moser AH, Shigenaga JK, Doerrler W, et al. Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance. *J Lipid Res.* 1992 Dec 1;33(12):1765–76.
183. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006 Jul 3;116(7):1793–801.
184. Febbraio MA, Steensberg A, Starkie RL, McConell GK, Kingwell BA. Skeletal muscle interleukin-6 and tumor necrosis factor- α release in healthy subjects and patients with type 2 diabetes at rest and during exercise. *Metabolism.* 2003 Jul;52(7):939–44.
185. Carey AL, Bruce CR, Sacchetti M, Anderson MJ, Olsen DB, Saltin B, et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor- α are not increased in patients with Type 2 diabetes: evidence that plasma interleukin-6 is related to fat mass and not insulin responsiveness. *Diabetologia.* 2004 May 28;47(6):1029–37.
186. Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest.* 1996 Feb 15;97(4):1111–6.
187. Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Melendez PA, Oh B-C, Lidov HGW, et al. IKK β /NF- κ B Activation Causes Severe Muscle Wasting in Mice. *Cell.* 2004 Oct 15;119(2):285–98.
188. Röhl M, Pasparakis M, Baudler S, Baumgartl J, Gautam D, Huth M, et al. Conditional disruption of I κ B kinase 2 fails to prevent obesity-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2004 Feb 1;113(3):474–81.
189. Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zierath JR, Pedersen BK. Tumor Necrosis Factor- α Induces Skeletal Muscle Insulin Resistance in Healthy Human Subjects via Inhibition of Akt Substrate 160 Phosphorylation. *Diabetes.* 2005 Oct 1;54(10):2939–45.
190. Wolsk E, Mygind H, Grøndahl TS, Pedersen BK, Hall G van. IL-6 selectively stimulates fat metabolism in human skeletal muscle. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2010 Nov 1;299(5):E832–40.
191. Wegrzyn J, Potla R, Chwae Y-J, Sepuri NBV, Zhang Q, Koeck T, et al. Function of Mitochondrial Stat3 in Cellular Respiration. *Science.* 2009 Feb 6;323(5915):793–7.
192. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus. *Endocrinology.* 2005 Oct 1;146(10):4192–9.
193. Obici S, Rossetti L. Minireview: Nutrient Sensing and the Regulation of Insulin Action and Energy Balance. *Endocrinology.* 2003 Dec 1;144(12):5172–8.

194. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER Stress Link Overnutrition to Energy Imbalance and Obesity. *Cell*. 2008 Oct 3;135(1):61–73.
195. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity. *J Neurosci*. 2009 Jan 14;29(2):359–70.
196. Milanski M, Arruda AP, Coope A, Ignacio-Souza LM, Nunez CE, Roman EA, et al. Inhibition of Hypothalamic Inflammation Reverses Diet-Induced Insulin Resistance in the Liver. *Diabetes*. 2012 Jun;61(6):1455–62.
197. Sabio G, Cavanagh-Kyros J, Barrett T, Jung DY, Ko HJ, Ong H, et al. Role of the hypothalamic–pituitary–thyroid axis in metabolic regulation by JNK1. *Genes Dev*. 2010 Feb 1;24(3):256–64.
198. Belgardt BF, Mauer J, Wunderlich FT, Ernst MB, Pal M, Spohn G, et al. Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 30;107(13):6028–33.
199. Steil GM, Trivedi N, Jonas J-C, Hasenkamp WM, Sharma A, Bonner-Weir S, et al. Adaptation of β -cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2001 May 1;280(5):E788–96.
200. Jetton TL, Lausier J, LaRock K, Trotman WE, Larmie B, Habibovic A, et al. Mechanisms of Compensatory β -Cell Growth in Insulin-Resistant Rats Roles of Akt Kinase. *Diabetes*. 2005 Aug 1;54(8):2294–304.
201. Liu YQ, Jetton TL, Leahy JL. β -Cell Adaptation to Insulin Resistance Increased Pyruvate Carboxylase And Malate-Pyruvate Shuttle Activity In Islets Of Nondiabetic Zucker Fatty Rats. *J Biol Chem*. 2002 Oct 18;277(42):39163–8.
202. Chen C, Hosokawa H, Bumbalo LM, Leahy JL. Mechanism of compensatory hyperinsulinemia in normoglycemic insulin-resistant spontaneously hypertensive rats. Augmented enzymatic activity of glucokinase in beta-cells. *J Clin Invest*. 1994 Jul;94(1):399–404.
203. Prentki M, Nolan CJ. Islet β cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006 Jul 3;116(7):1802–12.
204. Srinivasan S, Bernal-Mizrachi E, Ohsugi M, Permutt MA. Glucose promotes pancreatic islet β -cell survival through a PI 3-kinase/Akt-signaling pathway. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2002 Oct 1;283(4):E784–93.
205. Van Citters GW, Kabir M, Kim SP, Mittelman SD, Dea MK, Brubaker PL, et al. Elevated Glucagon-Like Peptide-1-(7–36)-Amide, but Not Glucose, Associated with Hyperinsulinemic Compensation for Fat Feeding. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Nov 1;87(11):5191–8.
206. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab*. 2006 Mar 1;3(3):153–65.
207. Van Haeften TW, Twickler TB. Insulin-like growth factors and pancreas beta cells. *Eur J Clin Invest*. 2004 Apr 1;34(4):249–55.

208. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):173–6.
209. Hardy S, St-Onge GG, Joly É, Langelier Y, Prentki M. Oleate Promotes the Proliferation of Breast Cancer Cells via the G Protein-coupled Receptor GPR40. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):13285–91.
210. Jhala US, Canettieri G, Sreaton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, et al. cAMP promotes pancreatic β -cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev*. 2003 Jul 1;17(13):1575–80.
211. Buteau J, Foisy S, Joly E, Prentki M. Glucagon-Like Peptide 1 Induces Pancreatic β -Cell Proliferation Via Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Diabetes*. 2003 Jan 1;52(1):124–32.
212. Meglasson MD, Matschinsky FM. Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev*. 1986 Jan 1;2(3-4):163–214.
213. Prentki M. New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc*. 1996 Mar;134(3):272–86.
214. MacDonald MJ. Feasibility of a Mitochondrial Pyruvate Malate Shuttle in Pancreatic Islets Further Implication Of Cytosolic NADPH In Insulin Secretion. *J Biol Chem*. 1995 Aug 25;270(34):20051–8.
215. Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R. Malonyl-CoA Signaling, Lipid Partitioning, and Glucolipotoxicity Role in β -Cell Adaptation and Failure in the Etiology of Diabetes. *Diabetes*. 2002 Dec 1;51(suppl 3):S405–13.
216. Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, Edlund H. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab*. 2005 Apr 1;1(4):245–58.
217. Deeney JT, Gromada J, Høy M, Olsen HL, Rhodes CJ, Prentki M, et al. Acute Stimulation with Long Chain Acyl-CoA Enhances Exocytosis in Insulin-secreting Cells (HIT T-15 and NMRI β -Cells). *J Biol Chem*. 2000 Mar 31;275(13):9363–8.
218. Farese RV, Dimarco PE, Barnes DE, Sabir MA, Larson RE, Davis JS, et al. Rapid Glucose-Dependent Increases in Phosphatidic Acid and Phosphoinositides in Rat Pancreatic Islets. *Endocrinology*. 1986 Apr 1;118(4):1498–503.
219. Yaney GC, Korchak HM, Corkey BE. Long-Chain Acyl CoA Regulation of Protein Kinase C and Fatty Acid Potentiation of Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Clonal β -Cells. *Endocrinology*. 2000 Jun 1;141(6):1989–98.
220. Yajima H, Komatsu M, Yamada S, Straub SG, Kaneko T, Sato Y, et al. Cerulenin, an inhibitor of protein acylation, selectively attenuates nutrient stimulation of insulin release: a study in rat pancreatic islets. *Diabetes*. 2000 May 1;49(5):712–7.
221. Melloul D, Marshak S, Cerasi E. Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia*. 2014 Apr 5;45(3):309–26.
222. Ahrén B. Autonomic regulation of islet hormone secretion – Implications for health and disease. *Diabetologia*. 2000 Apr;43(4):393–410.
223. Kiba T, Tanaka K, Numata K, Hoshino M, Misugi K, Inoue S. Ventromedial hypothalamic lesion-induced vagal hyperactivity stimulates rat pancreatic cell proliferation. *Gastroenterology*. 1996 Mar;110(3):885–93.

224. Magnan C, Collins S, Berthault M-F, Kassis N, Vincent M, Gilbert M, et al. Lipid infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased β -cell responsiveness to glucose. *J Clin Invest*. 1999 Feb 1;103(3):413-9.
225. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengellér Z, Szabó C, et al. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest*. 2003 Oct 1;112(7):1049-57.
226. Brownlee M. A radical explanation for glucose-induced β cell dysfunction. *J Clin Invest*. 2003 Dec 15;112(12):1788-90.
227. Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial Dysfunction and Type 2 Diabetes. *Science*. 2005 Jan 21;307(5708):384-7.
228. Krauss S, Zhang C-Y, Scorrano L, Dalgaard LT, St-Pierre J, Grey ST, et al. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic β cell dysfunction. *J Clin Invest*. 2003 Dec 15;112(12):1831-42.
229. Lameloise N, Muzzin P, Prentki M, Assimacopoulos-Jeannet F. Uncoupling Protein 2: A Possible Link Between Fatty Acid Excess and Impaired Glucose-Induced Insulin Secretion? *Diabetes*. 2001 Apr 1;50(4):803-9.
230. Kooptiwut S, Zraika S, Thorburn AW, Dunlop ME, Darwiche R, Kay TW, et al. Comparison of Insulin Secretory Function in Two Mouse Models with Different Susceptibility to β -Cell Failure. *Endocrinology*. 2002 Jun 1;143(6):2085-92.
231. Simmons RA, Saponitsky-Kroyter I, Selak MA. Progressive Accumulation of Mitochondrial DNA Mutations and Decline in Mitochondrial Function Lead to β -Cell Failure. *J Biol Chem*. 2005 Aug 5;280(31):28785-91.
232. Iizuka K, Nakajima H, Namba M, Miyagawa J, Miyazaki J, Hanafusa T, et al. Metabolic consequence of long-term exposure of pancreatic β cells to free fatty acid with special reference to glucose insensitivity. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2002 Jan 2;1586(1):23-31.
233. MacDonald MJ, Tang J, Polonsky KS. Low mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes*. 1996 Nov;45(11):1626-30.
234. MacDonald MJ, Efendić S, Ostenson CG. Normalization by insulin treatment of low mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in pancreatic islets of the GK rat. *Diabetes*. 1996 Jul;45(7):886-90.
235. Prentki M, Corkey BE. Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes*. 1996 Mar;45(3):273-83.
236. Robertson RP. Chronic Oxidative Stress as a Central Mechanism for Glucose Toxicity in Pancreatic Islet Beta Cells in Diabetes. *J Biol Chem*. 2004 Oct 8;279(41):42351-4.
237. Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH. Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 8;91(23):10878-82.

238. Donath MY, Ehses JA, Maedler K, Schumann DM, Ellingsgaard H, Eppler E, et al. Mechanisms of β -Cell Death in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2005 Dec 1;54(suppl 2):S108–13.
239. O'Brien TD, Butler PC, Westermarck P, Johnson KH. Islet Amyloid Polypeptide: A Review of Its Biology and Potential Roles in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Vet Pathol Online*. 1993 Jul 1;30(4):317–32.
240. Laybutt DR, Glandt M, Xu G, Ahn YB, Trivedi N, Bonner-Weir S, et al. Critical Reduction in β -Cell Mass Results in Two Distinct Outcomes over Time Adaptation With Impaired Glucose Tolerance Or Decompensated Diabetes. *J Biol Chem*. 2003 Jan 31;278(5):2997–3005.
241. Owen KR, McCarthy MI. Genetics of type 2 diabetes. *Curr Opin Genet Dev*. 2007 Jun;17(3):239–44.
242. Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes Mellitus and the β Cell: The Last Ten Years. *Cell*. 2012 Mar 16;148(6):1160–71.
243. Bonnefond A, Froguel P, Vaxillaire M. The emerging genetics of type 2 diabetes. *Trends Mol Med*. 2010 Sep;16(9):407–16.
244. Grant SFA, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2006 Mar;38(3):320–3.
245. Helgason A, Pálsson S, Thorleifsson G, Grant SFA, Emilsson V, Gunnarsdottir S, et al. Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat Genet*. 2007 Feb;39(2):218–25.
246. Humphries SE, Gable D, Cooper JA, Ireland H, Stephens JW, Hurel SJ, et al. Common variants in the TCF7L2 gene and predisposition to type 2 diabetes in UK European Whites, Indian Asians and Afro-Caribbean men and women. *J Mol Med Berl Ger*. 2006 Dec;84(12):1005–14.
247. Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, et al. Weight Loss with a Low-Carbohydrate, Mediterranean, or Low-Fat Diet. *N Engl J Med*. 2008 Jul 17;359(3):229–41.
248. Ajala O, English P, Pinkney J. Systematic review and meta-analysis of different dietary approaches to the management of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2013 Mar 1;97(3):505–16.
249. Elhayany A, Lustman A, Abel R, Attal-Singer J, Vinker S. A low carbohydrate Mediterranean diet improves cardiovascular risk factors and diabetes control among overweight patients with type 2 diabetes mellitus: a 1-year prospective randomized intervention study. *Diabetes Obes Metab*. 2010 Mar 1;12(3):204–9.
250. Kastorini C-M. Mediterranean diet and diabetes prevention: Myth or fact? *World J Diabetes*. 2010;1(3):65.
251. Ortega R. Importance of functional foods in the Mediterranean diet. *Public Health Nutr*. 2006 Dec;9(8A):1136–40.
252. Mantzoros CS, Williams CJ, Manson JE, Meigs JB, Hu FB. Adherence to the Mediterranean dietary pattern is positively associated with plasma adiponectin concentrations in diabetic women. *Am J Clin Nutr*. 2006 Aug 1;84(2):328–35.
253. Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev*. 2005 Feb 1;6(1):13–21.

254. Serra-Majem L, Roman B, Estruch R. Scientific Evidence of Interventions Using the Mediterranean Diet: a Systematic Review. *Nutr Rev.* 2006 Feb 1;64(suppl 1):S27–47.
255. Deer J, Koska J, Ozias M, Reaven P. Dietary models of insulin resistance. *Metabolism.* 2015 Feb;64(2):163–71.
256. Fierens S, Mairesse H, Heilier J, Burbure CD, Focant J, Eppe G, et al. Dioxin/polychlorinated biphenyl body burden, diabetes and endometriosis: findings in a population-based study in Belgium. *Biomarkers.* 2003 Nov 1;8(6):529–34.
257. Rylander L, Rignell-Hydbom A, Hagmar L. A cross-sectional study of the association between persistent organochlorine pollutants and diabetes. *Environ Health Glob Access Sci Source.* 2005;4:28.
258. Lee D-H, Lee I-K, Song K, Steffes M, Toscano W, Baker BA, et al. A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999-2002. *Diabetes Care.* 2006 Jul;29(7):1638–44.
259. Lee D-H, Lee I-K, Jin S-H, Steffes M, Jacobs DR. Association Between Serum Concentrations of Persistent Organic Pollutants and Insulin Resistance Among Nondiabetic Adults Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Diabetes Care.* 2007 Mar 1;30(3):622–8.
260. Liu PC, Matsumura F. Differential effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the “adipose- type” and “brain-type” glucose transporters in mice. *Mol Pharmacol.* 1995 Jan 1;47(1):65–73.
261. Sato S, Shirakawa H, Tomita S, Ohsaki Y, Haketa K, Tooi O, et al. Low-dose dioxins alter gene expression related to cholesterol biosynthesis, lipogenesis, and glucose metabolism through the aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway in mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008 May 15;229(1):10–9.
262. Rozman KK. Search for the mechanism of toxicity of dioxins. *Exp Toxicol Pathol.* 1992 Dec 1;44(8):473–80.
263. Kurita H, Yoshioka W, Nishimura N, Kubota N, Kadowaki T, Tohyama C. Aryl hydrocarbon receptor-mediated effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on glucose-stimulated insulin secretion in mice. *J Appl Toxicol.* 2009 Nov 1;29(8):689–94.
264. Yang J-H, Vogel C, Abel J. A malignant transformation of human cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exhibits altered expressions of growth regulatory factors. *Carcinogenesis.* 1999 Jan 1;20(1):13–8.
265. Khalil A, Villard P-H, Dao MA, Burcelin R, Champion S, Fouchier F, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons potentiate high-fat diet effects on intestinal inflammation. *Toxicol Lett.* 2010 Jul 15;196(3):161–7.
266. Zordoky BNM, El-Kadi AOS. Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes. *Curr Drug Metab.* 2009 Feb;10(2):164–78.
267. Wang C, Xu C-X, Krager SL, Bottum KM, Liao D-F, Tischkau SA. Aryl Hydrocarbon Receptor Deficiency Enhances Insulin Sensitivity and Reduces PPAR- α Pathway Activity in Mice. *Environ Health Perspect.* 2011 Dec;119(12):1739–44.
268. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):837–48.

269. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2010 Jul 1;90(3):859–904.
270. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science.* 2005 Jun 10;308(5728):1635–8.
271. Mändar R, Mikelsaar M. Transmission of mother’s microflora to the newborn at birth. *Biol Neonate.* 1996;69(1):30–5.
272. Bezirtzoglou E. The Intestinal Microflora During the First Weeks of Life. *Anaerobe.* 1997 Apr;3(2–3):173–7.
273. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 1999 May 1;69(5):1035s – 1045s.
274. Cummings J h., Macfarlane G t. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol.* 1991 Jun 1;70(6):443–59.
275. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 2;101(44):15718–23.
276. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2007 Jan 16;104(3):979–84.
277. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate Improves Insulin Sensitivity and Increases Energy Expenditure in Mice. *Diabetes.* 2009 Jul;58(7):1509–17.
278. Lin HV, Frassetto A, Kowalik Jr EJ, Nawrocki AR, Lu MM, Kosinski JR, et al. Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms. *PLoS ONE.* 2012 Apr 10;7(4):e35240.
279. Brahe LK, Astrup A, Larsen LH. Is butyrate the link between diet, intestinal microbiota and obesity-related metabolic diseases? *Obes Rev.* 2013 Dec 1;14(12):950–9.
280. Everard A, Cani PD. Gut microbiota and GLP-1. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014 Sep;15(3):189–96.
281. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.* 2010 Mar;10(3):159–69.
282. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell.* 2005 Jul 15;122(1):107–18.
283. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature.* 2008 May 29;453(7195):620–5.
284. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006 Dec 21;444(7122):1027–131.
285. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006 Dec 21;444(7122):1022–3.
286. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012 Oct 4;490(7418):55–60.

287. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013 Jun 6;498(7452):99–103.
288. Sato J, Kanazawa A, Ikeda F, Yoshihara T, Goto H, Abe H, et al. Gut Dysbiosis and Detection of “Live Gut Bacteria” in Blood of Japanese Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2014 Aug 1;37(8):2343–50.
289. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, et al. Human Gut Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance. *PLOS ONE*. 2013 Aug 27;8(8):e71108.
290. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007 Jul;56(7):1761–72.
291. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr*. 2007 Nov 1;86(5):1286–92.
292. Harte AL, Varma MC, Tripathi G, McGee KC, Al-Daghri NM, Al-Attas OS, et al. High Fat Intake Leads to Acute Postprandial Exposure to Circulating Endotoxin in Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes Care*. 2012 Feb 1;35(2):375–82.
293. Hildebrandt MA, Hoffman C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen Y-Y, et al. High Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. *Gastroenterology*. 2009 Nov;137(5):1716–24.e1–2.
294. Membrez M, Blancher F, Jaquet M, Bibiloni R, Cani PD, Burcelin RG, et al. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB J*. 2008 Jul 1;22(7):2416–26.
295. Rabot S, Membrez M, Bruneau A, Gérard P, Harach T, Moser M, et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J*. 2010 Dec 1;24(12):4948–59.
296. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004 Jul 8;430(6996):257–63.
297. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009 Oct 29;461(7268):1282–6.
298. Yokoyama MT, Carlson JR. Microbial metabolites of tryptophan in the intestinal tract with special reference to skatole. *Am J Clin Nutr*. 1979 Jan;32(1):173–8.
299. DeMoss RD, Moser K. Tryptophanase in Diverse Bacterial Species. *J Bacteriol*. 1969 Apr;98(1):167–71.
300. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab*. 2009 Sep;10(3):167–77.
301. Bala V, Rajagopal S, Kumar DP, Nalli AD, Mahavadi S, Sanyal AJ, et al. Release of GLP-1 and PYY in response to the activation of G protein-coupled bile acid receptor TGR5 is mediated by Epac/PLC- ϵ pathway and modulated by endogenous H₂S. *Front Physiol*. 2014 Nov 3;5:420.
302. Cani PD, Possemiers S, Wiele TV de, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009 Aug 1;58(8):1091–103.

303. Delzenne NM, Cani PD, Everard A, Neyrinck AM, Bindels LB. Gut microorganisms as promising targets for the management of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2015 Jul 31;58(10):2206–17.
304. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 10;106(10):3698–703.
305. Allin KH, Nielsen T, Pedersen O. Mechanisms in endocrinology: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 2015 Apr 1;172(4):R167–77.
306. Takaoka MJ. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *J Fac Sci Hokkaido Imp Univ*. 1940;3:1–16.
307. Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A. Chemical Constituents Of Polygonaceous Plants. I. Studies On The Components Of KO-J O-KON. (*POLYGONUM CUSPIDATUM* SIEB. ET ZUCC.). *Yakugaku Zasshi*. 1963 Oct;83:988–90.
308. Das DK, Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv*. 2006 Feb;6(1):36–47.
309. Lee SK, Mbwambo ZH, Chung H, Luyengi L, Gamez EJ, Mehta RG, et al. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb Chem High Throughput Screen*. 1998 Apr;1(1):35–46.
310. Vastano BC, Chen Y, Zhu N, Ho C-T, Zhou Z, Rosen RT. Isolation and Identification of Stilbenes in Two Varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J Agric Food Chem*. 2000 Feb 1;48(2):253–6.
311. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean MEJ, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem*. 2002 May 22;50(11):3337–40.
312. Langcake P, Pryce RJ. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol*. 1976 Jul;9(1):77–86.
313. Siemann EH, Creasy LL. Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *Am J Enol Vitic*. 1992 Jan 1;43(1):49–52.
314. Maier-Salamon A, Böhmendorfer M, Thalhammer T, Szekeres T, Jaeger W. Hepatic Glucuronidation of Resveratrol: Interspecies Comparison of Enzyme Kinetic Profiles in Human, Mouse, Rat, and Dog. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2011;26(4):364–73.
315. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem*. 1997 Mar;30(2):91–113.
316. Sato M, Maulik G, Bagchi D, Das DK. Myocardial protection by Protykin, a novel extract of trans-resveratrol and emodin. *Free Radic Res*. 2000 Jan 1;32(2):135–44.
317. Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2015 Jun 28;2015:2015:e837042.
318. R. Neves A, Lucio M, L.C. Lima J, Reis S. Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions. *Curr Med Chem*. 2012 Mar 1;19(11):1663–81.
319. Jeandet P, Douillet-Breuil A-C, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M. Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in

- Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *J Agric Food Chem.* 2002 May 1;50(10):2731-41.
320. Langcake P, Pryce RJ. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia.* 1977 Feb;33(2):151-2.
321. Adrian M, Jeandet P, Veneau J, Weston LA, Bessis R. Biological Activity of Resveratrol, a Stilbenic Compound from Grapevines, Against *Botrytis cinerea*, the Causal Agent for Gray Mold. *J Chem Ecol.* 1997 Jul;23(7):1689-702.
322. Hathway DE, Seakins JWT. Hydroxystilbenes of *Eucalyptus wandoo*. *Biochem J.* 1959 Jul;72(3):369-74.
323. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta.* 1995 Mar 31;235(2):207-19.
324. Ferrero ME, Bertelli AAE, Pellegatta F, Fulgenzi A, Corsi MM, Bertelli A. Phytoalexin resveratrol (3-4'-5-trihydroxystilbene) modulates granulocyte and monocyte endothelial adhesion. *Transplant Proc.* 1998 Dec;30(8):4191-3.
325. Ferrero ME, Bertelli AE, Fulgenzi A, Pellegatta F, Corsi MM, Bonfrate M, et al. Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *Am J Clin Nutr.* 1998 Dec 1;68(6):1208-14.
326. Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle.* 2008 Apr 15;7(8):1020-35.
327. Chen X, He H, Wang G, Yang B, Ren W, Ma L, et al. Stereospecific determination of cis- and trans-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. *Biomed Chromatogr.* 2007 Mar 1;21(3):257-65.
328. Camont L, Cottart C-H, Rhayem Y, Nivet-Antoine V, Djelidi R, Collin F, et al. Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Anal Chim Acta.* 2009 Feb 16;634(1):121-8.
329. Blache D, Rustan I, Durand P, Lesgards G, Loreau N. Gas chromatographic analysis of resveratrol in plasma, lipoproteins and cells after in vitro incubations. *J Chromatogr B Biomed Sci App.* 1997 Nov 21;702(1-2):103-10.
330. Basly J-P, Marre-Fournier F, Le Bail J-C, Habrioux G, Chulia AJ. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sci.* 2000 Jan 21;66(9):769-77.
331. Trela BC, Waterhouse AL. Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability. *J Agric Food Chem.* 1996 Jan 1;44(5):1253-7.
332. Cottart C-H, Nivet-Antoine V, Laguillier-Morizot C, Beaudeau J-L. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol Nutr Food Res.* 2010 Jan 1;54(1):7-16.
333. Poulsen MM, Vestergaard PF, Clasen BF, Radko Y, Christensen LP, Stødkilde-Jørgensen H, et al. High-Dose Resveratrol Supplementation in Obese Men An Investigator-Initiated, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial of Substrate Metabolism, Insulin Sensitivity, and Body Composition. *Diabetes.* 2013 Apr 1;62(4):1186-95.
334. Yoshino J, Conte C, Fontana L, Mittendorfer B, Imai S, Schechtman KB, et al. Resveratrol Supplementation Does Not Improve Metabolic Function in Nonobese Women with Normal Glucose Tolerance. *Cell Metab.* 2012 Jul 11;16(5):658-64.

335. Cottart C-H, Nivet-Antoine V, Beaudeau J-L. Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans. *Mol Nutr Food Res.* 2014 Jan 1;58(1):7–21.
336. Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, Ghidini C, Caporaso N, Vescovi PP, et al. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol Nutr Food Res.* 2005 May 1;49(5):495–504.
337. Delmas D, Aires V, Limagne E, Dutartre P, Mazué F, Ghiringhelli F, et al. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Jan 1;1215(1):48–59.
338. Vitrac X, Desmoulière A, Brouillaud B, Krisa S, Deffieux G, Barthe N, et al. Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.* 2003 Apr 4;72(20):2219–33.
339. Juan ME, Maijó M, Planas JM. Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* 2010 Jan 20;51(2):391–8.
340. Sale S, Verschoyle RD, Boocock D, Jones DJL, Wilsher N, Ruparelia KC, et al. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene. *Br J Cancer.* 2004 Feb 9;90(3):736–44.
341. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. High Absorption but Very Low Bioavailability of Oral Resveratrol in Humans. *Drug Metab Dispos.* 2004 Dec 1;32(12):1377–82.
342. Maier-Salamon A, Böhmendorfer M, Riha J, Thalhammer T, Szekeres T, Jaeger W. Interplay between metabolism and transport of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 Jul 1;1290(1):98–106.
343. Wang L-X, Heredia A, Song H, Zhang Z, Yu B, Davis C, et al. Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: Characterization, synthesis, and anti-HIV activity. *J Pharm Sci.* 2004 Oct 1;93(10):2448–57.
344. Marier J-F, Vachon P, Gritsas A, Zhang J, Moreau J-P, Ducharme MP. Metabolism and Disposition of Resveratrol in Rats: Extent of Absorption, Glucuronidation, and Enterohepatic Recirculation Evidenced by a Linked-Rat Model. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Jul 1;302(1):369–73.
345. Boocock DJ, Patel KR, Faust GES, Normolle DP, Marczylo TH, Crowell JA, et al. Quantitation of trans-resveratrol and detection of its metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B.* 2007 Apr 1;848(2):182–7.
346. De Santi C, Pietrabissa A, Mosca F, Pacifici GM. Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver. *Xenobiotica.* 2000 Jan;30(11):1047–54.
347. De Santi C, Pietrabissa A, Spisni R, Mosca F, Pacifici GM. Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. *Xenobiotica.* 2000 Jan;30(9):857–66.
348. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res.* 2005 May 1;49(5):472–81.

349. Williams LD, Burdock GA, Edwards JA, Beck M, Bausch J. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food Chem Toxicol.* 2009 Sep;47(9):2170–82.
350. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, et al. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science.* 1997 Jan 10;275(5297):218–20.
351. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 2006 Nov 16;444(7117):337–42.
352. Park E-J, Pezzuto JM. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2015 Jun;1852(6):1071–113.
353. Dao T-MA. Inflammation intestinale et diabète de type 2 : effet du Resveratrol. [Marseille, France]: Université de la Méditerranée (Aix Marseille 2); 2011.
354. Zhu J, Yong W, Wu X, Yu Y, lv J, Liu C, et al. Anti-inflammatory effect of resveratrol on TNF- α -induced MCP-1 expression in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 May 2;369(2):471–7.
355. Csiszar A, Smith K, Labinskyy N, Orosz Z, Rivera A, Ungvari Z. Resveratrol attenuates TNF- α -induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF- κ B inhibition. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 2006 Oct 1;291(4):H1694–9.
356. Knobloch J, Wahl C, Feldmann M, Jungck D, Strauch J, Stoelben E, et al. Resveratrol Attenuates the Release of Inflammatory Cytokines from Human Bronchial Smooth Muscle Cells Exposed to Lipoteichoic Acid in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014 Feb 1;114(2):202–9.
357. Shakibaei M, Csaki C, Nebrich S, Mobasheri A. Resveratrol suppresses interleukin-1 β -induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: Potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol.* 2008 Dec 1;76(11):1426–39.
358. Candelario-Jalil E, Oliveira AC de, Gräf S, Bhatia HS, Hüll M, Muñoz E, et al. Resveratrol potently reduces prostaglandin E2 production and free radical formation in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *J Neuroinflammation.* 2007 Oct 10;4(1):25.
359. Ølholm J, Paulsen SK, Cullberg KB, Richelsen B, Pedersen SB. Anti-inflammatory effect of resveratrol on adipokine expression and secretion in human adipose tissue explants. *Int J Obes.* 2010 Oct;34(10):1546–53.
360. Pendurthi UR, Rao LVM. Resveratrol suppresses agonist-induced monocyte adhesion to cultured human endothelial cells. *Thromb Res.* 2002 May 15;106(4–5):243–8.
361. Zhong M, Cheng GF, Wang WJ, Guo Y, Zhu XY, Zhang JT. Inhibitory effect of resveratrol on interleukin 6 release by stimulated peritoneal macrophages of mice. *Phytomedicine.* 1999 May;6(2):79–84.
362. Gao X, Xu YX, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam* SC. Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production1. *Biochem Pharmacol.* 2001 Nov 1;62(9):1299–308.

363. Feng Y-H, Zou J-P, Li X-Y. Effects of resveratrol and ethanol on production of pro-inflammatory factors from endotoxin activated murine macrophages. *Acta Pharmacol Sin.* 2002 Nov;23(11):1002-6.
364. Cho D-I, Koo N-Y, Chung WJ, Kim T-S, Ryu SY, Im SY, et al. Effects of resveratrol-related hydroxystilbenes on the nitric oxide production in macrophage cells: structural requirements and mechanism of action. *Life Sci.* 2002 Sep 13;71(17):2071-82.
365. Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, et al. Resveratrol Inhibits Cyclooxygenase-2 Transcription and Activity in Phorbol Ester-treated Human Mammary Epithelial Cells. *J Biol Chem.* 1998 Aug 21;273(34):21875-82.
366. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol Suppresses TNF-Induced Activation of Nuclear Transcription Factors NF- κ B, Activator Protein-1, and Apoptosis: Potential Role of Reactive Oxygen Intermediates and Lipid Peroxidation. *J Immunol.* 2000 Jun 15;164(12):6509-19.
367. Kim MH, Yoo DS, Lee SY, Byeon SE, Lee YG, Min T, et al. The TRIF/TBK1/IRF-3 activation pathway is the primary inhibitory target of resveratrol, contributing to its broad-spectrum anti-inflammatory effects. *Pharm.* 2011 Apr;66(4):293-300.
368. Holmes-McNary M, Baldwin AS. Chemopreventive Properties of trans-Resveratrol Are Associated with Inhibition of Activation of the I κ B Kinase. *Cancer Res.* 2000 Jul 1;60(13):3477-83.
369. Busch F, Mobasher A, Shayan P, Lueders C, Stahlmann R, Shakibaei M. Resveratrol modulates IL-1 β -induced PI3K and NF- κ B signaling pathways in human tenocytes. *J Biol Chem.* 2012 Aug 30;jbc.M112.377028.
370. Bagul PK, Deepthi N, Sultana R, Banerjee SK. Resveratrol ameliorates cardiac oxidative stress in diabetes through deacetylation of NF κ B-p65 and histone 3. *J Nutr Biochem.* 2015 Nov;26(11):1298-307.
371. Martín AR, Villegas I, Sánchez-Hidalgo M, De La Lastra CA. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br J Pharmacol.* 2006 Apr 1;147(8):873-85.
372. Bereswill S, Muñoz M, Fischer A, Plickert R, Haag L-M, Otto B, et al. Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol, Curcumin and Simvastatin in Acute Small Intestinal Inflammation. *PLoS ONE.* 2010 Dec 3;5(12):e15099.
373. Kubota S, Kurihara T, Mochimaru H, Satofuka S, Noda K, Ozawa Y, et al. Prevention of Ocular Inflammation in Endotoxin-Induced Uveitis with Resveratrol by Inhibiting Oxidative Damage and Nuclear Factor- κ B Activation. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2009 Jul 1;50(7):3512.
374. Poulsen MM, Fjeldborg K, Ornstrup MJ, Kjær TN, Nøhr MK, Pedersen SB. Resveratrol and inflammation: Challenges in translating pre-clinical findings to improved patient outcomes. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2015 Jun;1852(6):1124-36.
375. Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC. Resveratrol Inhibits Transcription of CYP1A1 in Vitro by Preventing Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Cancer Res.* 1998 Dec 15;58(24):5707-12.

376. Casper RF, Quesne M, Rogers IM, Shirota T, Jolivet A, Milgrom E, et al. Resveratrol Has Antagonist Activity on the Aryl Hydrocarbon Receptor: Implications for Prevention of Dioxin Toxicity. *Mol Pharmacol*. 1999 Oct 1;56(4):784–90.
377. Singh SU, Casper RF, Fritz PC, Sukhu B, Ganss B, Girard B, et al. Inhibition of dioxin effects on bone formation in vitro by a newly described aryl hydrocarbon receptor antagonist, resveratrol. *J Endocrinol*. 2000 Oct 1;167(1):183–95.
378. Revel A, Raanani H, Younglai E, Xu J, Han R, Savouret JF, et al. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol Elmsford N*. 2001 Oct;15(5):479–86.
379. Revel A, Raanani H, Younglai E, Xu J, Rogers I, Han R, et al. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects lung from DNA damage and apoptosis caused by benzo[a]pyrene. *J Appl Toxicol*. 2003 Jul 1;23(4):255–61.
380. Frötschl R, Chichmanov L, Kleeberg U, Hildebrandt AG, Roots I, Brockmöller J. Prediction of aryl hydrocarbon receptor-mediated enzyme induction of drugs and chemicals by mRNA quantification. *Chem Res Toxicol*. 1998 Dec;11(12):1447–52.
381. Amakura Y, Tsutsumi T, Nakamura M, Kitagawa H, Fujino J, Sasaki K, et al. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Some Vegetable Constituents Determined Using in Vitro Reporter Gene Assay. *Biol Pharm Bull*. 2003;26(4):532–9.
382. Collado L, Figueras MJ. Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Jan 1;24(1):174–92.
383. Ferreira S, Silva F, Queiroz JA, Oleastro M, Domingues FC. Resveratrol against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*: Activity and effect on cellular functions. *Int J Food Microbiol*. 2014 Jun 16;180:62–8.
384. Nawrocki EM, Bedell HW, Humphreys TL. Resveratrol is cidal to both classes of *Haemophilus ducreyi*. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 May;41(5):477–9.
385. Su Y, Ma L, Wen Y, Wang H, Zhang S. Studies of the in Vitro Antibacterial Activities of Several Polyphenols against Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2014 Aug 19;19(8):12630–9.
386. Liu L, Wang Y, Lam K, Xu A. Moderate Wine Consumption in the Prevention of Metabolic Syndrome and its Related Medical Complications. *Endocrine, Metab Immune Disord-Drug Targets*. 2008 Jun 1;8(2):89–98.
387. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*. 2007 Nov 29;450(7170):712–6.
388. FUJII H, YOKOZAWA T, KIM YA, TOHDA C, NONAKA G. Protective Effect of Grape Seed Polyphenols against High Glucose-Induced Oxidative Stress. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006 Sep 23;70(9):2104–11.
389. Argmann C, Auwerx J. Insulin Secretion: SIRT4 Gets in on the Act. *Cell*. 2006 Aug 9;126(5):837–9.
390. Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, et al. Regulation of Insulin Secretion by SIRT4, a Mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*. 2007 Nov 16;282(46):33583–92.

391. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*. 2005 Mar 3;434(7029):113–8.
392. Nayagam VM, Wang X, Tan YC, Poulsen A, Goh KC, Ng T, et al. SIRT1 Modulating Compounds from High-Throughput Screening as Anti-Inflammatory and Insulin-Sensitizing Agents. *J Biomol Screen*. 2006 Dec 1;11(8):959–67.
393. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*. 2006 Dec 15;127(6):1109–22.
394. Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q. SIRT3, a Mitochondrial Sirtuin Deacetylase, Regulates Mitochondrial Function and Thermogenesis in Brown Adipocytes. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):13560–7.
395. Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim S-H, Mostoslavsky R, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J*. 2007 Apr 4;26(7):1913–23.
396. Price NL, Gomes AP, Ling AJY, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, et al. SIRT1 Is Required for AMPK Activation and the Beneficial Effects of Resveratrol on Mitochondrial Function. *Cell Metab*. 2012 Feb 5;15(5):675–90.
397. Colak Y, Ozturk O, Senates E, Tuncer I, Yorulmaz E, Adali G, et al. SIRT1 as a potential therapeutic target for treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2011 May;17(5):HY5–9.
398. Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, et al. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and Resveratrol Are Not Direct Activators of SIRT1. *J Biol Chem*. 2010 Mar 12;285(11):8340–51.
399. Dao T-MA, Waget A, Klopp P, Serino M, Vachoux C, Pechere L, et al. Resveratrol Increases Glucose Induced GLP-1 Secretion in Mice: A Mechanism which Contributes to the Glycemic Control. *PLoS ONE*. 2011 Jun 6;6(6):e20700.
400. Qiao Y, Sun J, Xia S, Tang X, Shi Y, Le G. Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity. *Food Funct*. 2014 May 28;5(6):1241–9.
401. Larrosa M, Yañez-Gascón MJ, Selma MV, González-Sarrías A, Toti S, Cerón JJ, et al. Effect of a Low Dose of Dietary Resveratrol on Colon Microbiota, Inflammation and Tissue Damage in a DSS-Induced Colitis Rat Model. *J Agric Food Chem*. 2009 Mar 25;57(6):2211–20.
402. Ghosh S, Banerjee S, Sil PC. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem Toxicol*. 2015 Sep;83:111–24.
403. Mahmood K, Zia KM, Zuber M, Salman M, Anjum MN. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. *Int J Biol Macromol*. 2015 Nov;81:877–90.
404. Shen L, Ji H-F. Theoretical study on physicochemical properties of curcumin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2007 Jul;67(3–4):619–23.
405. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*. 2008 Feb 15;75(4):787–809.

406. Wang Y-J, Pan M-H, Cheng A-L, Lin L-I, Ho Y-S, Hsieh C-Y, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal.* 1997 Aug;15(12):1867-76.
407. Oetari S, Sudibyo M, Commandeur JNM, Samhoedi R, Vermeulen NPE. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. *Biochem Pharmacol.* 1996 Jan 12;51(1):39-45.
408. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Mol Pharm.* 2007 Dec 1;4(6):807-18.
409. Wahlström B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1978 Aug;43(2):86-92.
410. Pan M-H, Huang T-M, Lin J-K. Biotransformation of Curcumin Through Reduction and Glucuronidation in Mice. *Drug Metab Dispos.* 1999 Apr 1;27(4):486-94.
411. Ravindranath V, Chandrasekhara N. Metabolism of curcumin--studies with [3H]curcumin. *Toxicology.* 1981 1982;22(4):337-44.
412. Ryu EK, Choe YS, Lee K-H, Choi Y, Kim B-T. Curcumin and Dehydrozingerone Derivatives: Synthesis, Radiolabeling, and Evaluation for β -Amyloid Plaque Imaging†. *J Med Chem.* 2006 Oct 1;49(20):6111-9.
413. Asai A, Miyazawa T. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. *Life Sci.* 2000 Oct 27;67(23):2785-93.
414. Ireson C, Orr S, Jones DJ, Verschoyle R, Lim CK, Luo JL, et al. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res.* 2001 Feb 1;61(3):1058-64.
415. Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, Ireson CR, Euden SA, Manson MM, et al. Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Study of Oral Curcuma Extract in Patients with Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2001 Jul 1;7(7):1894-900.
416. Holder GM, Plummer JL, Ryan AJ. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst.* 1978 Dec;8(12):761-8.
417. Hoehle SI, Pfeiffer E, Solyom AM, Metzler M. Metabolism of Curcuminoids in Tissue Slices and Subcellular Fractions from Rat Liver. *J Agric Food Chem.* 2006 Feb 1;54(3):756-64.
418. Hoehle SI, Pfeiffer E, Metzler M. Glucuronidation of curcuminoids by human microsomal and recombinant UDP-glucuronosyltransferases. *Mol Nutr Food Res.* 2007 Aug 1;51(8):932-8.
419. Garcea G, Jones DJL, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, et al. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer.* 2004;90(5):1011-5.
420. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* 1998 May;64(4):353-6.
421. Sandur SK, Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Murakami A, Sethi G, et al. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones

- differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis*. 2007 Aug 1;28(8):1765–73.
422. Pari L, Murugan P. Tetrahydrocurcumin Prevents Brain Lipid Peroxidation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Med Food*. 2007 Jun 1;10(2):323–9.
423. Sugiyama Y, Kawakishi S, Osawa T. Involvement of the β -diketone moiety in the antioxidative Mechanism of Tetrahydrocurcumin. *Biochem Pharmacol*. 1996 Aug 23;52(4):519–25.
424. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*. 2001 Aug;21(4B):2895–900.
425. Singh S, Aggarwal BB. Activation of Transcription Factor NF- κ B Is Suppressed by Curcumin (Diferuloylmethane). *J Biol Chem*. 1995 Oct 20;270(42):24995–5000.
426. Das L, Vinayak M. Curcumin attenuates carcinogenesis by down regulating proinflammatory cytokine interleukin-1 (IL-1 α and IL-1 β) via modulation of AP-1 and NF-IL6 in lymphoma bearing mice. *Int Immunopharmacol*. 2014 May;20(1):141–7.
427. Zhang C, Li B, Zhang X, Hazarika P, Aggarwal BB, Duvic M. Curcumin Selectively Induces Apoptosis in Cutaneous T-Cell Lymphoma Cell Lines and Patients' PBMCS: Potential Role for STAT-3 and NF- κ B Signaling. *J Invest Dermatol*. 2010 Aug;130(8):2110–9.
428. Esatbeyoglu T, Ulbrich K, Rehberg C, Rohn S, Rimbach G. Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. *Food Funct*. 2015 Mar 11;6(3):887–93.
429. Meng Z, Yu X, Chen J, Li L, Li S. Curcumin attenuates cardiac fibrosis in spontaneously hypertensive rats through PPAR- γ activation. *Acta Pharmacol Sin*. 2014 Oct;35(10):1247–56.
430. Li Z-C, Zhang L-M, Wang H-B, Ma J-X, Sun J-Z. Curcumin inhibits lung cancer progression and metastasis through induction of FOXO1. *Tumor Biol*. 2013 Jul 26;35(1):111–6.
431. Cui L, Jia X, Zhou Q, Zhai X, Zhou Y, Zhu H. Curcumin affects β -catenin pathway in hepatic stellate cell in vitro and in vivo. *J Pharm Pharmacol*. 2014 Nov 1;66(11):1615–22.
432. Kang N, Wang M-M, Wang Y-H, Zhang Z-N, Cao H-R, Lv Y-H, et al. Tetrahydrocurcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis involving p38 MAPK activation in human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 2014 May;67:193–200.
433. Yang Y, Wu X, Wei Z, Dou Y, Zhao D, Wang T, et al. Oral curcumin has anti-arthritic efficacy through somatostatin generation via cAMP/PKA and Ca²⁺/CaMKII signaling pathways in the small intestine. *Pharmacol Res*. 2015 May;95–96:71–81.
434. Cao J, Han Z, Tian L, Chen K, Fan Y, Ye B, et al. Curcumin inhibits EMMPRIN and MMP-9 expression through AMPK-MAPK and PKC signaling in PMA induced macrophages. *J Transl Med*. 2014;12(1):266.
435. Li Y-B, Gao J-L, Zhong Z-F, Hoi P-M, Lee SM-Y, Wang Y-T. Bisdemethoxycurcumin suppresses MCF-7 cells proliferation by inducing ROS accumulation and modulating senescence-related pathways. *Pharmacol Rep PR*. 2013;65(3):700–9.

436. Kumar A, Dhawan S, Hardegen NJ, Aggarwal BB. Curcumin (Diferuloylmethane) Inhibition of Tumor Necrosis Factor (TNF)-Mediated Adhesion of Monocytes to Endothelial Cells by Suppression of Cell Surface Expression of Adhesion Molecules and of Nuclear Factor- κ B Activation. *Biochem Pharmacol.* 1998 Mar 15;55(6):775–83.
437. ABE Y, HASHIMOTO S, HORIE T. Curcumin Inhibition Of Inflammatory Cytokine Production By Human Peripheral Blood Monocytes And Alveolar Macrophages. *Pharmacol Res.* 1999 Jan;39(1):41–7.
438. Pan Y, Wang Y, Cai L, Cai Y, Hu J, Yu C, et al. Inhibition of high glucose-induced inflammatory response and macrophage infiltration by a novel curcumin derivative prevents renal injury in diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 2012 Jun 1;166(3):1169–82.
439. Cho J-W, Lee K-S, Kim C-W. Curcumin attenuates the expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α as well as cyclin E in TNF- α -treated HaCaT cells; NF- κ B and MAPKs as potential upstream targets. *Int J Mol Med.* 2007 Mar 1;19(3):469–74.
440. Ranjan D, Chen C, Johnston TD, Jeon H, Nagabhushan M. Curcumin inhibits mitogen stimulated lymphocyte proliferation, NF κ B activation, and IL-2 signaling. *J Surg Res.* 2004 Oct;121(2):171–7.
441. Guimarães MR, Leite FRM, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa Jr C. Curcumin abrogates LPS-induced pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. Evidence for novel mechanisms involving SOCS-1, -3 and p38 MAPK. *Arch Oral Biol.* 2013 Oct;58(10):1309–17.
442. Xu X, Qin J, Liu W. Curcumin inhibits the invasion of thyroid cancer cells via down-regulation of PI3K/Akt signaling pathway. *Gene.* 2014 Aug 10;546(2):226–32.
443. Chen Q, Zheng Y, Jiao D, Chen F, Hu H, Wu Y, et al. Curcumin inhibits lung cancer cell migration and invasion through Rac1-dependent signaling pathway. *J Nutr Biochem.* 2014 Feb;25(2):177–85.
444. Mo N, Li Z-Q, Li J, Cao Y-D. Curcumin inhibits TGF- β 1-induced MMP-9 and invasion through ERK and Smad signaling in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2012;13(11):5709–14.
445. Shehzad A, Lee YS. Molecular mechanisms of curcumin action: Signal transduction. *BioFactors.* 2013 Jan 1;39(1):27–36.
446. Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012 Mar 1;39(3):283–99.
447. Bharti AC, Donato N, Singh S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor- κ B and I κ B α kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood.* 2003 Feb 1;101(3):1053–62.
448. Divya CS, Pillai MR. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NF κ B and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. *Mol Carcinog.* 2006 May 1;45(5):320–32.
449. Wang J, Zhu R, Sun D, Sun X, Geng Z, Liu H, et al. Intracellular Uptake of Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Exhibit Anti-Inflammatory Activities Superior to

- Those of Curcumin Through the NF- κ B Signaling Pathway. *J Biomed Nanotechnol.* 2015 Mar 1;11(3):403–15.
450. Chun K-S, Keum Y-S, Han SS, Song Y-S, Kim S-H, Surh Y-J. Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF- κ B activation. *Carcinogenesis.* 2003 Sep 1;24(9):1515–24.
451. Yu S, Shen G, Khor TO, Kim J-H, Kong A-NT. Curcumin inhibits Akt/mammalian target of rapamycin signaling through protein phosphatase-dependent mechanism. *Mol Cancer Ther.* 2008 Sep 1;7(9):2609–20.
452. Banerjee M, Tripathi LM, Srivastava VML, Puri A, Shukla R. Modulation of inflammatory mediators by ibuprofen and curcumin treatment during chronic inflammation in rat. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2003 May;25(2):213–24.
453. Venkataranganna M. NCB-02 (standardized Curcumin preparation) protects dinitrochlorobenzene-induced colitis through down-regulation of NF κ -B and iNOS. *World J Gastroenterol.* 2007;13(7):1103.
454. Gaddipati JP, Sundar SV, Calemene J, Seth P, Sidhu GS, Maheshwari RK. Differential regulation of cytokines and transcription factors in liver by curcumin following hemorrhage/resuscitation. *Shock Augusta Ga.* 2003 Feb;19(2):150–6.
455. Ciolino HP, Daschner PJ, Wang TTY, Yeh GC. Effect of Curcumin on the Aryl Hydrocarbon Receptor and Cytochrome P450 1A1 in MCF-7 Human Breast Carcinoma Cells. *Biochem Pharmacol.* 1998 Jul 15;56(2):197–206.
456. Rinaldi AL, Morse MA, Fields HW, Rothas DA, Pei P, Rodrigo KA, et al. Curcumin Activates the Aryl Hydrocarbon Receptor yet Significantly Inhibits (-)-Benzo(a)pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol Bioactivation in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells and Oral Mucosa. *Cancer Res.* 2002 Oct 1;62(19):5451–6.
457. Garg R, Gupta S, Maru GB. Dietary curcumin modulates transcriptional regulators of phase I and phase II enzymes in benzo[a]pyrene-treated mice: mechanism of its anti-initiating action. *Carcinogenesis.* 2008 May 1;29(5):1022–32.
458. Nishiumi S, Yoshida K, Ashida H. Curcumin suppresses the transformation of an aryl hydrocarbon receptor through its phosphorylation. *Arch Biochem Biophys.* 2007 Oct 15;466(2):267–73.
459. Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K. Bactericidal Activity of Curcumin I Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane. *PLoS ONE.* 2015 Mar 26;10(3):e0121313.
460. Mun S-H, Kim S-B, Kong R, Choi J-G, Kim Y-C, Shin D-W, et al. Curcumin Reverse Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Molecules.* 2014 Nov 10;19(11):18283–95.
461. De R, Kundu P, Swarnakar S, Ramamurthy T, Chowdhury A, Nair GB, et al. Antimicrobial Activity of Curcumin against *Helicobacter pylori* Isolates from India and during Infections in Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Apr;53(4):1592–7.
462. Srinivasan M. Effect of curcumin on blood sugar as seen in a diabetic subject. *Indian J Med Sci.* 1972 Apr;26(4):269–70.
463. Arun N, Nalini N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant Foods Hum Nutr Dordr Neth.* 2002;57(1):41–52.

464. El-Azab MF, Attia FM, El-Mowafy AM. Novel role of curcumin combined with bone marrow transplantation in reversing experimental diabetes: Effects on pancreatic islet regeneration, oxidative stress, and inflammatory cytokines. *Eur J Pharmacol.* 2011 May 1;658(1):41–8.
465. El-Moselhy MA, Taye A, Sharkawi SS, El-Sisi SFI, Ahmed AF. The antihyperglycemic effect of curcumin in high fat diet fed rats. Role of TNF- α and free fatty acids. *Food Chem Toxicol.* 2011 May;49(5):1129–40.
466. Soetikno V, Sari FR, Veeraveedu PT, Thandavarayan RA, Harima M, Sukumaran V, et al. Curcumin ameliorates macrophage infiltration by inhibiting NF- κ B activation and proinflammatory cytokines in streptozotocin induced-diabetic nephropathy. *Nutr Metab.* 2011 Jun 10;8:35.
467. Nishiyama T, Mae T, Kishida H, Tsukagawa M, Mimaki Y, Kuroda M, et al. Curcuminoids and Sesquiterpenoids in Turmeric (*Curcuma longa* L.) Suppress an Increase in Blood Glucose Level in Type 2 Diabetic KK-Ay Mice. *J Agric Food Chem.* 2005 Feb 1;53(4):959–63.
468. Jiménez-Flores LM, López-Briones S, Macías-Cervantes MH, Ramírez-Emiliano J, Pérez-Vázquez V. A PPAR γ , NF- κ B and AMPK-Dependent Mechanism May Be Involved in the Beneficial Effects of Curcumin in the Diabetic db/db Mice Liver. *Molecules.* 2014 Jun 18;19(6):8289–302.
469. He H-J, Wang G-Y, Gao Y, Ling W-H, Yu Z-W, Jin T-R. Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice. *World J Diabetes.* 2012 May 15;3(5):94–104.
470. Takikawa M, Kurimoto Y, Tsuda T. Curcumin stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in GLUTag cells via Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 May 31;435(2):165–70.
471. Spinucci G, Guidetti M, Lanzoni E, Pironi L. Endogenous ethanol production in a patient with chronic intestinal pseudo-obstruction and small intestinal bacterial overgrowth: *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006 Jul;18(7):799–802.
472. Babu PS, Srinivasan K. Hypolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in streptozotocin induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 1997 Jan;166(1-2):169–75.
473. Shin S-K, Ha T-Y, McGregor RA, Choi M-S. Long-term curcumin administration protects against atherosclerosis via hepatic regulation of lipoprotein cholesterol metabolism. *Mol Nutr Food Res.* 2011 Dec 1;55(12):1829–40.
474. Zingg J-M, Hasan ST, Meydani M. Molecular mechanisms of hypolipidemic effects of curcumin. *BioFactors.* 2013 Jan 1;39(1):101–21.
475. Wang M, Wang F, Wang Y, Ma X, Zhao M, Zhao C. Metabonomics Study of the Therapeutic Mechanism of *Gynostemma pentaphyllum* and Atorvastatin for Hyperlipidemia in Rats. *PLoS ONE.* 2013 Nov 1;8(11):e78731.
476. Doi M, Yamaoka I, Nakayama M, Mochizuki S, Sugahara K, Yoshizawa F. Isoleucine, a Blood Glucose-Lowering Amino Acid, Increases Glucose Uptake in Rat Skeletal Muscle in the Absence of Increases in AMP-Activated Protein Kinase Activity. *J Nutr.* 2005 Sep 1;135(9):2103–8.
477. Doi M, Yamaoka I, Nakayama M, Sugahara K, Yoshizawa F. Hypoglycemic effect of isoleucine involves increased muscle glucose uptake and whole body glucose

- oxidation and decreased hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2007 Jun 1;292(6):E1683–93.
478. Kles KA, Chang EB. Short-Chain Fatty Acids Impact on Intestinal Adaptation, Inflammation, Carcinoma, and Failure. *Gastroenterology.* 2006 Feb;130(2, Supplement):S100–5.
479. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science.* 2005 Mar 25;307(5717):1915–20.
480. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia.* 2007 Nov;50(11):2374–83.
481. Park D-Y, Ahn Y-T, Park S-H, Huh C-S, Yoo S-R, Yu R, et al. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in Diet-Induced Obese Mice Is Associated with Gut Microbial Changes and Reduction in Obesity. *PLoS ONE.* 2013 Mar 21;8(3):e59470.
482. Shin N-R, Lee J-C, Lee H-Y, Kim M-S, Whon TW, Lee M-S, et al. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut.* 2014 May 1;63(5):727–35.
483. Parkar SG, Stevenson DE, Skinner MA. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *Int J Food Microbiol.* 2008 Jun 10;124(3):295–8.
484. Tzounis X, Vulevic J, Kuhnle GGC, George T, Leonczak J, Gibson GR, et al. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *Br J Nutr.* 2008 Apr;99(04):782–92.
485. Selma MV, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health. *J Agric Food Chem.* 2009 Aug 12;57(15):6485–501.
486. Dolara P, Luceri C, Filippo CD, Femia AP, Giovannelli L, Caderni G, et al. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 2005 Dec 11;591(1–2):237–46.
487. Neyrinck AM, Alligier M, Memvanga PB, Névrumont E, Larondelle Y, Prétat V, et al. Curcuma longa Extract Associated with White Pepper Lessens High Fat Diet-Induced Inflammation in Subcutaneous Adipose Tissue. *PLoS ONE.* 2013 Nov 19;8(11):e81252.
488. Santacruz A, Marcos A, Wärnberg J, Martí A, Martín-Matillas M, Campoy C, et al. Interplay Between Weight Loss and Gut Microbiota Composition in Overweight Adolescents. *Obesity.* 2009 Oct 1;17(10):1906–15.
489. Nadal I, Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Garagorri M, Moreno LA, et al. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int J Obes.* 2008 Dec 9;33(7):758–67.
490. Etxeberria U, Arias N, Boqué N, Macarulla MT, Portillo MP, Martínez JA, et al. Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. *J Nutr Biochem.* 2015 Jun;26(6):651–60.

491. Saulnier DM, Riehle K, Mistretta T-A, Diaz M-A, Mandal D, Raza S, et al. Gastrointestinal Microbiome Signatures of Pediatric Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*. 2011 Nov 1;141(5):1782–91.
492. Xu J, Lian F, Zhao L, Zhao Y, Chen X, Zhang X, et al. Structural modulation of gut microbiota during alleviation of type 2 diabetes with a Chinese herbal formula. *ISME J*. 2015 Mar;9(3):552–62.
493. Bibbò S, Lopetuso LR, Ianiro G, Di Rienzo T, Gasbarrini A, Cammarota G. Role of Microbiota and Innate Immunity in Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *J Immunol Res J Immunol Res*. 2014 Jun 5;2014, 2014:e462740.
494. Rajilić-Stojanović M, Shanahan F, Guarner F, de Vos WM. Phylogenetic Analysis of Dysbiosis in Ulcerative Colitis During Remission: *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Mar;19(3):481–8.
495. Satokari R, Fuentes S, Mattila E, Jalanka J, de Vos WM, Arkkila P, et al. Fecal Transplantation Treatment of Antibiotic-Induced, Noninfectious Colitis and Long-Term Microbiota Follow-Up. *Case Rep Med Case Rep Med*. 2014 Nov 19;2014, 2014:e913867.
496. Hubbard TD, Murray IA, Perdew GH. Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. *Drug Metab Dispos*. 2015 Oct 1;43(10):1522–35.

Annexes



NOUVEAUX TRAITEMENTS ET PERSPECTIVES DANS LE DIABÈTE DE TYPE 2

LE RESVÉRATROL AU SERVICE DU DIABÈTE

Dr N. SRENG¹, Dr E. SERÉE¹, Pr S CHAMPION²

¹INRA, UMR1260 / 1062 INSERM / AMU ; Nutrition, Obésité et risque thrombotique,
27 boulevard Jean-Moulin, Marseille F-13385, France

²IMBE - UMR CNRS 7263 / IRD 237, Mutagenèse Environnementale,
Aix-Marseille Université, Faculté de Pharmacie 27 Bvd Jean Moulin, Marseille F-13385,
France

Le resvératrol est un polyphénol naturel que l'on trouve dans de nombreuses espèces végétales. Il est synthétisé par la plante pour se défendre d'agressions extérieures comme les UV ou les attaques fongiques. Le resvératrol est utilisé depuis de nombreuses décennies pour ses propriétés antioxydantes. Mais les travaux scientifiques démontrent que le resvératrol possède de nombreuses autres propriétés pharmacologiques. Ainsi, le resvératrol est un antagoniste du récepteur aux hydrocarbures et prévient ainsi de l'effet néfaste de certains polluants environnementaux (dioxine, fumée de tabac, particules diesel, etc.). Il possède aussi des propriétés anti-inflammatoires en inhibant les voies NF-κB et AP-1. Enfin, il est impliqué dans la protection cardiovasculaire. Récemment notre laboratoire a montré que cette molécule se comportait comme un prébiotique en normalisant la flore intestinale altérée par un régime riche en graisse. De plus, la fonction intestinale physiologique est restaurée et l'intestin sécrète à nouveau l'hormone intestinale GLP-1 qui régule la sécrétion d'insuline. Le resvératrol apparaît donc comme une molécule de choix en complément d'une thérapeutique antidiabétique ou en prévention de l'installation de la pathologie.



INTRODUCTION ET ÉTIOLOGIE DU DIABÈTE DE TYPE 2

Le diabète de type 2 (DT2) est à ce jour considéré comme une pandémie selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Le nombre de personnes diabétiques dans le monde est actuellement estimé à environ 250 millions, et devrait atteindre près de 380 millions en 2025, ce qui représente 7,1 % de la population adulte âgée de 20 à 80 ans. En Europe, une croissance de 16 % de la maladie est prévue d'ici à 2025 [1, 2]. Si le diabète est une pathologie qui préoccupe nos sociétés, il faut tenir compte des pathologies associées. En effet, les complications cardiaques, vasculaires, rénales et ophtalmologiques, augmentent également le coût de la prise en charge du diabète et constituent actuellement, en plus d'un problème de santé publique, un risque économique pour l'ensemble des pays de l'ouest.

Les causes du développement DT2 sont multiples, à la fois génétique, environnementale et sociale. La sédentarité associée à un enrichissement de la proportion de graisses dans les régimes alimentaires est un facteur aggravant qui, combiné au patrimoine génétique, est sûrement responsable de l'épidémie. Parallèlement à cela, nous sommes victimes d'une diminution de la consommation en fibres végétales qui sont impliquées dans la digestion et l'équilibre alimentaire par l'apport de micronutriments (vitamines, sels minéraux, etc.). Un autre rôle fondamental joué par ces fibres végétales concerne leur fonction de substrat à l'égard de notre flore intestinale. La diminution de leur proportion engendre un changement qualitatif de la flore intestinale et par voie de conséquence une altération du métabolisme énergétique [3-13]. Les conséquences physiopathologiques de ce déséquilibre énergétique se traduisent d'une part par une diminution de l'action de l'insuline i.e. l'insulinorésistance et d'autre part par une augmentation de la masse adipeuse. Ces deux conséquences fonctionnelles insulinorésistance et adipogénèse sont reliées entre elles via un processus inflammatoire de bas niveau qui apparaît progressivement et qu'on dénomme inflammation métabolique [3]. En utilisant des modèles animaux qui développent des maladies métaboliques tels que des souris nourries par un régime riche en graisse (> 40 % p/p) pendant plusieurs mois, on observe une augmentation de la sécrétion des cytokines inflammatoires et de chimiokines. Ces cytokines, notamment le TNF- α , l'IL-1, et l'IL-6 [4, 5], interfèrent avec la signalisation générée par le récepteur à l'insuline. Ceci se traduit par une diminution de l'utilisation du glucose par les muscles et une levée d'inhibition de la production hépatique de glucose. Il s'en suit une augmentation de la glycémie puis l'apparition d'un hyperinsulinisme et d'une hyperglycémie ce qui induit la redistribution des flux métaboliques notamment vers les organes de stockage tel que le tissu adipeux et le foie. Une autre voie récemment mise en évidence montre le rôle que peuvent avoir des changements de la flore bactérienne, en liaison avec l'alimentation dans l'installation des maladies métaboliques notamment l'obésité [7, 11] et le DT2 [3-6]. Il apparaît que la modification de la flore intestinale semble

70

être une des causes de l'obésité. En effet, un régime riche en graisse favorise, d'une part, l'émergence de bactéries Gram - qui seraient à l'origine de l'installation de l'inflammation métabolique et d'autre part, diminue le nombre de germes Gram + [3-5, 7-10]. Des études ont montré que le genre *Bifidobacterium* (Gram +) est inversement corrélé à l'incidence du DT2 et de l'obésité chez des souris soumises à un régime riche en graisse [3-5]. L'utilisation de fibres alimentaires induit une augmentation du nombre de bactéries à Gram + chez les souris nourries avec un régime riche en graisses, et parallèlement, on constate une diminution de l'inflammation et un retard dans l'installation de l'insulinorésistance [14].

La thérapie antidiabétique n'est pas à ce jour efficace. En effet, les molécules actuellement sur le marché ne donnent pas les résultats escomptés et il est difficile de régler avec les traitements disponibles la complexité du désordre métabolique. Il est alors urgent de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Une alternative serait de prévenir l'apparition de la maladie chez les personnes à risque et/ou d'accompagner le traitement du diabète déclaré par la prise de compléments alimentaires. Les approches nutritionnelles et 'aliments' sont ainsi considérées comme bien tolérées. De nombreuses données, revues ci-dessous, suggèrent que le resvératrol (RVR) pourrait correspondre à une nouvelle stratégie thérapeutique et 'aliments'. Son mécanisme d'action serait basé sur des effets à la fois antioxydant et anti-inflammatoire [15,16].

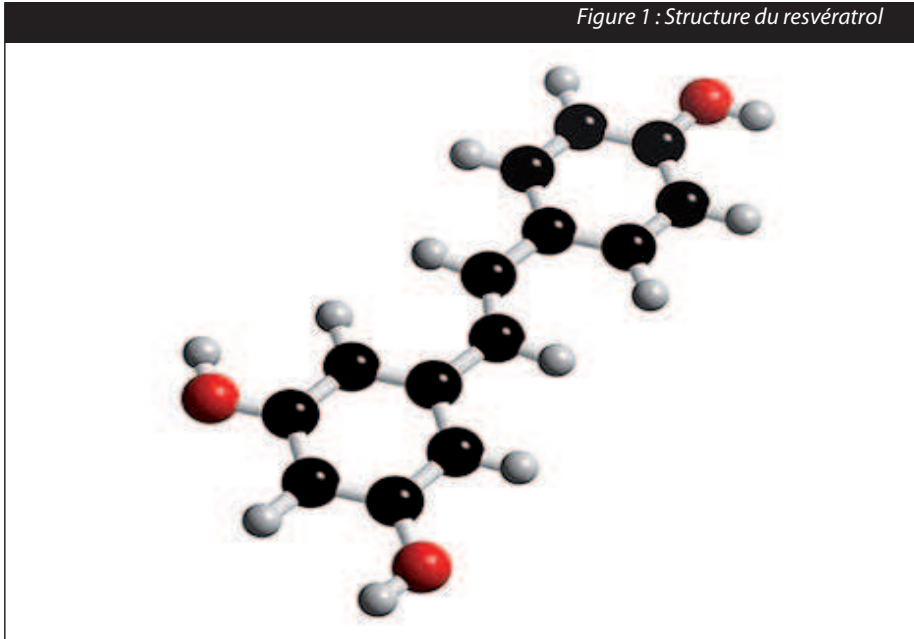
LE RESVÉRATROL : MOLÉCULE DE PRÉVENTION ET/OU THÉRAPEUTIQUE

Le RVR, ou 3,5,4' transtriahydroxytilbene (figure 1), est un polyphénol naturel que l'on trouve dans de nombreuses espèces végétales dont le raisin noir, les cacahuètes, le pin et la renouée chinoise (*Polygonum Cuspidatum*), sont les principales sources commerciales. Le RVR est une molécule qui est synthétisée par les plantes en réponse à un stress par exposition à la lumière ultra-violette ou une attaque fongique [17, 18]. Le RVR est étudié depuis de nombreuses années et il possède de nombreuses propriétés pharmacologiques.

Le resvératrol : un antagoniste compétitif du Récepteur des Arylhydrocarbures (AhR)

Le Récepteur des Arylhydrocarbures (AhR) est un facteur de transcription dont les ligands naturels endogènes ne sont pas bien caractérisés. Le récepteur AhR est impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes lorsqu'il lie divers polluants environnementaux tels que les hydrocarbures aromatiques du tabac et des gaz d'échappement, les dioxines (dont la TCDD, Dioxine de Seveso), les polychloro-biphényles (PCB, isolants électriques) et d'autres xénobiotiques. AhR induit les gènes de la détoxification des hydrocarbures aromatiques tels que le cytochrome

Figure 1 : Structure du resvératrol



P450 1A1 (CYP 1A1) et les enzymes de conjugaison (glutathion S-transférase Ya, UDP-glucuronyl-transférase, etc.) [19] et un grand nombre de gènes liés à l'inflammation (interleukines, Cox2, NO synthase) [20]. Certains ligands comme les PCB augmentent le stress oxydatif et la peroxydation des lipides, ce qui pourrait être une cause des lésions cellulaires et du rôle athérogène de ces molécules. Ces composés agissent sur la vascularisation et provoquent des perturbations métaboliques conduisant à l'insulino-résistance. Un autre ligand, le TCDD inhibe la différenciation adipocytaire [21] et le transport du glucose dans le tissu adipeux [22]. Des études épidémiologiques montrent que l'exposition à la dioxine tétrachlorée (dioxine de Seveso, TCDD) induit une augmentation significative du risque de TD2. Bertazzi et al. rapportent dès 1998 un "excès" de cas de TD2 dans la population féminine de Seveso [23, 24]. Ce lien entre dioxine et TD2 a été confirmé par les études ultérieures de ce groupe [25] et par des études sur des anciens combattants du ViêtNam [26, 27] et des travailleurs exposés [28, 29]. Ces données sont à rapprocher de l'association connue entre TD2 et tabagisme, dont les agents principaux (hydrocarbures aromatiques) sont des ligands du AhR [30, 31]. Le RVR inhibe les effets des divers agonistes du AhR par inhibition compétitive [32]. Le RVR est le seul antidote efficace et non toxique contre ces polluants environnementaux.



Le resvératrol : molécule antioxydante

Le RVR est connu depuis de nombreuses décennies comme étant un antioxydant majeur. Mais il faut préciser que c'est le RVR ingéré et non métabolisé qui possède cette activité. Malheureusement, le RVR est très vite métabolisé, et les effets de cette molécule sur le syndrome métabolique proviendraient d'autres propriétés que nous décrivons ultérieurement.

Le resvératrol : un anti-inflammatoire antagoniste des voies NF- κ B et AP-1.

Les cascades moléculaires liées à AhR et conduisant à une résistance à l'insuline ne sont pas identifiées mais l'implication de NF- κ B, facteur essentiel de l'inflammation a été suggérée [33, 34]. L'activation du AhR par les dioxines induit l'induction des cytokines de types IL-1. En inhibant NF- κ B par son antagonisme vis à vis du AhR, le RVR inhibe l'induction des cytokines inflammatoires. Ce composé inhibe également l'expression de la chimiokine MCP-1 [35, 36] induite par le TNF α et qui est impliquée dans l'infiltration macrophagique. Il se pourrait donc que le RVR agisse sur le DT2 via son effet au niveau de l'expression de MCP-1. Le AhR interagit physiquement avec d'autres facteurs de transcription dont PPAR γ [37, 38] tandis que PPAR α régule l'expression de AhR [39, 40]. Il est important de noter que le facteur de transcription PPAR γ est la cible de médicaments anti-diabétiques de la famille des thiazolidinediones et PPAR α joue un rôle dans la lipolyse. Le RVR agit aussi sur l'inflammation en inhibant les voies NF- κ B et AP-1 [41-45]. Il diminue l'expression de la cytokine IL-1 β et s'oppose à la production de radicaux oxydants (ROS) [46, 47]. D'autres voies d'action du RVR ont été mises en avant comme la modification de la synthèse des eicosanoïdes par inhibition des cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) responsables de la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires [48].

Le resvératrol et les mitochondries

Dans le muscle squelettique, une diminution de la synthèse d'ATP et de l'expression des gènes contrôlant l'activité mitochondriale est en partie, au moins, associée à une insulino-résistance.

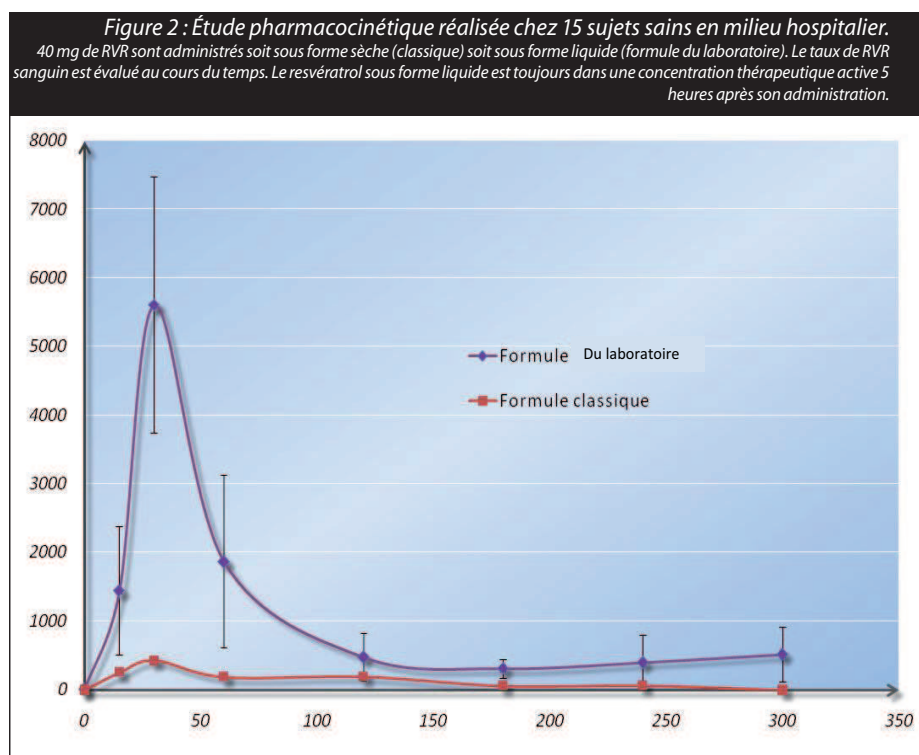
Le facteur PGC-1 α qui est un PPAR γ et le facteur SIRT1 qui est associé à PGC-1 sont fonctionnellement liés l'un à l'autre et à l'utilisation du glucose. En effet, une diminution de l'activité de PGC-1 est associée à l'apparition du diabète et SIRT1 contrôle le métabolisme glucidique hépatique [49].

Le RVR induit l'expression du gène codant pour PGC-1 α via l'activation du facteur SIRT1 [49]. Par ailleurs, le RVR augmente la taille et le nombre de mitochondries dans divers tissus. Dans les muscles, en réponse au RVR, les mitochondries présentent une augmentation du pouvoir oxydant et une activité métabolique accrue associée à une augmentation de l'activité de la citrate synthétase.

LES DONNÉES DE NOTRE LABORATOIRE

Notre laboratoire s'est impliqué dans l'étude de l'effet d'un traitement au RVR sur le TD2. Le RVR, dès son administration chez l'homme, est une molécule qui est très vite éliminée de l'organisme suite à un cycle de métabolisation entéro-hépatique très fort impliquant les enzymes UGT1A1 et 1A9. Cela se traduit par l'apparition de métabolites sulfatés et de glucuroconjugués éliminés par les urines et les fèces.

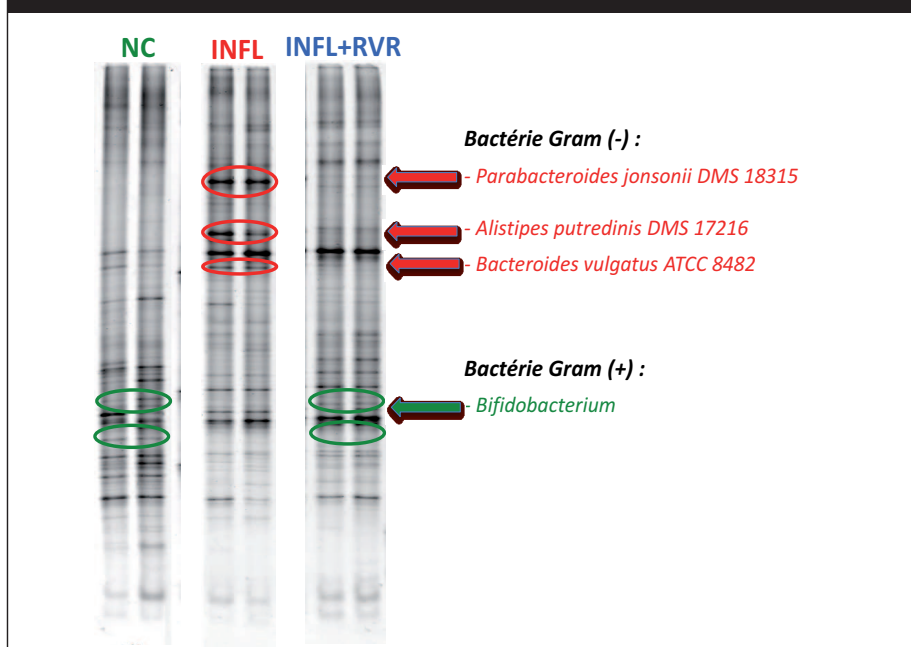
Avant de valider l'effet du RVR sur le TD2, nous avons mis au point une forme galénique permettant au RVR d'être hautement biodisponible [50]. Après validation de cette galénique par des études de pharmacocinétique (figure 2), nous avons nourri des animaux par un régime diabétogène riche en graisse supplémenté ou non en RVR.



L'administration de RVR pendant 5 semaines réduit l'intolérance au glucose. Nous avons mis en évidence les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus. Nous avons démontré que le RVR induisait, par augmentation de la transcription, l'expression et ensuite la sécrétion intestinale de Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) [51]. Cette hormone entre par la veine porte et peut alors activer la sécrétion d'insuline. Ce mécanisme a été validé par l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés et présentant un récepteur

non fonctionnel au GLP-1. En effet, sur ces animaux, le RVR n'agit plus sur la tolérance au glucose car le taux d'insuline n'est plus modulé. Parallèlement à cela, nous avons démontré que le RVR diminue l'inflammation induite par le régime diabétogène riche en graisse. En effet, l'expression des cytokines inflammatoires de type IL-1 et IL-6 est diminuée par le RVR et les cytokines anti-inflammatoires de type IL-10 et TGF β sont augmentées par la même molécule en particulier au niveau hépatique et intestinal [51]. Le RVR étant une molécule antifongique qui possède quelques propriétés antimicrobiennes, nous avons évalué l'effet du RVR sur la flore intestinale. Nous démontrons pour la première fois que le RVR est un agent prébiotique qui diminue le nombre de bactéries inflammatoires Gram - et qui induit la prolifération des bactéries Gram + (figure 3) [51].

Figure 3 : Effet de RVR sur la flore intestinale. NC : contrôle ; INFL : régime inflammatoire ; INFL + RVR : régime inflammatoire + resvératrol. Le RVR fait disparaître des bactéries qui ont émergé suite au régime inflammatoire et fait apparaître des bactéries qui ont été tuées par ce régime.



Enfin, nous avons testé l'effet d'une association du RVR à la sitagliptine, un médicament antidiabétique inhibiteur de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4). Ce choix fut motivé par le fait que le RVR induit la sécrétion de GLP-1 et que la sitagliptine inhibe la dégradation du GLP-1. Nos résultats indiquent finalement que le resvératrol potentialise l'effet de la sitagliptine [51].

CONCLUSION

Le RVR sous une forme biodisponible par voie orale, en tant qu'«aliment», semble un candidat prometteur dans le domaine du traitement du TD2 et de l'obésité. Toutes les données cumulées sur cette molécule confirment que cette molécule peut être utilisée dans la prévention ou l'optimisation d'une thérapeutique antidiabétique. L'avantage du RVR est d'être un complément alimentaire naturel et non toxique, utilisable per os et associable à un médicament anti-diabétique. Son activité sur le TD2 est médié par ses divers rôles anti-inflammatoire, prébiotique et inducteur de la sécrétion du GLP-1 et de l'insuline.



RÉFÉRENCES

- [01] World Health Organization: Report of a consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. World Health Organization, Geneva 1999.
- [02] Zimmet P, Shaw J, Murray S, Sicree R. L'épidémie de diabète en plein envol : les prévisions pour le futur. *Diabetes Voice* 2003, Numéro spécial 48: 12-6.
- [03] Cani P, Amar J, Iglesias M, Poggio M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007, 56: 1761-72.
- [04] Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008, 57: 1470-81.
- [05] Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol* 2008, 56: 305-9.
- [06] Cani PD, Hoste S, Guiot Y, Delzenne NM. Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *Br J Nutr* 2007, 98: 32-7.
- [07] Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102: 11070-5.
- [08] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006, 124: 837-48.
- [09] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006, 444: 1022-3.
- [10] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006, 444: 1027-31.
- [11] Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101: 15718-23.
- [12] Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005, 307: 1915-20.
- [13] Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104: 979-84.
- [14] Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 2007, 50: 2374-83.

- [15] Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 2007, 450:712-6.
- [16] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006, 444: 337-42.
- [17] Schubert R, Fischer R, Hain R, Schreier PH, Bahnweg G, Ernst D, et al. An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. *Plant Mol Biol* 1997, 34: 417-26.
- [18] Schouten A, Wagemakers L, Stefanato FL, van der Kaaij RM, van Kan JA. Resveratrol acts as a natural antifungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. *Mol Microbiol* 2002, 43: 883-94.
- [19] Wang XL, Greco M, Sim AS, Duarte N, Wang J, Wilcken DE. Effect of CYP1A1 MspI polymorphism on cigarette smoking related coronary artery disease and diabetes. *Atherosclerosis* 2002, 162: 391-7.
- [20] INSERM. Perturbations endocriniennes : nouveaux gènes cibles In: INSERM ed. Expertise Collective : Dioxines dans l'environnement. Paris, INSERM 2000 : 259-82.
- [21] Alexander RW. Atherosclerosis as disease of redox-sensitive genes. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1998, 109: 129-45; discussion 145-6.
- [22] Enan E, Matsumura F. 2,3,7,8-Tetra-chlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced changes in glucose transporting activity in guinea pigs, mice, and rats in vivo and in vitro. *J Biochem Toxicol* 1994, 9: 97-106.
- [23] Bertazzi PA, Bernucci I, Brambilla G, Consonni D, Pesatori AC. The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review. *Environ Health Perspect* 1998, 106 Suppl 2: 625-33.
- [24] Pesatori AC, Zocchetti C, Guercilena S, Consonni D, Turrini D, Bertazzi PA. Dioxin exposure and non-malignant health effects: a mortality study. *Occup Environ Med* 1998, 55: 126-31.
- [25] Consonni D, Pesatori AC, Zocchetti C, Sindaco R, D'Oro LC, Rubagotti M, et al. Mortality in a population exposed to dioxin after the Seveso, Italy, accident in 1976: 25 years of follow-up. *Am J Epidemiol* 2008, 167: 847-58.
- [26] Pesatori AC, Consonni D, Bachetti S, Zocchetti C, Bonzini M, Baccarelli A, et al. Short- and long-term morbidity and mortality in the population exposed to dioxin after the "Seveso accident". *Ind Health* 2003, 41: 127-38.
- [27] Henriksen GL, Ketchum NS, Michalek JE, Swaby JA. Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology* 1997, 8: 252-8.
- [28] Michalek JE, Akhtar FZ, Kiel JL. Serum dioxin, insulin, fasting glucose, and sex hormone-binding globulin in veterans of Operation Ranch Hand. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84: 1540-3.



- [29] Remillard RB, Bunce NJ. Linking dioxins to diabetes: epidemiology and biologic plausibility. *Environ Health Perspect* 2002, 110:853-8.
- [30] Vena J, Boffetta P, Becher H, Benn T, Bueno-de-Mesquita HB, Coggon D, et al. Exposure to dioxin and nonneoplastic mortality in the expanded IARC international cohort study of phenoxy herbicide and chlorophenol production workers and sprayers. *Environ Health Perspect* 1998, 106 Suppl 2: 645-53.
- [31] Eliasson B. Cigarette smoking and diabetes. *Progr Cardiovasc Dis* 2003, 45: 405-13.
- [32] Casper RF, Quesne M, Rogers IM, Shirota T, Jolivet A, Milgrom E, et al. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol Pharmacol* 1999, 56: 784-90.
- [33] Das SK, Sharma NK, Chu WS, Wang H, Elbein SC. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) gene as a positional and functional candidate for type 2 diabetes and prediabetic intermediate traits: Mutation detection, case-control studies, and gene expression analysis. *BMC Med Genet* 2008, 9: 16.
- [34] Thackaberry EA, Bedrick EJ, Goens MB, Danielson L, Lund AK, Gabaldon Det al. Insulin regulation in AhR-null mice: embryonic cardiac enlargement, neonatal macrosomia, and altered insulin regulation and response in pregnant and aging AhR-null females. *Toxicol Sci* 2003, 76: 407-17.
- [35] Zhu J, Yong W, Wu X, Yu Y, Lv J, Liu C, et al. Anti-inflammatory effect of resveratrol on TNF-alpha-induced MCP-1 expression in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 369: 471-7.
- [36] Cullen JP, Morrow D, Jin Y, Curley B, Robinson A, Sitzmann JV, et al. Resveratrol, a polyphenolic phytostilbene, inhibits endothelial monocyte chemotactic protein-1 synthesis and secretion. *J Vasc Res* 2007, 44: 75-84.
- [37] Ulrich S, Loitsch SM, Rau O, von Knethen A, Brune B, Schubert-Zsilavecz M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a molecular target of resveratrol-induced modulation of polyamine metabolism. *Cancer Res* 2006, 66: 7348-54.
- [38] Ge H, Zhang JF, Guo BS, He Q, Wang BY, He B, et al. Resveratrol inhibits macrophage expression of EMMPRIN by activating PPARgamma. *Vascul Pharmacol* 2007, 46: 114-21.
- [39] Seree E, Villard PH, Pascussi JM, Pineau T, Maurel P, Nguyen QN, et al. Evidence for a new human CYP1A1 regulation pathway involving PPAR-alpha and 2 PPRE sites. *Gastroenterology* 2004, 127: 1436-45.
- [40] Villard PH, Caverni S, Baananou A, et al. PPARalpha transcriptionally induces AhR expression in Caco-2, but represses AhR pro-inflammatory effects. *Biochem Biophys Res Comm* 2007, 364: 896-901.
- [41] Ma ZH, Ma QY, Wang LC, Sha HC, Wu SL Zhang M. Effect of resveratrol on NF-kappaB activity in rat peritoneal macrophages. *Am J Chinese Med* 2006, 34: 623-30.
- [42] Kundu JK, Shin YK, Surh YJ. Resveratrol modulates phorbol ester-induced pro-inflammatory signal transduction pathways in mouse skin in vivo: NF-kappaB and AP-1 as prime targets. *Biochem Pharmacol* 2006, 72: 1506-15.



- [43] Kundu JK, Shin YK, Kim SH, Surh YJ. Resveratrol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of NF-kappaB in mouse skin by blocking IkappaB kinase activity. *Carcinogenesis* 2006, 27: 1465-74.
- [44] Estrov Z, Shishodia S, Faderl S, Harris D, Van Q, Kantarjian HM, et al. Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2003, 102: 987-95.
- [45] Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 2000, 164: 6509-19.
- [46] Csaki C, Keshishzadeh N, Fischer K, Shakibaei M. Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes in vitro. *Biochem Pharmacol* 2008, 75: 677-87.
- [47] Singh SU, Casper RF, Fritz PC, Sukhu B, Ganss B, Girard B Jr, et al. Inhibition of dioxin effects on bone formation in vitro by a newly described aryl hydrocarbon receptor antagonist, resveratrol. *J Endocrinol* 2000, 167: 183-95.
- [48] Das S, Das DK. Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2007, 6: 168-73.
- [49] Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 2005, 434: 113-8.
- [50] Amiot MJ, Romier B, Dao TM, Fanciullino R, Ciccolini J, Burcelin R, et al. Optimization of trans-Resveratrol bioavailability for human therapy. *Biochimie* 2013, 95: 1233-8.
- [51] Dao TM, Waget A, Klopp P, Serino M, Vachoux C, Pechere L, et al. Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice: a mechanism which contributes to the glycemic control. *PLoS One* 2011, 6: e20700.

Study of the effect of the association of Resveratrol and Curcumin on glucose tolerance improvement

Each year, the worldwide impact of type 2 diabetes (T2D) increases significantly. The complications are serious and treatments are often ineffective and provide a lot of side effects. Resveratrol (RSV) and curcumin (Cur) are natural polyphenols known for their different pharmacological activities, including anti-diabetic. The objectives of this study were to evaluate the effects of the combination of these polyphenols on glucose tolerance improvement. Our results show that in animals fed with a high fat diet (HFD), RSV improved glucose tolerance while Cur displayed no significant effect. Surprisingly, when both polyphenols were administered simultaneously, Cur inhibited the effect of RSV on glucose tolerance improvement. To explain this antagonism between both polyphenols on glucose tolerance, we have evaluated the effect of these compounds on the metagenome associated or not. Our results indicate that RSV and Cur normalized gut flora altered by HFD. When Cur and RSV were administered simultaneously, Cur inhibited the effect of RSV on the growth of some bacterial species. Thus, Cur blocked the inhibitory effect of RSV on *Alistipes putredinis*. Our data indicate that these polyphenols displayed generally anti-inflammatory effects, but their combination may be either synergistic *in vitro* or antagonistic *in vivo* on the expression of some cytokines. To evaluate the physiological effect of the gut flora changes induced by polyphenols, we have drawn a parallel between metagenome and metabolome data. Each of the polyphenols improved by itself the metabolomic profile altered by HFD. However, Cur hindered the effect of RSV. In a whole, this study indicates that combination of Cur with RSV is not successful to further enhance the RSV-induced improvement of glucose tolerance.

Keywords : resveratrol, curcumin, type 2 diabetes, gut flora, metabolome

Auteur: Navin SRENG

Titre: Etude de l'effet de l'association du Resvératrol et de la Curcumine sur l'amélioration de la tolérance au glucose

Directeur de thèse: Rémy BURCELIN

Lieu et date de soutenance: le 01 juillet 2016 à Marseille

Résumé

Le diabète de type 2 (DT2) progresse dans le monde entier de manière alarmante. Les complications sont graves et les traitements sont souvent inefficaces et donnent beaucoup d'effets indésirables. Le resvératrol (RSV) et la curcumine (Cur), des polyphénols naturels, sont connus pour leurs différentes activités pharmacologiques, y compris antidiabétiques. Les objectifs de cette étude ont été d'évaluer les effets de la combinaison de ces deux polyphénols sur l'amélioration de la tolérance au glucose. Nos résultats montrent que chez des souris soumises à un régime riche en graisse (HFD), le RSV améliore la tolérance au glucose alors que la Cur n'a pas d'effet significatif. De manière surprenante, lorsque les deux polyphénols sont administrés simultanément, la Cur inhibe l'effet du RSV sur l'amélioration de la tolérance au glucose. Pour expliquer cet antagonisme, nous avons évalué l'effet de ces polyphénols associés ou pas sur le métagénome. Nos résultats indiquent que la Cur et le RSV normalisent la flore intestinale altérée par le HFD. Lors d'une association de ces polyphénols, la Cur inhibe aussi l'effet du RSV sur la croissance de certaines espèces bactériennes. Ainsi, la Cur bloque l'effet inhibiteur du RSV sur *Alistipes putredinis*. Nos données indiquent que ces polyphénols sont en général anti-inflammatoires mais leur association peut être synergique *in vitro* ou bien, à l'opposé, antagoniste *in vivo* pour l'expression de certaines cytokines. Afin d'évaluer l'effet physiologique de la modification de la flore intestinale par les polyphénols, nous avons étudié le métabolome. Parallèlement au métagénome, chacun des polyphénols améliore le profil métabolomique altéré par le HFD. Cependant, la Cur s'oppose à l'effet du RSV. Les données de ce travail indiquent que la Cur n'est pas associable au RSV pour améliorer la tolérance au glucose.

Mots clés: resvératrol, curcumine, diabète de type 2, flore intestinale, métabolome

Discipline: Physiopathologie

Laboratoire: Institut de Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

INSERM UMR 1048, Equipe 2

Hôpital Rangueil, 31432 Toulouse Cedex 4