

Université de Montréal

**RÔLE DES POLYPHÉNOLS À EFFETS PRÉBIOTIQUES DANS LA PRÉVENTION DU SYNDROME
MÉTABOLIQUE : MÉCANISMES D'ACTION AU NIVEAU CELLULAIRE ET ANIMAL**

Par

Djatougbévi Mireille Koudoufio

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Docteur en Nutrition

Janvier 2024

© Mireille Koudoufio, 2024

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales

Cette thèse intitulée

**RÔLE DES POLYPHÉNOLS À EFFETS PRÉBIOTIQUES DANS LA PRÉVENTION DU SYNDROME
MÉTABOLIQUE : MÉCANISMES D'ACTION AU NIVEAU CELLULAIRE ET ANIMAL**

Présentée par

Djatougbévi Mireille Koudoufio

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Marc Prentki

Président-rapporteur

Valérie Marcil

Directrice de recherche

Mathieu Ferron

Membre du jury

Khalil Abdelouahed

Examineur externe

Résumé

Le rôle crucial du tractus gastrointestinal dans la pathogenèse et la pathophysiologie des troubles cardiométaboliques (TCM) et du syndrome métabolique (SM) est actuellement bien établi. Plusieurs facteurs, incluant le stress oxydatif (SOx), l'inflammation et la résistance à l'insuline (RI), perturbent l'homéostasie intestinale et causent des TCM. Les polyphénols (PP) ont des effets biologiques bénéfiques dans la prévention de pathologies métaboliques. Cependant, leurs mécanismes d'actions, surtout au niveau de l'axe intestin-foie, ne sont pas bien compris. Par ailleurs, malgré les nombreuses études sur les effets biologiques et la biodisponibilité des PP, il existe encore des zones d'ombres concernant les interactions entre le microbiote intestinal et les PP et les conséquences subséquentes sur la santé intestinale et métabolique.

Dans ce travail de recherche, nous favorisons l'axiome selon lequel les PP, notamment ceux de grande taille moléculaire tels que les proanthocyanidines (PACs), pourraient être utile pour combattre les maladies métaboliques grâce à leurs actions antioxydante et anti-inflammatoire. Toutefois, ces actions précitées des PACs dépendraient d'une régulation en amont du microbiote intestinal. L'objectif central consiste à démontrer les effets bénéfiques des PACs dans la prévention des dérèglements métaboliques dans deux modèles distincts, l'un cellulaire et l'autre animal et d'en étudier les mécanismes. Les effets des PACs sur la RI, les dérangements métaboliques intestinaux grâce à la production de métabolites ont été étudiés.

Dans une première étape, nous avons étudié les mécanismes d'actions des PACs et de l'un de leurs métabolites majeurs, le 4,5-dihydroxyphenyl valerolactone (DHPVL), dans la prévention des maladies métaboliques et dans le maintien de l'homéostasie intestinale en utilisant la lignée cellulaire intestinale Caco-2/15. Ces cellules constituent un outil de choix pour l'investigation du SOx, la défense antioxydante et l'inflammation en relation directe avec nos objectifs. Les résultats suggèrent que la capacité des PACs à augmenter la défense antioxydante et anti-inflammatoire et à améliorer l'homéostasie intestinale passeraient en partie probablement par leurs métabolites microbiens.

Dans une deuxième étape, en utilisant le modèle murin C57BL6, nous avons déterminé l'impact des PACs sur l'homéostasie métabolique intestinale et hépatique, via l'atténuation du SOx et l'inflammation, le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale, la prévention de l'endotoxémie métabolique et les modifications du profil lipidique et de la fonction du microbiote intestinal. Cette partie a évalué les aspects préventifs et thérapeutiques des PACs en spécifiant leurs bénéfices biologiques et voies mécanistiques dans des organes métaboliques clés. Pour étudier ces mécanismes et les comprendre, nous avons utilisé le modèle dysmétabolique de souris C57BL6 soumises à une diète riche en lipides et en sucrose (HFHS), servant à développer le SM et les complications cardio-métaboliques afin d'examiner l'action des PACs. Le développement de l'obésité, de la RI ainsi que la survenue d'autres altérations métaboliques ont été prévenus par l'administration de PACs.

Les résultats de cette thèse permettent une meilleure compréhension des mécanismes d'actions qui sous-tendent les effets préventifs et thérapeutiques des PACs dans les désordres métaboliques, en particulier dans l'axe intestin-foie.

Mots-clés : syndrome métabolique, homéostasie métabolique, stress oxydant, inflammation, proanthocyanidines, microbiote intestinal, métabolites microbiens.

Abstract

The crucial role of the gastrointestinal tract in the pathogenesis and pathophysiology of cardiometabolic disorders (CMD) and metabolic syndrome (MetS) is currently recognized. Several factors, including oxidative stress (OxS), inflammation and insulin resistance (IR), disrupt intestinal homeostasis and cause CMD. Polyphenols (PP) have beneficial biological effects in the prevention of metabolic pathologies. However, their mechanisms of action, especially in the gut-liver axis, are not well understood. Moreover, despite numerous studies on the biological effects and bioavailability of PP, there are still grey areas concerning the interactions between the intestinal microbiota and PP and the subsequent consequences for intestinal and metabolic health.

In this research work, we promote the axiom that PP, particularly those of large molecular size such as proanthocyanidins (PACs), could be useful in combating metabolic diseases thanks to their antioxidant and anti-inflammatory actions. However, the aforementioned actions of PACs would depend on upstream regulation of the intestinal microbiota. The central objective is to demonstrate the beneficial effects of PACs in preventing metabolic disorders in two distinct models, one cellular and the other animal, and to study the mechanisms involved. The effects of PACs on IR and intestinal metabolic disturbances through metabolite production were studied.

In a first step, we investigated the mechanisms of action of PACs and one of their major metabolites, 4,5-dihydroxyphenyl valerolactone (DHPVL), in the prevention of metabolic diseases and in the maintenance of intestinal homeostasis using the Caco-2/15 intestinal cell line. These cells are a tool of choice for investigating OxS, antioxidant defense and inflammation in direct relation to our objectives. The results suggest that the ability of PACs to enhance antioxidant and anti-inflammatory defense and improve intestinal homeostasis is probably partly mediated by their microbial metabolites.

In a second step, using the C57BL6 mouse model, we determined the impact of PACs on intestinal and hepatic metabolic homeostasis, via attenuation of OxS and inflammation, maintenance of intestinal barrier integrity, prevention of metabolic endotoxemia and changes in lipid profile and gut microbiota function. This section assessed the preventive and therapeutic aspects of PACs,

specifying their biological benefits and mechanistic pathways in key metabolic organs. To investigate and understand these mechanisms, we used the dysmetabolic model of C57BL6 mice subjected to a high-fat, high-sucrose diet (HFHS), used to develop MetS and cardio-metabolic complications to examine the action of PACs. The development of obesity, IR and other metabolic alterations was prevented by the administration of PACs.

The results of this thesis provide a better understanding of the mechanisms of action underlying the preventive and therapeutic effects of PACs in metabolic disorders, particularly in the intestine-liver axis.

Keywords: metabolic syndrome, metabolic homeostasis, oxidative stress, inflammation, proanthocyanidins, intestinal microbiota, microbial metabolites.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Table des matières	7
Liste des tableaux	10
Liste des figures	11
Liste des sigles et abréviations	13
Remerciements	18
Chapitre 1 – Introduction	19
Chapitre 2 – Recension des écrits	23
Généralités sur le syndrome métabolique	23
Historique et définitions	23
Étiologie du syndrome métabolique, facteurs de risques et complications	25
Obésité	25
Résistance à l'insuline et fonctions systémiques de cette hormone	29
L'insulinorésistance serait-elle une alliée à considérer dans certaines conditions métaboliques?	47
Stress oxydatif et inflammation chronique	52
Traitements disponibles et moyens de prévention	59
Les nouvelles stratégies basées sur l'alimentation et les produits naturels de santé	62
L'alimentation et les régimes alimentaires	62
Les produits naturels de santé	68
Les polyphénols dans le maintien de la santé métabolique	70
Caractéristiques et classification des polyphénols	72

Mécanismes d'actions, d'absorption et biodisponibilité des polyphénols.....	74
Quelques mécanismes d'actions majeurs des polyphénols	74
Fonctions antioxydantes des polyphénols	74
Propriétés anti-inflammatoires	75
Mécanismes épigénétiques.....	76
Absorption et biodisponibilité des polyphénols	77
Interactions polyphénols - microbiote intestinal : effet prébiotique des polyphénols et action bénéfique des post biotiques.....	81
Importance du microbiote intestinal	81
Métabolites microbiens des polyphénols (post biotiques) et leurs effets bénéfiques	85
Propriétés bénéfiques et quelques mécanismes d'actions des métabolites.....	91
Régulation de la composition et de la diversité du microbiote intestinal par les polyphénols et impact sur la santé	96
L'intestin : un organe clé dont la défaillance contribue à la perte générale de l'homéostasie métabolique	100
Structure et fonctions de l'intestin	100
L'axe intestin - foie	107
Quelques modèles de cellules intestinales	109
Chapitre 3 – Problématique, Hypothèse et Objectifs	113
Problématique.....	113
Hypothèse générale	115
Objectifs de l'étude	116
Chapitre 4 – Méthodologie	117
Caractérisation des polyphénols et étude cellulaire.....	117
Étude dans un modèle murin	119

Étude cellulaire.....	121
Chapitre 5 – Résultats	123
Article 1	123
Article 2	165
Article 3	202
Article 4	299
Chapitre 6 – Discussions et conclusions.....	331
Discussion	331
Impacts des PACs dans le maintien de la santé métabolique intestinale.....	333
Implications des PACs dans la prévention des MAFLD	338
Effets bénéfiques métaboliques du DHPVL	348
Conclusion	351
Chapitre 7 – Limites des études et Perspectives.....	352
Les polyphénols en tant qu’agents thérapeutiques : une alternative aux médicaments?	353
Références bibliographiques.....	356

Liste des tableaux

Tableau 1. –	<i>Résumé de quelques définitions du SM (adapté de Huang et al. et de Rochlani et al.) [49, 50]</i>	24
Tableau 2. –	<i>Liste non-exhaustive des métabolites des PP et leurs propriétés biologiques</i>	87
Tableau 3. –	<i>Quelques études d'intervention montrant les effets prébiotiques des polyphénols</i>	98
Tableau 4. –	<i>Exemples de modèles cellulaires intestinaux.....</i>	110

Liste des figures

Figure 1. – La résistance à l'insuline au cœur du syndrome métabolique (élaborée par Rask-Madsen et al, 2012)[80]	28
Figure 2. – Structure du récepteur de l'insuline avec un changement de conformation suite à la liaison avec son ligand (A, B) (Figures adaptées de Gutmann et al, 2018 et 2020) [86, 87]	30
Figure 3. – Transduction du signal de l'insuline via une cascade de phosphorylation aboutissant à la régulation du métabolisme ou à la prolifération (illustration adaptée de Cusabio, Insulin signaling pathway) [88].	31
Figure 4. – Schéma simplifié du contrôle négatif du signal de l'insuline par les AGL (A), les cytokines inflammatoires (B) et l'hyperinsulinémie (C) (adaptées de Eugène et al., 2012 et de Rhodes et al, 2013) [94, 95].	34
Figure 5. – Le rôle central de l'insuline dans le maintien de l'homéostasie métabolique de plusieurs tissus (élaborée par Rask-Madsen e al, 2012)[80]	40
Figure 6. – Figure montrant les mécanismes par lesquels la résistance à l'insuline (A) et la sensibilité accrue et induite à l'insuline (B) peuvent réduire (A) ou contribuer à aggraver (B) le stress métabolique en cas de pathologies métaboliques (adaptée de Nolan et al., 2019) [141] .	50
Figure 7. – Schéma récapitulatif montrant l'hypersécrétion de l'insuline contribuant à l'hyperinsulinémie avec des dérèglements métaboliques et une résistance à l'insuline de préservation au stade initial du SM (adaptée de Xing et al, 2022) [118]	51
Figure 8. – Implication du stress oxydatif et des espèces réactives de l'oxygène et de l'inflammation dans la mise place de dommages métaboliques; EROS: espèces réactives de l'oxygène (ROS : reactive oxigen species). (Image créée avec BioRender.com) [214].	54
Figure 9. – Effets des diètes selon leur composition sur la santé intestinale et métabolique (figure adaptée de Singh RK et al, 2017) [290].	64
Figure 10. – Classification générale des polyphénols (adaptée de Goszcz et al., 2015 et Pinto et al., 2017)[348, 386]	73
Figure 11. – Récapitulatif simplifié des propriétés antioxydantes des polyphénols (figure récapitulative réalisée à l'aide du logiciel powerpoint)	75

Figure 12. – Absorption et métabolisme des polyphénols et leurs dérivés chez l’humain (schéma réalisé à l’aide du logiciel powerpoint inspirée de la revue citée ici) [341].	80
Figure 13. – Modulation du microbiote intestinal par les composés phénoliques (schéma réalisé à l’aide du logiciel powerpoint).	85
Figure 14. – Structure de l’intestin grêle (tirée de Servier medical art)	100
Figure 15. – Structure de la muqueuse intestinale	101
Figure 16. – Anatomie de l’intestin grêle présentant la villosité (tirée de Servier medical art)	102
Figure 17. – Anatomie de l’intestin grêle présentant la villosité, les différentes cellules qui y sont présents et d’autres micro-organismes (adaptée de Abreu et al, 2010) [640]	105
Figure 18. – Interaction anatomique et physiologique entre l’intestin et le foie : axe intestin-foie (illustrée avec BioRender.com et inspirée de Ohtani et al, 2021)[654].	109
Figure 19. – Modèle cellulaire et expérimental. Schéma illustrant la monocouche formée par les cellules Caco 2 lorsqu’elles sont différenciées avec le milieu apical et celui basolatéral (Illustration inspirée de Tor Lea et al., 2015 et réalisée avec le logiciel powerpoint) [670].	118
Figure 20. – Design de l’étude avec le modèle murin (figure réalisée à l’aide du logiciel powerpoint pour expliquer le protocole expérimental)	121

Liste des sigles et abréviations

ACC: Acetyl-coenzyme A carboxylase

ADN: Acide désoxyribose nucléique (DNA)

AGCC: Acides gras à chaîne courte

AGS: Acides gras saturés

Akt/PKB: Protéine kinase B

AP-1: Protéine activatrice 1 (facteur de transcription)

BA : Acides biliaires

cBG : cytosolic β -glucosidase

COX-2: Cyclooxygénase-2

CRP: Protéine C réactive

DHPVL : 4,5-dihydroxyphenyl valerolactone

DHR : Dihydroresveratrol

DNMT: DNA methyltransferase protein

DT2: Diabète de type 2

EROS : Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species, ROS)

FAS: Synthase des acides gras (Fatty acid synthase)

FDA: US Food and Drug Administration

Fe/Asc: complexe Fer/ascorbate

FOXO: forkhead box class O

GLP-1: Glucagon like protein1

GPRs : Récepteurs couplés aux protéines G

GPx : Glutathion peroxydase

G-6-Pase : Glucose-6-phosphatase

HDL : Lipoprotéine de haute densité (High density lipoprotein)

HDL-c : HDL-cholestérol

HFHS : diète riche en gras et en sucrose (High fat high sucrose)

HMGCoAr: 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A reductase

HOMA-IR: Homeostatic model assessment for insulin resistance

I κ B : Inhibiteur du facteur nucléaire kappa B

IKK β : Ikappa B kinase (inhibiteur de I κ B)

IL-1 β : Interleukine 1 β

IL-6: Interleukine-6

IL-10 : Interleukine-10

IMC : Indice de masse corporelle

IRS: Substrat du récepteur de l'insuline

JNK: Jun kinase

LDL : Lipoprotéine de basse densité (Low density lipoprotein)

LDL-c : LDL-cholestérol

LDLr : Récepteur de la lipoprotéine LDL

LPH: Lactase phlorizine hydrolase

LPS : Lipopolysaccharides

MAFLD : Maladie du foie gras métaboliquement induite

MAMPs: Motifs moléculaires associés aux microbes

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

MDA: Malondialdehyde

MCP-1 : Protéine chémoattractante monocyttaire-1

MCV : Maladies cardiovasculaires

MetS : Metabolic syndrome

NAFLD : Maladie du foie gras non-alcoolique

NASH : Stéatose hépatique non-alcoolique

NF- κ B : Facteur de transcription nucléaire kappa B

NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NRF-2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

NO : Oxyde nitrique

OMS : Organisation mondiale de la santé

OxS : oxidative stress

PACs : Proanthocyanidines

PAI-1: Activateur du plasminogène 1

PAMPs : Motifs moléculaires associés aux pathogènes

PCSK9 : Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9

PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase

PI3K : Phosphoinositide-3 kinase

PKC : Protéine kinase C

PP: Polyphénols

PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α)

PTB : Phosphotyrosine binding domain (domaine de liaison à la phosphotyrosine)

PYY: Peptide YY

P38-MAPK: P38- Mitogen-activated protein kinase

RelA/p65: REL-associated protein/nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit

RI : Résistance à l'insuline

RSV : Resvératrol

SAA: Amyloïde A sérique

SAM: S-adénosyl methionine

SIBO: small intestinal bacterial overgrowth

SIRT: Sirtuin

SM : Syndrome métabolique

SOD : Superoxyde dismutase

SOx : Stress oxydatif

SREBP1-C: Sterol response element-binding protein 1c

TCM : Troubles cardiométaboliques

TG: Triglycérides

TLR: Toll-like receptor

TMA : Triméthylamine

TMAO : Triméthylamine-N-oxyde

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale α

USDA: Département de l'agriculture des États-Unis

VLDL: Lipoprotéine de très basse densité (very low density lipoprotein)

Romains 8 : 28 - 30

Remerciements

Mes remerciements vont en premier à l'endroit du Dr. Levy, qui m'a acceptée dans son laboratoire afin d'effectuer mes études doctorales. Merci beaucoup pour votre compréhension et surtout merci d'avoir été là quand je ne me croyais pas/plus à la hauteur. Je vous remercie pour les nombreux conseils scientifiques qui m'ont aidée durant ces années. Je remercie également Dre Marcil, qui a accepté de reprendre le flambeau afin de me guider vers la fin de mon parcours. Merci pour tout. J'ai beaucoup appris et grandi de toutes les expériences et épreuves le long de ce parcours.

Merci également à Dre Spahis (Zola) pour la patience dont tu as fait preuve envers moi et aussi ta disponibilité pour m'accompagner que ce soit dans les présentations/analyses des résultats ou encore dans le processus de soumission des articles. Je voudrais remercier Dr. Sané (Alain) pour sa compréhension et son aide dans les analyses des résultats le long de mon parcours dans le laboratoire. Je suis aussi reconnaissante pour chaque membre (anciens comme actuels) de l'équipe que j'ai pu rencontrer (Léna, Nickolas, Mathilde, Francis, Thierry, Noor). Je vous remercie pour votre soutien et votre disponibilité au quotidien que ce soit pour les analyses expérimentales ou pour de simples discussions.

Je remercie le département de Nutrition, la faculté de Médecine et les Études Supérieures de l'Université de Montréal pour m'avoir permis de continuer mes études graduées. Je les remercie aussi pour leur soutien financier. Je remercie également la chaire J.A. DeSève de recherche en nutrition du Dr. Levy pour son appui financier.

Je remercie également nos collaborateurs de l'INAF dont le Dr. Yves Desjardins pour leur confiance, leur patience, leur compréhension et aussi pour leur soutien financier et scientifique.

Enfin, mes remerciements vont à ma famille. Je vous remercie pour votre aide sans retenue et votre présence. Ses bontés ne sont pas épuisées et ses compassions ne sont pas à leur terme, elles se renouvellent chaque matin, grande est sa fidélité. Au restaurateur de mon âme, Merci !

Chapitre 1 – Introduction

Les maladies cardio-métaboliques chroniques connexes au syndrome métabolique (SM) ont atteint des proportions épidémiques à travers le monde et parmi leurs comorbidités, on retrouve les accidents vasculaires et cérébraux [1-3]. Le SM est considéré comme un problème de santé publique majeur et les décès prématurés qui en sont conséquents impactent fortement les budgets de santé des nombreux pays. Dans le système de santé canadien par exemple, de nombreux patients vivent avec une ou plusieurs maladies cardio-métaboliques chroniques [4, 5]. Les principales causes d'hospitalisation et de décès prématuré au Canada, avec près des trois-quarts des décès sont liés à plusieurs maladies chroniques dont le diabète et les maladies cardiovasculaires (MCV) [5, 6]. Ces maladies chroniques représentent environ 80 % des consultations pour soins de santé primaires et plus des deux-tiers des coûts associés aux soins de santé [4, 7].

Actuellement, il n'existe aucun agent thérapeutique fédérant l'ensemble des composantes pathologiques et des complications engendrées par le SM [8]. Les traitements disponibles se concentrent sur les ajustements des modes de vie et particulièrement de saines habitudes alimentaires accompagnées de l'exercice physique [8]. De leur côté, les médicaments utilisés contrôlent chacune des conditions pathologiques reliées au SM. Ainsi, l'utilisation de plusieurs traitements pharmacologiques peut causer de nombreux effets secondaires [9]. Des efforts continuent d'être déployés à cet effet afin de comprendre davantage les mécanismes sous-jacents et identifier les cibles de nouveaux traitements pour prévenir et/ou traiter les désordres métaboliques associés au SM.

L'objectif principal des travaux présentés ici est de proposer un traitement efficace avec un seul type de molécule thérapeutique pour traiter le SM, ce qui constitue un concept intéressant qui doit être évalué dans des études prospectives à long terme chez les patients. Allant dans le même sens, un grand intérêt est de plus en plus porté aux nutraceutiques et aux aliments fonctionnels tels que les acides gras (AG) oméga-3, les peptides de lait ou encore les polyphénols (PP) dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques additionnelles de prise en charge de plusieurs maladies cardio-métaboliques chroniques.

L'objectif à long terme de se concentrer sur les différents types de PP est de trouver la molécule capable de cibler la majorité voire toutes les conditions de risque cardiométabolique avec une seule thérapie, mais surtout sans le rajout des effets secondaires supplémentaires suite à la prise de médicaments.

Les PP disposent de multiples propriétés bénéfiques[10-12]. Plusieurs études ont montré qu'un apport important de PP permettrait de prévenir plusieurs désordres métaboliques associées à l'inflammation et au stress oxydatif (SOx) [13-17]. Le SOx et l'inflammation sont reconnus comme des acteurs physiopathologiques majeurs dont les marqueurs ont été identifiés à un stade précoce du développement de maladies métaboliques [18-21].

Les bienfaits physiologiques antioxydants et antiinflammatoires des PP ont été démontrés dans des organes métaboliques clés tels que le foie, les muscles, le tissu adipeux ou encore le pancréas [22-24]. L'intestin, l'un des organes centraux de l'homéostasie métabolique, a été malheureusement peu exploré dans ce contexte.

L'intestin joue un rôle primordial dans le métabolisme, l'absorption, la sécrétion et le transport de plusieurs nutriments [25-28]. La barrière épithéliale intestinale reconnue comme très étanche intervient aussi dans la protection de l'organisme contre des endotoxines métaboliques [25-28]. D'autre part, l'intestin, par la sécrétion de peptides et de métabolites, intervient dans la régulation de plusieurs fonctions cruciales telles que le métabolisme énergétique, et l'homéostasie du glucose et des lipides [25-28]. En outre, l'étude de nouvelles modalités d'interactions entre le microbiote, la membrane intestinale et le système immunitaire suggère aussi qu'un déséquilibre du microbiote intestinal contribuerait à promouvoir l'endotoxémie métabolique et l'inflammation chronique représentant une étape importante dans la pathogenèse des maladies métaboliques [29]. Dans l'ensemble, on constate que le fonctionnement de plusieurs organes périphériques [30], le métabolisme entéro-endocrinien [31], le métabolisme lipidique et énergétique [32] et le développement du risque cardiovasculaire [33] peuvent être affectés à la fois par les fonctions gastrointestinales et le microbiote local. Actuellement, on convient qu'une défaillance dans les fonctions intestinales peut contraindre l'organisme à développer plusieurs anomalies métaboliques.

Plusieurs facteurs intrinsèques (stimuli avec des propriétés oxydantes ou proinflammatoires provenant de nutriments ingérés, du cholestérol oxydé, les microbes et les infections, l'ischémie/reperfusion, la production d'acide gastrique) contribuent à fragiliser l'intestin et à le rendre plus susceptible au SOx et à l'inflammation [34-36]. Le SOx et l'inflammation, acteurs intimement liés, pourraient ainsi contribuer à altérer significativement le métabolisme énergétique intestinal en interférant avec la phase entérocytaire ou absorptive [37-41]. Les mécanismes par lesquels le SOx et l'inflammation participent à la genèse des désordres lipidiques semblent également impliquer la mitochondrie, une organelle critique de l'homéostasie redox qui abrite les processus de β -oxydation des AG et de phosphorylation oxydative [42, 43]. Pour ces diverses raisons, il faut se pencher davantage sur le rôle de l'intestin dans les anomalies métaboliques et, de plus, déterminer l'impact d'aliments fonctionnels sur leurs étiologies. L'accent devrait par ailleurs se porter sur la place des PP comme stratégie thérapeutique dans la prise en charge des pathologies métaboliques, en visant particulièrement le tube gastrointestinal.

Cette insistance sur les PP s'explique non seulement par leurs relations avec les fonctions intestinales, mais également par leurs interactions avec la flore intestinale et le métabolisme subséquent. Il est important de souligner que ~ 90% des PP ingérés sont métabolisés par le microbiote intestinal avant d'être absorbés [44, 45]. Certains travaux suggèrent même que les effets bénéfiques attribués aux PP seraient plutôt obtenus par le biais de métabolites bioactifs de faible poids moléculaires produits suite au métabolisme *in situ* des PP [44].

Ce programme de recherche est effectué afin de démontrer d'une part les effets des PP plus spécifiquement les proanthocyanidines (PACs) sur l'homéostasie intestinale, leurs actions bénéfiques sur la RI, l'homéostasie des lipides, les dérangements métaboliques intestinaux et hépatiques. D'autre part, ce projet doctoral souhaite aussi montrer les propriétés bénéfiques de métabolites microbiens phénoliques, issus de la digestion de PP "parents", sur la santé métabolique intestinale. Pour ce faire et afin de comprendre les résultats qui ont été obtenus dans ce programme doctoral, cette thèse est présentée comme suit :

1. Une revue de la littérature décrivant, entre autres, l'étiologie du SM, les stratégies thérapeutiques pharmacologiques/non pharmacologiques disponibles pour la prise en

charge des pathologies cardio-métaboliques, les PP et les mécanismes sous-jacents à leurs bienfaits favorisant le maintien de l'homéostasie métabolique.

2. Une description de la problématique, des hypothèses et des objectifs de cette thèse.
3. L'ensemble des résultats qui ont été obtenus dans les projets composant cette thèse. Ces résultats sont présentés sous forme de plusieurs articles scientifiques.
4. Une discussion générale de l'ensemble des résultats présentés.
5. Finalement, une conclusion des résultats comportant des perspectives liées à cette thèse.

Chapitre 2 – Recension des écrits

Généralités sur le syndrome métabolique

Historique et définitions

Au XVIII^e siècle déjà, le médecin et anatomiste Jean-Baptiste Morgagni faisait référence au SM à la suite d'observations anatomopathologiques, soit, l'association de plusieurs anomalies métaboliques chez ses patients [46, 47]. Ces anomalies incluaient l'obésité viscérale, l'hypertension artérielle, l'athérosclérose, l'hyperuricémie et les troubles respiratoires pendant le sommeil [46]. Plusieurs études épidémiologiques et physiologiques ont documenté l'importance de l'obésité viscérale ou abdominale comme un facteur déterminant dans le développement de la résistance à l'insuline (RI), du diabète de type 2 (DT2), de l'hypertension, de la dyslipidémie et des pathologies cardiovasculaires [46-48]. Le terme SM fut introduit pour la première fois en 1975 et fut en quelque sorte mis de côté en raison de la notion de syndrome X introduite dans la même période (1988) par Gerald Reaven [46-48]. La définition du syndrome X de Reaven incluait l'hypertension, l'altération de la tolérance au glucose, l'hyperinsulinémie, des niveaux élevés de triglycérides (TG) et de lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et des taux faibles de lipoprotéines de haute densité-cholestérol (HDLc) [46, 47]. En 1988, Reaven a décrit le SM comme un ensemble d'anomalies liées à l'insulinorésistance conduisant à l'hyperinsulinémie qui est un mécanisme de compensation pour l'insensibilité cellulaire à l'action de l'insuline [46-48].

Dans cette nouvelle ère, le SM fait référence à la présence simultanée de plusieurs conditions de risque cardiovasculaires connues, notamment l'obésité, la RI avec intolérance au glucose, la dyslipidémie athérogène et l'hypertension. Ces facteurs de risques sont interdépendants et partagent des médiateurs, des mécanismes et voies sous-jacents. Le [Tableau 1.](#) – fait un récapitulatif de quelques-unes des définitions les plus couramment utilisées pour caractériser le SM.

Tableau 1. – *Résumé de quelques définitions du SM (adapté de Huang et al. et de Rochlani et al.) [49, 50]*

Mesures cliniques	NCEP ATP III (2005)	WHO (1998)	EGIR (1999)	IDF (2005)
Prérequis	Aucun	RI	Hyperinsulinémie (insuline plasmatique >75 ^{ème} percentile)	Obésité abdominale
Critères à valider	3 critères sur les 4 cités plus bas	RI/DT2 plus 2 critères sur les 4 cités plus bas	Hyperinsulinémie plus 2 critères sur les 4 cités	Obésité plus 2 critères sur les 4 cités
Obésité	Tour de taille ≥102cm (H) et ≥88cm (F)	Ratio taille/hanche >0.90(H) et >0.85 (F) et/ou IMC ≥30kg/m ²	Tour de taille >94 cm (H) et >80cm (F)	Obésité abdominale requis (Tour de taille >94 cm)
Hyperglycémie	Glycémie à jeun ≥110mg/dL ou Tx	RI	RI	Glycémie à jeun ≥100mg/dL
Dyslipidémie	Taux de TG ≥1.69mmol/L ou Tx HDLc <1.03mmol/L (H) et <1.29mmol/L (F) ou Tx	Taux de TG ≥1.69mmol/L ou taux de HDLc <0.90mmol/L (H) et <1.01mmol/L (F)	Taux de TG ≥1.69mmol/L ou taux de HDLc <1.01mmol/L	Taux de TG ≥1.69mmol/L ou Tx HDLc <1.03mmol/L (H) et <1.29mmol/L (F) ou Tx
Hypertension	>130/85mmHg ou Tx	≥140/90mmHg	≥140/90mmHg ou Tx	>130/85mmHg ou Tx
Autres	-	Microalbuminurie	-	-

NCEP ATP III: The National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines, **WHO:** World Health Organization, **EGIR:** European Group for the study of Insulin Resistance, **IDF:** International Diabetes Federation, **TG:** Triglycérides, **HDLc:** HDL-cholestérol, **(F):** Femmes, **(H):** Hommes, **Tx:** sous un traitement pharmacologique

Le SM est donc un désordre complexe et multifactoriel, précurseur de nombreuses complications chroniques telles que le DT 2, l'athérosclérose, la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD), les MCV [51, 52].

La prévalence du SM augmente de façon exponentielle avec l'explosion du surpoids et de l'obésité, atteignant ainsi des proportions épidémiques. Le SM est une condition de santé publique qui affecte 20 à 25 % de la population adulte mondiale, augmentant ainsi leur risque de développer les maladies connexes [53]. Malheureusement, le Canada n'est pas exclu de ce problème de santé mondial qui représente environ 17 % du coût total en soins de santé et 43 % de toutes les causes de mortalité selon les données du "*Metabolic Syndrome Canada*" [54].

Les mécanismes qui sous-tendent la pathogenèse du SM sont très complexes et ne sont pas encore élucidés de façon exhaustive. Plusieurs paramètres généraux afférents à nos comportements et notre environnement de vie tels que les environnements alimentaires obésogènes et un mode de vie sédentaire contribuent au développement de désordres métaboliques [55, 56]. Outre ces paramètres, des composantes biologiques dont le microbiote intestinal, les facteurs génétiques et les mécanismes épigénétiques sont également associés à la mise en place de pathologies métaboliques [55, 56]. Par ailleurs, des corrélations évidentes ont été établies entre les conditions pro-oxydantes, le statut inflammatoire, l'indice de masse corporelle (IMC), et les désordres métaboliques [57]. Ces corrélations peuvent être très importantes dans l'identification de nouveaux biomarqueurs, et de cibles moléculaires, et aussi pour le développement de traitements efficaces contre le SM.

Étiologie du syndrome métabolique, facteurs de risques et complications

Des facteurs cruciaux tels que l'obésité et la RI, sont impliqués dans la physiopathologie du SM. Aussi, l'inflammation systémique et le SOx sont des mécanismes majeurs sous-jacents dans la pathogenèse du SM et des maladies cardio-métaboliques associées.

Obésité

L'obésité est une maladie chronique d'origine multifactorielle, un problème de santé publique majeur qui, depuis ces dernières décennies, concerne la quasi-totalité de la planète, dont de

nombreux pays émergents [58-62]. Ses causes sont complexes; elle résulte de l'intrication de plusieurs facteurs – alimentaires, génétiques, épigénétiques, environnementaux, psycho-sociaux et socio-économiques – impliqués dans le développement et la progression de cette maladie chronique [61, 63, 64]. Selon l'OMS, environ 1.9 milliards d'adultes (18 ans et plus) sont en surpoids et plus de 650 millions sont obèses, en 2016 [62, 65, 66]. Le nombre de personne en embonpoint ou souffrant d'obésité a considérablement augmenté au cours des dernières années à tel point que l'OMS a qualifié l'obésité d'épidémie. Selon *Statistique Canada*, deux adultes sur trois sont soit en surpoids ou soit obèses au Canada. Par ailleurs, au cours de ces 25 dernières années, le nombre d'enfants souffrant d'obésité a presque triplé, aussi bien chez les garçons que chez les filles, et dans tous les groupes d'âge, exceptés les enfants d'âge préscolaire [67].

L'obésité se définit comme un excès de gras, conséquence d'une balance énergétique excédentaire sur une longue période, causé probablement par une hypertrophie et dysfonction du tissu adipeux [61, 68]. Cette augmentation excessive de la masse adipeuse dans l'organisme conduit à un IMC de 30 ou plus avec l'IMC ou indice de Quételet comme outil de diagnostic de référence de l'obésité. Il s'agit d'un rapport du poids (en kg) sur le carré de la taille (en mètres) [49]. Outre l'IMC, le tour de taille est une mesure aussi utilisée par les professionnels de la santé pour statuer sur l'obésité et évaluer le risque de problèmes de santé associés à un excédent de poids ou à un poids insuffisant. Le tour de taille est associé à l'excès de gras abdominal. Un excès de graisse autour de la taille et dans la partie supérieure du corps (la graisse qui se trouve autour des intestins ou du foie) constitue un risque plus élevé pour la santé [69, 70]. Il est donc important de souligner que l'obésité, surtout abdominale, est l'une des causes majeures de maladies et de morts prématurés et évitables [69, 70]. Un tour de taille égal ou supérieur à 102 cm (40 po) chez les hommes ou à 88 cm (35 po) chez les femmes est associé à un risque accru de développer des problèmes de santé comme le diabète de type 2, les maladies coronariennes et de l'hypertension [49]. Étant donné que ces seuils ne sont qu'approximatifs, un tour de taille légèrement inférieur à ces valeurs devrait aussi être pris au sérieux. Sans doute, l'obésité fragilise la santé et réduit l'espérance de vie [62]. Les complications associées incluent le DT2 (dont 44% des cas sont imputables au surpoids/obésité), les maladies cardiaques (dont 23% des cas liés au surpoids/obésité) et les cancers (entre 7% et 41% des cas associés au surpoids/obésité selon les

localisations) [65, 71-76]. L'ensemble de ces complications entraînent le décès d'au moins 2,8 millions de personnes chaque année. Ainsi, le surpoids et l'obésité sont reconnus par l'OMS comme la cinquième cause de mortalité [59, 77, 78].

Tel que montré dans la **Figure 1. –**, l'obésité s'accompagne généralement d'hyperinsulinémie et d'insulinorésistance; plus la masse adipeuse augmente et moins l'organisme est sensible à l'insuline, conduisant souvent à un état de prédiabète [69, 70, 79]. De plus en plus d'études suggèrent que c'est plutôt l'hyperinsulinémie qui contribue au développement de l'obésité. L'augmentation du stockage des graisses dans le tissu adipeux, associée au développement de l'obésité, provoque à long terme une altération de la capacité des adipocytes à entreposer les triglycérides. Par conséquent, la graisse est déposée dans d'autres organes, y compris le foie et les muscles squelettiques [69, 80]. Les lipides ectopiques et leurs métabolites provoquent une lipotoxicité qui contribue au développement de la RI dans les muscles et dans les autres tissus périphériques [69, 80]. La lipotoxicité affecte le métabolisme du glucose et contribue à l'altération de plusieurs autres voies de signalisation métaboliques aussi bien dans le tissu adipeux que dans les organes périphériques. La lipotoxicité résultant de l'accumulation de gras affecte les fonctions normales homéostatiques des organes métaboliques majeurs et conduit éventuellement à leur défaillance. Les niveaux circulants élevés de lipides et les perturbations du métabolisme des AG ont été corrélés avec les défauts de signalisation de l'insuline. Parallèlement à la défaillance métabolique du tissu adipeux, il y a une infiltration de ce tissu adipeux dysmétabolique par les macrophages et d'autres cellules immunitaires, probablement à cause de l'expression adipocytaire de la protéine chémoattractante monocyttaire-1 (MCP-1) et d'autres cytokines, ou en réponse à l'hypoxie du tissu adipeux ou à la mort des adipocytes [80, 81]. Les cytokines circulantes, libérées par les macrophages du tissu adipeux, contribuent également à la RI au niveau des muscles, du foie ainsi que dans d'autres tissus [80, 81]. L'hypertrophie des adipocytes, contribue probablement à des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires, qui contribue à réduire leur sensibilité à l'action anti-lipolytique de l'insuline [80, 81].

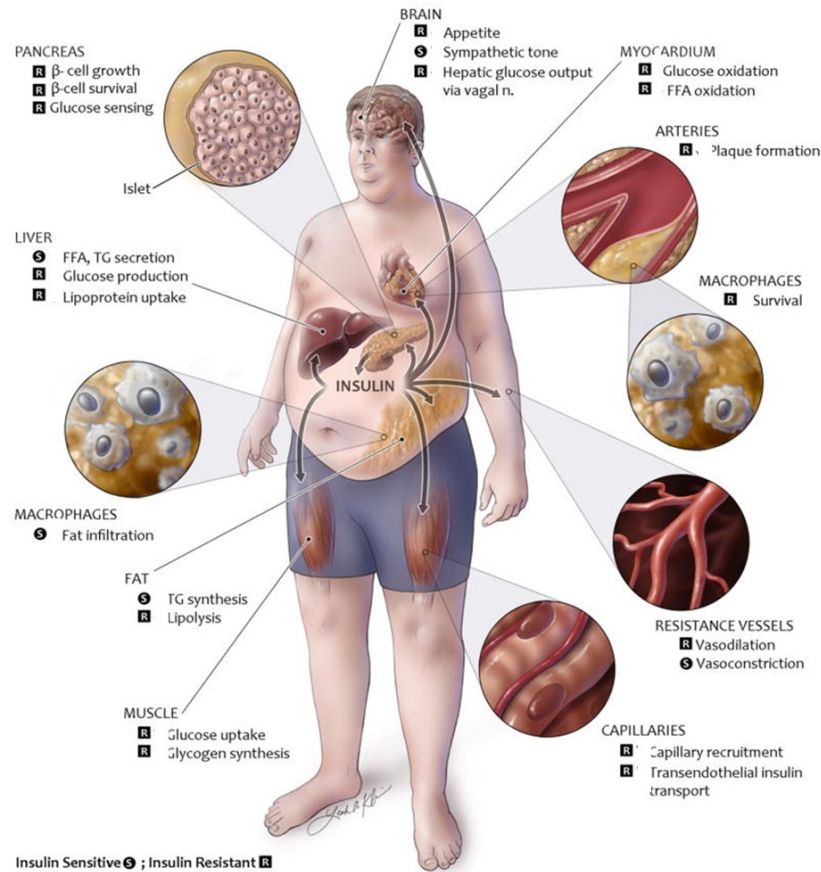


Figure 1. – La résistance à l’insuline au cœur du syndrome métabolique (élaborée par Rask-Madsen et al, 2012)[80]

L’obésité est un acteur majeur dans la pathogenèse de la RI, le SM et des maladies cardiométaboliques. L’altération de la signalisation de l’insuline dans une large variété de tissus est reconnue dans la mise en place du SM compte tenu du rôle central de cette hormone. On peut noter l’infiltration de macrophages et autres cellules immunitaires dans le tissu adipeux dysmétabolique résistant à l’action anti-lipolytique de l’insuline avec comme conséquence l’hypoxie, l’inflammation, le dépôt ectopique des lipides et de leurs métabolites dans les autres tissus périphériques et les taux élevés d’AGL libres (AGL) circulants. Les cytokines proinflammatoires libérées par le tissu adipeux dysmétabolique et les AGL et leurs métabolites contribuent à l’inflammation et la lipotoxicité au niveau d’autres tissus tels que le foie, le pancréas, les muscles contribuant à une résistance de ces tissus à l’action de l’insuline ce qui permet une hyperinsulinémie et une hyperglycémie prolongée. La RI au niveau du cerveau en cas d’obésité se traduit par une incapacité à supprimer l’appétit, l’intolérance au glucose et l’hyperglycémie à jeun. La résistance des cellules endothéliales à l’insuline peut contribuer à réduire le transport et la délivrance de l’insuline

vers les tissus cibles et par conséquent diminuer l'action de l'hormone dans ces tissus. Par ailleurs, la RI des cellules endothéliales et des macrophages contribue respectivement à l'inflammation de l'endothélium vasculaire. Le métabolisme du muscle cardiaque est également affecté par l'obésité avec une résistance des cardiomyocytes à l'insuline. En cas d'obésité, le myocarde est incapable de s'adapter aux changements dans les disponibilités de substrats. Une permission a été accordée par l'éditeur **Wolters Kluwer Health, Inc.** pour l'utilisation de cette figure.

Résistance à l'insuline et fonctions systémiques de cette hormone

Les risques de développer les maladies cardiométaboliques et cardiovasculaires augmentent avec la RI, conférée par le dérangement de la signalisation de l'insuline [80, 82]. Plus les cellules de l'organisme deviennent résistantes à l'action de l'insuline, plus l'homéostasie métabolique des lipides et du glucose est altérée [80]. En effet, lorsque les cellules hépatiques, musculaires et adipeuses deviennent moins sensibles à l'insuline, leur captation de glucose baisse substantiellement augmentant ainsi les concentrations de glucose dans la circulation sanguine. Dans cette situation, les cellules pancréatiques sécrètent davantage d'insuline afin de pallier à la RI, et peuvent finir par s'hypertrophier [80]. Subséquemment, la production d'insuline devient insuffisante causant des taux très élevés de glucose dans le sang (hyperglycémie chronique). La RI se situe donc au cœur du SM qui est parfois qualifié de syndrome de la RI. La RI contribue inéluctablement à la pathogenèse du SM [80], et est cliniquement définie comme l'incapacité d'une concentration précise et connue d'insuline endogène ou exogène à stimuler l'absorption et l'utilisation du glucose chez un individu autant qu'elle le ferait dans une population saine [82].

L'insuline est une hormone peptique hypoglycémisante qui régule la mise en réserve des substrats glucidiques et lipidiques [83]. L'action de l'insuline se révèle essentielle pour le maintien de l'homéostasie métabolique énergétique, et ses effets sont conséquents à sa fixation à un récepteur membranaire spécifique exprimé en priorité dans des tissus métaboliques tels que le foie, le muscle et le tissu adipeux [83-85]. Le récepteur de l'insuline possède une activité tyrosine-kinase, ce qui permet une autophosphorylation du récepteur puis la phosphorylation sur des résidus tyrosine des protéines substrats, protéines IRS (substrat du récepteur de l'insuline) en priorité, et la formation de complexes macromoléculaires d'activation à proximité du

récepteur[83, 84]. La structure du récepteur de l'insuline et la transduction des signaux suite à son activation sont illustrées au niveau de la **Figure 2. –** et la **Figure 3. –**.

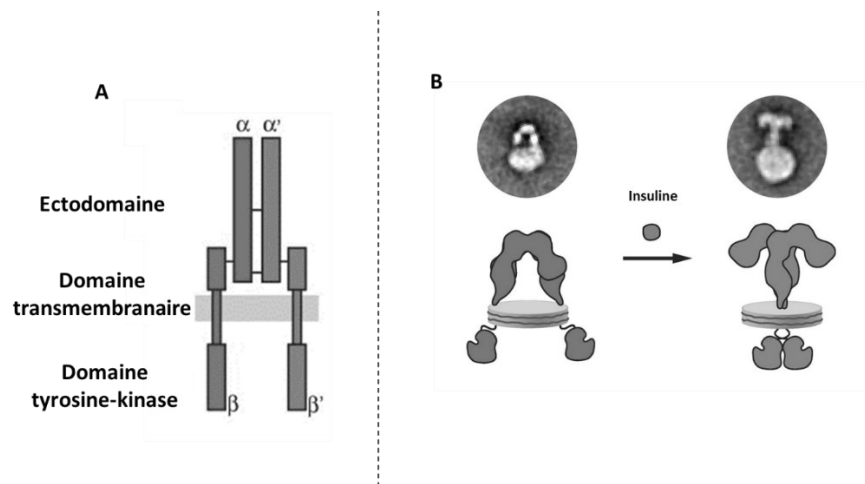


Figure 2. – Structure du récepteur de l'insuline avec un changement de conformation suite à la liaison avec son ligand (A, B) (Figures adaptées de Gutmann et al, 2018 et 2020) [86, 87]

Les changements dans la conformation du récepteur à la suite de la liaison de son ligand ont été observé au microscope électronique. Le récepteur de l'insuline est un récepteur tyrosine-kinase dont le rôle est fondamental dans la régulation du métabolisme du glucose, des lipides et dans la régulation de la croissance. Ce récepteur se présente exclusivement en tant qu'homodimères $(\alpha\beta)_2$ liés par des liaisons covalentes à la surface de la cellule (A). En l'absence d'insuline, l'ectodomaine de son récepteur adopte la conformation symétrique en forme de U inversé (B). Lorsque l'insuline se lie au récepteur, l'ectodomaine du récepteur se transforme en une conformation en forme de T qui réunit les domaines transmembranaires, afin de faciliter la trans-autophosphorylation des domaines tyrosine kinase (B).

L'activation du récepteur à la surface cellulaire par l'insuline induit une cascade de signalisation en amont impliquant des cibles intra-cellulaires et conduisant à la régulation des différentes réactions chimiques et physiologiques impliquant le glucose et les lipides [83-85]. Deux voies de signalisation distinctes telles que la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3k), activant la protéine kinase B (impliquée dans les effets métaboliques), et la voie des MAP (mitogen-activated protein)-kinases, (modulant surtout les effets nucléaires, & la croissance et la différenciation) peuvent être induites par la liaison de l'insuline à son récepteur [83-85]. L'induction d'un effet spécifique

de l'insuline suppose généralement une coordination de plusieurs voies intracellulaires, dont les deux voies sus-citées, rendant ainsi compte de la pléiotropie et de la spécificité du signal [83-85].

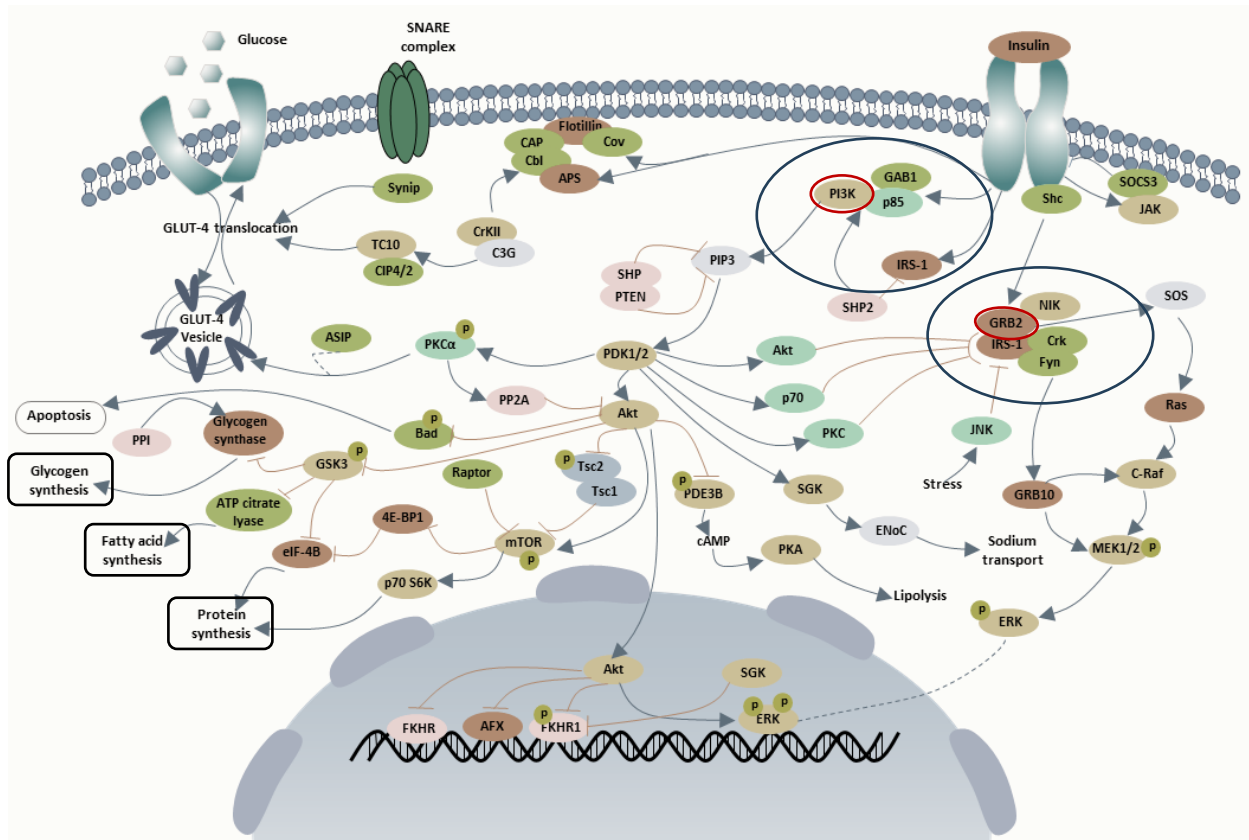


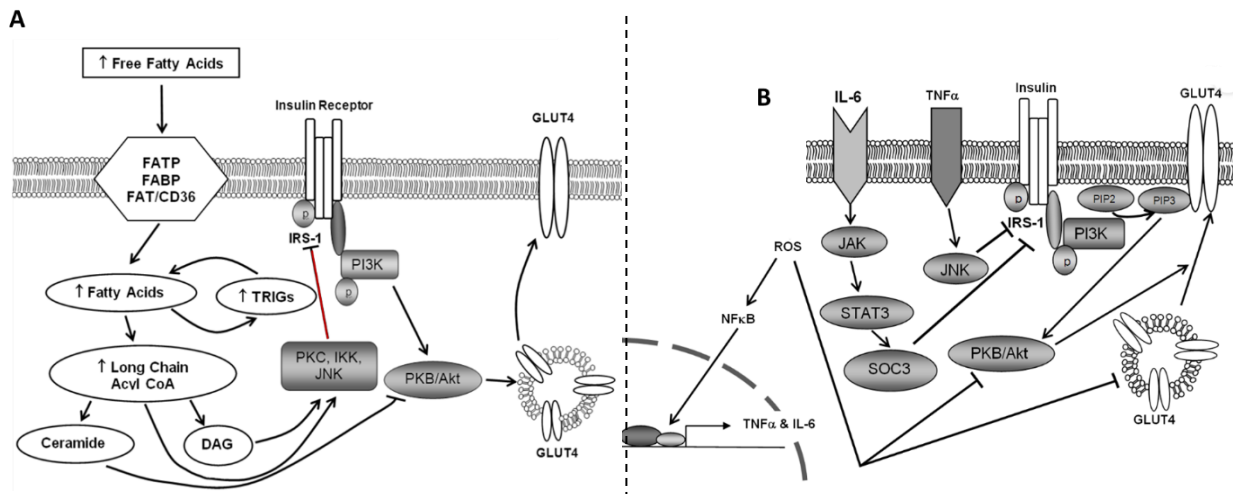
Figure 3. – Transduction du signal de l'insuline via une cascade de phosphorylation aboutissant à la régulation du métabolisme ou à la prolifération (illustration adaptée de Cusabio, Insulin signaling pathway) [88].

La liaison de l'insuline à son récepteur induit un changement de conformation du récepteur permettant son activation par une trans-autophosphorylation des sous-unités β du domaine tyrosine-kinase, ce qui constitue le point initial du processus de transduction du signal. Une cascade de phosphorylation et d'activation des protéines effectrices est alors enclenchée permettant le transport et la transduction du signal. En effet, le récepteur phosphorylé peut recruter les protéines IRS ou les protéines SHC au niveau des résidus tyrosine. Une fois recrutée, les protéines IRS sont phosphorylées au niveau de résidus tyrosine spécifiques par les tyrosines kinases du récepteur. Une fois phosphorylée, les protéines IRS sont à leur tour reconnues par des protéines effectrices (*i.e.* la PI3kinase, les protéines adaptatrices Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) et CrkII, la tyrosine-kinase Fyn et la phosphotyrosine phosphatase SHP2 (*SH2 domain protein tyrosine phosphatase-2*) à l'aide de leurs domaines SH2 (*src homology 2*) et qui vont relayer

le signal. Les principales voies de signalisation PI3K/PKB-AKT régulant le métabolisme et la voie des MAPK régulant la croissance et la prolifération peuvent être activées suite à l'activation du récepteur de l'insuline. L'insuline stimule l'absorption du glucose dans les muscles et les adipocytes par la translocation des vésicules GLUT4 vers la membrane plasmique. La translocation de GLUT4 implique la voie PI3K/Akt et la phosphorylation de CAP médiée par les IR, ainsi que la formation du complexe CAP:CBL:CRKII. Une fois phosphorylée et activée, la PI3 kinase phosphoryle à son tour en position 3 les phosphoinositides (PIP) membranaires, créant ainsi des sites de reconnaissance pour d'autres kinases cellulaires telles que la protéine kinase B (PKB)/Akt ou la PDK1/2 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1/2*). La PKB activée par phosphorylation va à son tour phosphoryler et activer d'autres effecteurs impliqués en priorité dans les effets métaboliques de l'insuline. La phosphorylation de la glycogène synthase 3 kinase (GSK3)- β impliquée dans la glycogénogenèse. L'activation par phosphorylation de la kinase p70^{rsk} et du facteur 4E-BP1 (*4E binding protein 1*), via la kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), quant à elle, participe à l'action de l'hormone dans la synthèse protéique en augmentant le niveau général de traduction. Une fois activée, la voie PI3 kinase/PKB réprime également l'expression génique de ces facteurs de transcription de la famille Forkhead, tels que FKHR, en les phosphorylant, les empêchant ainsi d'activer, au niveau nucléaire, leurs gènes cibles tels que celui de l'enzyme clé de la néoglucogenèse, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Toujours par la voie PKB, l'insuline exerce un effet anti-apoptotique en phosphorylant et inhibant le facteur pro-apoptotique Bad. Outre la régulation du métabolisme, la signalisation de l'insuline a des effets mitogènes et elle régule la croissance et la prolifération par le biais de la cascade de l'Akt ou par l'activation des Ras/MAPK. En se liant à son récepteur, l'insuline peut activer deux voies aboutissant à l'activation de la voie des MAP kinase: via les protéines IRS, la liaison de l'adaptateur Grb2 sur des phosphotyrosines spécifiques permet d'activer le facteur d'échange nucléotidique SOS (*son of sevenless*) qui active la protéine G Ras dans la membrane plasmique en stimulant l'échange du GDP contre le GTP. Ras active la kinase Raf, qui phosphoryle alors et active la MAP kinase kinase (MEK) responsable de l'activation par phosphorylation des deux MAP kinases, ERK1 et 2 (*extracellular signal-regulated kinase*). Celles-ci vont activer la kinase p90^{rsk} impliquée dans la synthèse protéique et vont entrer dans le noyau afin de phosphoryler et activer des facteurs de transcription tels que p62^{TCF} impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Une deuxième possibilité de mise en route de la voie MAP kinase part du récepteur de l'insuline qui recrute sur la tyrosine 960 les protéines adaptatrices de la famille SHC (*src homologous and collagen protein*), elles-mêmes reconnues par la protéine Grb2 activant la voie Ras.

Un signal de rétrocontrôle négatif conduisant à l'inactivation de la signalisation de l'IRS peut provenir de cascades Akt/PKB, PKC ζ , p70 S6K et MAPK. Plusieurs facteurs peuvent réguler le signal de l'insuline : c'est le cas de la déphosphorylation du récepteur par les protéines-tyrosines phosphatases (PTPases) ou encore de la dégradation de l'insuline[85]. Ce contrôle négatif va aussi être provoqué par la phosphorylation de résidus sérine/thréonine (Ser/Thr) sur le récepteur et sur les protéines IRS [85, 89]. Ainsi, la phosphorylation des résidus sérine ou thréonine permettrait d'inhiber l'activation physiologique du récepteur [89]. Cependant, une phosphorylation excessive peut être pathologique et entraîne une résistance à l'hormone [89].

Pathophysiologie de la RI : De nombreux acteurs impliqués dans la pathologie de la RI, comme l'hyperinsulinémie, les facteurs inflammatoires comme *tumor necrosis factor α* (TNF- α) et interleukine 1 β (IL 1 β), les AGL libérés en excès par le tissu adipeux et leurs métabolites (le diacylglycérol, les acyl-CoA) peuvent induire la phosphorylation du récepteur et des protéines IRS sur leurs résidus sérine/thréonine [90-92]. En effet, les activités catalytiques des enzymes telles que la protéine kinase C (PKC) ζ , la kinase IKK β (*inhibitor of nuclear factor κ B kinase*), la MAP kinase et surtout la Jun kinase (JNK) vont être régulées par ces acteurs. Ces différentes enzymes vont par la suite phosphoryler les IRS au niveau des résidus Ser/Thr [90, 93].



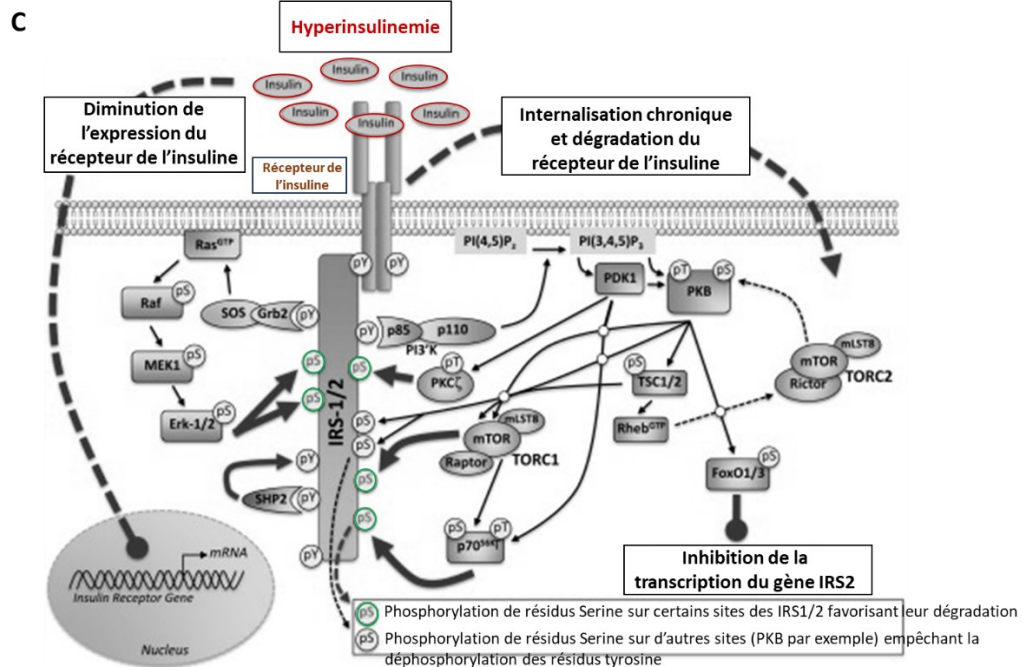


Figure 4. – Schéma simplifié du contrôle négatif du signal de l'insuline par les AGL (A), les cytokines inflammatoires (B) et l'hyperinsulinémie (C) (adaptées de Eugène et al., 2012 et de Rhodes et al, 2013) [94, 95].

Une fois que l'insuline a activé les voies de transduction du signal IRS dans les cellules, il existe, après un certain temps, des signaux physiologiques internes de rétrocontrôle négatif, qui dans un contexte d'homéostasie métabolique, ont pour objectif de garantir que le "signal de l'insuline" n'est pas maintenu de façon chronique. Le rétrocontrôle du signal activé par l'insuline par le biais de la phosphorylation des résidus sérine/thréonine des protéines IRS peut être induit par plusieurs facteurs dont l'insuline même ou par l'action des acteurs tels que les AGL (A), les cytokines proinflammatoires (le TNF α , l'IL 1 β , l'IL 6) (B). Les kinases telles que la kinase IKK β (*inhibitor of nuclear factor κ B kinase*), la MAP-kinase et surtout la Jun kinase (JNK), activées par le TNF- α sont capables d'effectuer de telles phosphorylations. En phosphorylant la sérine 307 de l'IRS1 murin, la JNK empêche l'interaction du domaine de liaison PTB (phosphotyrosine binding domain) de IRS1/2 avec la tyrosine 960 phosphorylée du récepteur de l'insuline ce qui inhibe le relai du signal. Cette kinase est activée par l'insuline même et par le TNF α . Par ailleurs, une augmentation du taux des AGL et l'accumulation de leurs métabolites dont le diacylglycérol et l'acylCoA pourraient conduire à une activation de la PKC θ et à une phosphorylation de l'IRS1 sur Ser/Thr. Dans des conditions d'hyperinsulinémie (C), la rétroaction entraîne une désensibilisation chronique de la transduction du signal IRS et contribue à l'état de RI. L'activation en aval des kinases régulées par le signal extracellulaire (Erk-

1/2) peut conduire à la phosphorylation de la sérine (pS) d'IRS-1/2 par la protéine kinase Erk-1/2, ce qui entraîne la dissociation de l'interaction entre le récepteur de l'insuline et IRS-1/2, ainsi que la dégradation d'IRS-1/2. C'est l'une des voies de l'inhibition par rétroaction de la signalisation de l'insuline. L'activation de la protéine kinase-1 (PKC1) dépendante des phosphoinositides peut entraîner l'activation en aval d'isoformes atypiques de la PKC, telles que la PKC ζ , qui peut également phosphoryler en sérine (pS) les IRS-1/2 pour favoriser leur dégradation, ce qui représente une autre voie d'inhibition par rétroaction de la transduction du signal de l'insuline. En revanche, la PKB/Akt peut phosphoryler en sérine l'IRS-1/2 sur des sites alternatifs afin de stabiliser l'état de phosphorylation de la tyrosine de l'IRS-1/2 et d'améliorer ainsi la signalisation en aval. Cependant, l'activation de la phosphorylation par la PKB de certains de ses autres substrats peut avoir un effet de rétroaction plus dominant et négatif sur la signalisation de l'IRS. La cible du complexe de rapamycine-1 (TORC1) et la kinase ribosomale p70 S6 (p70S6K) (cette dernière étant amplifiée par la phosphorylation de PDK1) peuvent toutes deux phosphoryler en sérine les IRS-1/2 pour favoriser leur dégradation, ce qui atténue alors la signalisation des IRS. Il s'agit là d'une troisième voie pour l'inhibition par rétroaction de la signalisation de l'insuline. Une quatrième voie pourrait passer par la *Src-homology domain-tyrosine phosphatase-2* (SHP2) qui, en se liant à certains résidus de phosphotyrosine sur IRS-1/2, devient activée et peut alors éliminer le phosphate des phosphotyrosines sur IRS-1/2, freinant ainsi la signalisation en aval. Il a été démontré que FoxO1 et -3a sont des facteurs critiques pour l'expression de l'IRS-2 dans des conditions basales, en particulier FoxO3a dans les cellules β . Mais lorsque la signalisation des IRS est déclenchée par l'insuline, l'activité transcriptionnelle de FoxO1/3a est inactivée, ce qui entraîne une autre voie de rétro-inhibition temporelle en diminuant l'expression des IRS-2. Il a été démontré que plusieurs de ces mécanismes de rétroaction de la signalisation IRS sont présents dans les cellules β du pancréas. Un autre élément à prendre en compte pour le rétrocontrôle négatif de l'action de l'insuline est que lorsque l'insuline se lie à son récepteur, le complexe insuline/récepteur de l'insuline est internalisé dans la cellule où il se dissocie dans un compartiment endosomal, ce qui permet au récepteur de l'insuline "libre" de retourner à la surface. Lorsque les taux d'insuline sont élevés, ce cycle favorise la présence d'un nombre minimal de récepteurs de l'insuline à la surface de la cellule, la majorité étant internalisée, et agit comme un mécanisme physiologique supplémentaire pour empêcher l'activation prolongée de la transduction du signal IRS par l'insuline. En cas d'hyperinsulinémie chronique, l'internalisation des récepteurs de l'insuline contribue à la RI. Cette hyperinsulinémie à long terme entraîne également une régulation à la baisse de l'expression du gène du récepteur de l'insuline par un mécanisme qui n'est pas encore bien défini.

Comme mentionné, l'implication des molécules libérées par le tissu adipeux est reconnue dans la pathogenèse de l'insulinorésistance hépatique présente dans l'obésité, le SM et le DT2. Des études dans un modèle murin ont montré par exemple que la phosphorylation de la sérine 307 de l'IRS1 murin (sérine 312 chez l'homme) par la JNK induit un état de RI [93]. La kinase JNK est activée par l'insuline elle-même ce qui explique l'insulinorésistance dans les conditions d'hyperinsulinisme [90, 92, 93]. Cette kinase est également activée par le TNF- α et les AGL sécrétés par le tissu adipeux dysmétabolique [90, 92, 93]. Les adipocytes du tissu adipeux dysmétabolique résistent à l'action anti-lipolytique de l'insuline avec pour conséquence une augmentation des AGL et une accumulation ectopique des métabolites tels que le diacylglycérol et l'acylCoA dans les muscles et le foie, conduisant à une activation de la kinase PKC et à une phosphorylation des résidus Ser/Thr de l'IRS1, inhibant ainsi le signal insuline, notamment pour le transport du glucose dans le muscle [96]. Les anomalies métaboliques associées aux taux d'adipokines (leptine et adiponectine), aggraveraient cette accumulation ectopique dans les tissus en inhibant l'oxydation intra mitochondriale des AG via une diminution spécifique de la kinase dépendante de l'AMP (AMPK) et des PPAR α dans ces tissus [97, 98]. Dans les conditions de RI, la signalisation de l'insuline par IRS-1, PI3K et Akt est diminuée, ce qui entraîne finalement une diminution de la translocation du transporteur de glucose GLUT4 vers la membrane plasmique et une altération du transport du glucose stimulé par l'insuline dans cellules [80].

La RI est donc une condition qui s'établit lorsque les niveaux d'insuline sont plus élevés que prévu par rapport aux concentrations de glucose circulantes. Ainsi, la RI est par définition liée à l'hyperinsulinémie et la question qui peut être soulevée est celle de savoir s'il faut prévenir/traiter l'hyperinsulinémie ou la RI. L'hyperinsulinémie de son côté est un acteur majeur dans les pathologies métaboliques telles que le DT2, et selon plusieurs études, elle y joue un rôle primordial. Elle a été associée à plusieurs facteurs dont ceux qui sont génétiques, environnementaux et alimentaires [99]. Néanmoins, il est de plus en plus évident que l'hyperactivité des cellules β sécrétrices d'insuline peut en être une cause majeure [100]. Des niveaux circulants très élevés d'insuline sont associés à l'obésité et aux pathologies métaboliques telles que le DT2. À cet effet, il a été montré qu'une augmentation aiguë des concentrations d'insuline stimule et sensibilise la signalisation de l'hormone aboutissant aux actions requises

telles que la régulation de la glycémie postprandiale. Par contre, tel que décrit dans la [Figure 4.](#) – des niveaux élevés et persistants désensibilisent les cellules cibles par de multiples mécanismes impliquant l'insuline elle-même avec des effets au niveau de son récepteur [101] et au-delà du récepteur (effets post-récepteur) [102, 103], mais aussi par des agents hétérologues (*i.e.* cytokines pro-inflammatoires, AGL et leurs métabolites) mentionnés précédemment ([Figure 4.](#) –). Rizza et ses collaborateurs ont suggéré la possibilité d'effets post récepteur (au-delà de la liaison de l'insuline à son récepteur) de la RI dans des conditions d'hyperinsulinémie. Cette suggestion a été faite suite à l'observation d'une diminution du métabolisme global du glucose en présence de concentrations plasmatiques d'insuline suffisantes sous-maximales ou maximales sans que la capacité de liaison entre l'insuline et son récepteur ne soit affectée [104]. Une augmentation persistante et durable des taux d'insuline, quelle qu'en soit l'origine, entraîne donc une résistance généralisée à l'hormone à cause des mécanismes de rétrocontrôle négatif et de désensibilisation au signal. Des études comparant l'administration continue d'insuline à l'administration pulsatile ont quant à elles étayé l'hypothèse selon laquelle une exposition soutenue à l'insuline et une hyperinsulinémie continue peuvent provoquer une RI. Chez les sujets sains, l'administration pulsatile d'insuline a un effet hypoglycémique plus marqué que l'administration continue car contrairement à un apport continu et persistant, l'administration pulsatile minimise les mécanismes de désensibilisation au signal de l'hormone [105-107]. Ce phénomène a également été démontré chez des sujets diabétiques [107-111] ainsi que dans un modèle animal de diabète [112]. Par ailleurs, l'efficacité de nombreuses hormones est plus grande lorsqu'elles sont sécrétées de manière oscillatoire intermittente ou pulsatile. Par exemple, l'hormone lutéinisante, l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires, l'hormone de croissance et l'hormone adrénocorticotrope présentent des schémas de libération pulsatile [113]. L'avantage théorique d'une libération pulsatile est de minimiser la désensibilisation, ce qui par conséquent renforce l'action de l'hormone. Comme pour les autres hormones, la libération d'insuline est intermittente, avec des impulsions rapides de faible amplitude toutes les ~ 8 à 15 minutes [114, 115], ainsi que des impulsions à rythmes ultradiens plus lentes [116, 117]. Les schémas oscillatoires sont considérés comme importants afin de maintenir la glycémie dans des intervalles physiologiques normales. Ainsi, l'hyperinsulinémie, qu'elle soit pionnière ou non, contribue

absolument à la persistance de l'état de RI. L'hyperinsulinémie contribue à la mise en place de la RI dans les tissus cibles par exemple par la stimulation simultanée de multiples cytokines pro-inflammatoires (*i.e.* la PKC- ζ), capable d'interférer avec la signalisation de l'insuline [118-120]. L'hyperinsulinémie participe aussi à l'inflammation et à l'apoptose des cellules en promouvant l'expression des protéines de signalisation p38-MAPK et ERK, ce qui contribue à la progression de l'état prédiabétique vers le diabète [118, 121]. Jusqu'à récemment, la croyance générale était que la RI provoque des mécanismes compensatoires de sécrétion accrue de l'insuline par les cellules β du pancréas, ce qui provoque leur hypertrophie et conduit à une hyperinsulinémie. Cependant, de nouvelles évidences scientifiques offrent une nouvelle perspective selon laquelle un défaut de sécrétion d'insuline par les cellules β provoque initialement une hypersécrétion inappropriée d'insuline, même à des concentrations basales de glucose plasmatique, conduisant éventuellement à une RI. Cette nouvelle dynamique suggère la présence d'hypertrophie et le dysfonctionnement des cellules β du pancréas avant même l'apparition de la RI [122], qui découle finalement d'une exposition persistante à des concentrations élevées d'insuline (Figure 7. –). La sécrétion d'insuline présente un profil en deux étapes : d'abord, la sécrétion de l'insuline est stimulée de façon immédiate par le glucose [123]. Cependant, cette sécrétion de première phase est réduite ou diminuée au début de la mise en place du diabète ou de l'obésité diabétique. La sécrétion d'insuline pouvant s'étaler sur plusieurs heures, la deuxième phase représente la majeure partie de l'insuline libérée, ce qui déclenche la série de mécanismes compensatoires dans les cellules β des îlots pancréatiques. Dans des conditions non diabétiques, la première phase représente environ 15 % de la sécrétion totale d'insuline suite à une stimulation au glucose d'une heure, la seconde étape représentant le reste [124]. Le dysfonctionnement des cellules β se traduit par une sécrétion excessive d'insuline au cours de la deuxième phase de la sécrétion d'insuline [118]. Outre le dysfonctionnement des cellules β , la réduction du mécanisme de clairance de l'insuline par le foie due à l'âge, au stress ou une hypersécrétion de l'insuline contribue à l'hyperinsulinémie et la RI [118]. Par ailleurs, comme indiqué précédemment dans la Figure 4. – et à l'image d'autres voies sensibles aux hormones, la voie intracellulaire de l'action de l'insuline est continuellement régulée par une multiplicité de mécanismes. Ceci étant, il faut noter que l'insuline sécrétée peut elle-même avoir des effets sur la sensibilité de sa propre voie

de signalisation. L'hormone peut donc par conséquent exercer des actions d'atténuation par le biais d'une exposition continue des cellules cibles à des niveaux stimulants et supra-stimulants (désensibilisation homologue) [113]. Le récepteur de l'insuline lui-même est un médiateur bien étudié de la rétroaction négative qui implique une réduction de l'affinité du récepteur, une réduction du nombre de récepteurs exposés à la surface de la cellule cible et une diminution de l'efficacité du récepteur en tant que transmetteur de signaux stimulants. Chaque récepteur d'insuline possède deux sites de liaison pour l'insuline. Une molécule d'insuline se lie avec une grande affinité, tandis que la liaison d'une seconde molécule d'insuline se fait avec une affinité plus faible [125, 126]. Par conséquent, à des concentrations croissantes d'insuline, l'occupation des sites récepteurs augmente, mais l'affinité moyenne diminue. On fait alors référence à une "coopérativité négative" [125-127]. Un autre mécanisme de régulation de l'affinité du récepteur induit par l'insuline implique la régulation de la proportion relative des deux isoformes moléculaires, IR-A et IR-B, du récepteur de l'insuline [128]. L'exposition persistante à l'insuline entraîne une réduction de la proportion des isoformes courtes exhibant une affinité plus élevée offrant un avantage aux isoformes longues avec une affinité plus faible. L'exposition continue à l'insuline entraîne aussi une réduction du nombre de récepteurs exposés à la surface des cellules permise par l'internalisation et la dégradation des récepteurs occupés par l'hormone [101]. Le récepteur de l'insuline, comme défini précédemment, est une tyrosine kinase qui s'active elle-même et transmet ensuite son message stimulant en favorisant la phosphorylation de tyrosines sélectionnées sur le récepteur et sur des molécules partenaires post réceptrices et effectrices telles que les membres de la famille des substrats du récepteur de l'insuline IRS-1 et IRS-2 (Figure 3. –). Lors d'une exposition permanente à l'insuline, l'activité kinase du récepteur diminue, probablement en raison des effets combinés de la phosphorylation des résidus sérine sur le récepteur, de la déphosphorylation des tyrosines par l'action des phosphatases et des kinases inhibitrices [129-133]. Plusieurs autres molécules en aval de la voie de l'insuline (par exemple Akt/PKB, m-TOR) transmettent le signal d'activation en aval mais fournissent également des signaux de rétroaction négatifs en amont (Figure 3. – Figure 4. –). En outre, l'exposition chronique de la cellule à l'insuline peut entraîner une diminution de la concentration des éléments en aval, y compris des composants clés tels que les protéines IRS [132, 133]. La voie de signalisation

stimulée par l'insuline, comme indiqué au début de cette section, est régulée par des agents hétérologues et il est intéressant de se rappeler que certains de ces agents (*i.e.* TNF- α et AGL) sont eux-mêmes sous l'influence de l'insuline [134, 135].

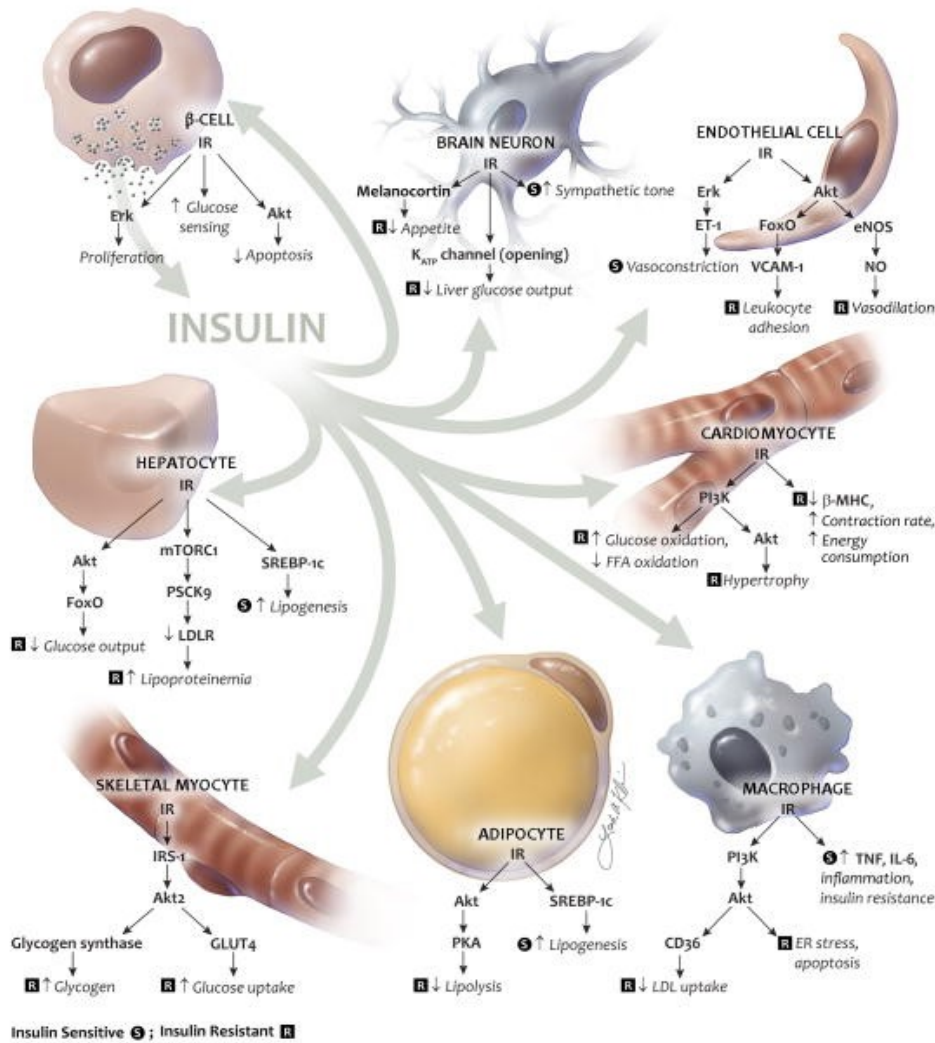


Figure 5. – Le rôle central de l'insuline dans le maintien de l'homéostasie métabolique de plusieurs tissus (élaborée par Rask-Madsen e al, 2012)[80]

Le rôle central de l'insuline dans la régulation du métabolisme est illustré dans cette figure. L'insuline, sécrétée par les cellules β du pancréas, intervient dans le maintien de l'homéostasie métabolique. Cette hormone régule les fonctions et la prolifération et encore la taille des cellules du pancréas, Dans les hépatocytes, l'insuline régule le métabolisme des lipides et du glucose. Une résistance des hépatocytes à l'action de cette hormone contribue aussi bien à l'hyperglycémie mais aussi à l'installation des

dyslipidémies. Les cellules du muscle captent généralement le glucose de façon indépendante de l'insuline quoiqu'une résistance à cette hormone peut les affecter. Dans le tissu adipeux, l'insuline est impliquée dans la régulation de la mise en réserve des lipides. Compte tenu de ses différentes fonctions, une résistance à l'action de l'insuline contribue à l'inflammation avec l'infiltration des macrophages et autres cellules immunitaires dans les tissus mais aussi la mise en place de processus athérogènes, des MCV et des complications microvasculaires. Une permission a été accordée par l'éditeur **Wolters Kluwer Health, Inc.** pour l'utilisation de cette figure.

La **Figure 1.** – et la **Figure 5.** – font un récapitulatif du rôle central de l'insuline dans les tissus métaboliques majeurs nous permettant de comprendre les conséquences métaboliques que peuvent induire une résistance à cette hormone.

Action de l'insuline et effets délétères de la RI au niveau du pancréas : L'insuline est produite par les cellules β du pancréas exprimant obligatoirement les gènes nommés *INS* dont la transcription est régulée par plusieurs facteurs spécifiques [136, 137]. Ces facteurs de transcription sont requis afin de contrôler l'expression et la sécrétion de l'insuline en réponse à la signalisation du glucose et de l'insuline autocrine [136]. Une fois produite, l'insuline est mise en réserve dans des granules dans les cellules β et va être sécrétée en réponse au signal du glucose afin de réguler la glycémie et favoriser l'absorption, l'utilisation et le stockage du glucose dans les tissus périphériques[136]. Outre le signal du glucose, plusieurs autres signaux peuvent amplifier la libération de l'insuline. On peut citer entre autres les signaux induits par les hormones produites par l'intestin, les signaux paracrines des cellules α et δ et les signaux autocrines de l'insuline déjà secrété [136]. Par conséquent, les cellules β pancréatiques jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie métabolique et la progression de la RI vers un état de prédiabète dépend indéniablement de leur habileté à maintenir des niveaux d'insuline suffisamment élevés pour contrecarrer la RI et limiter l'hyperglycémie [80, 138]. La résistance des cellules du pancréas à l'action de l'insuline contribue aussi à la mise en place des dérangements métaboliques et du SM [80]. Selon plusieurs études, les cellules β pancréatiques compensent initialement la RI associée à l'obésité en régulant positivement la sécrétion d'insuline. Cette période de compensation, dans des états de prédiabète, entraîne à long terme une hypertrophie des cellules β [80]. En effet, la sécrétion d'insuline et la taille des cellules β sont promues en

réponse à l'hyperglycémie périodique due à la détection du glucose par les cellules β , d'où l'augmentation de la sécrétion d'insuline et de la taille des cellules β [80] (Figure 1. – Figure 5. –). En tenant compte de ces informations, les mécanismes compensatoires de production d'insuline par les cellules β (aboutissant à leur hypertrophie) semblent être conséquentes à la RI. Cependant, il a été démontré que l'insuline peut exercer un contrôle soit positif stimulateur, soit négatif inhibiteur sur la sensibilité des cellules exprimant son récepteur selon les concentrations auxquelles ces dernières sont exposées [139, 140]. De plus en plus d'études récentes tentent de déterminer si le rôle des cellules β des îlots de Langerhans dans l'accentuation des dérèglements métaboliques se situe en amont ou en aval de la RI [141]. Les résultats de ces nouvelles investigations suggèrent que la prolifération excessive et l'activité sécrétrice accrue des cellules β des îlots de Langerhans en réponse aux conditions de stress métabolique (dues par exemple à un mode de vie sédentaire et des habitudes alimentaires non diversifiées et riches en sucres et en gras) entraînent une hyperinsulinémie, en amont de l'obésité et de la RI [140, 141]. L'abondance alimentaire et une suralimentation conduisent à une exposition chronique des îlots de Langerhans à des niveaux élevés de nutriments multiples, notamment de glucose, d'acides gras et d'acides aminés entraînant des dommages métaboliques (glucolipototoxicité des cellules β) et à une perte de fonction des cellules [142]. En effet, il a été montré qu'une exposition excessive des cellules INS-1 832/13 à des niveaux élevés de lipides induit l'oxydation des acides gras [143, 144] et provoque une altération de la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose et une augmentation parallèle du métabolisme anaplérotique du pyruvate à des niveaux de glucose basaux, produisant l'élimination de l'augmentation normale du cycle du pyruvate en réponse au glucose [144, 145]. De ce fait, la surcharge en divers nutriments des cellules des îlots conduit à une série de modifications des processus métaboliques ce qui pourrait déjà altérer leur fonction. Une étude a montré que les effets de la RI des cellules β sont dépendants de certains facteurs, incluant les habitudes alimentaires, le sexe et l'âge [139]. Les conséquences d'une RI des cellules β peuvent contribuer à la sécrétion chronique de l'insuline et à l'hyperinsulinémie stimulées par des taux élevés de glucose et dépendamment des facteurs cités précédemment dont l'âge et le sexe. La traduction quelque peu erronée des effets de la RI spécifique des cellules β (*i.e.* mécanismes compensatoires, hyperinsulinémie et hyperglycémie) est due au fait que cette RI

spécifique est masquée par la RI généralisée [139]. Il a été démontré que la sécrétion d'insuline par les cellules β est étroitement liée aux canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}), qui couplent le métabolisme à l'activité électrique et qui constituent le lien principal entre les taux de glucose circulants et la sécrétion de l'insuline [146]. L'augmentation des taux sanguins de glucose provoque son entrée dans les cellules β pancréatiques. Sa dégradation via le cycle glycolytique augmente la concentration en ATP intracellulaire ce qui cause la fermeture des canaux K_{ATP} suivie de l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants favorisant l'exocytose des granules contenant l'insuline. Des recherches ont rapporté qu'en présence de concentrations élevées de glucose, les cellules β recrutaient plus de canaux K_{ATP} à leur membrane (**Figure 7. –** [146]).

Comme décrit dans les définitions précédentes, la sécrétion de l'insuline se fait en deux phases et les mécanismes compensatoires se déroulent durant la seconde phase puisque la première est réduite dans les conditions de suralimentation et stress de métabolique [124]. L'augmentation excessive, en seconde phase, de la sécrétion d'insuline en présence de taux élevés de glucose pourrait donc être due à une réduction de la densité des canaux K_{ATP} dans les cellules β hypertrophiques et hyperplasiques qui ne répondent plus au rétrocontrôle négatif de l'insuline (RI spécifique des cellules β) (**Figure 7. –**) [147]. Ainsi, bien qu'exogène aux cellules β , le stress métabolique à caractère inflammatoire et oxydatif entraîne une stimulation chronique de ces cellules provoquant des changements altérant leur fonction [118] (**Figure 7. –**).

Rôle de l'insuline et RI au niveau hépatique: Le tissu hépatique est l'un des premiers tissus à être en contact avec l'insuline [136]. Le foie est exposé de manière unique à des concentrations plus élevées d'insuline que d'autres tissus insulino-sensibles tels que les muscles et le tissu adipeux [136]. Le foie reçoit de l'insuline provenant du pancréas via la veine porte en impulsions discrètes qui se produisent toutes les ~ 5 minutes avec des concentrations de 0,5–1 nmol/litre à jeun jusqu'à ~ 5 nmol/litre après un repas [148, 149]. Cette "administration" pulsatile d'insuline au foie est un signal physiologique important qui régule à la fois l'action hépatique de l'insuline [150] et sa clairance (mécanisme de dégradation hépatique de l'insuline afin d'atteindre les concentrations requises par les autres tissus périphériques) [151, 152]. Ce mécanisme de clairance de l'insuline au niveau hépatique est réduit en cas de RI afin de compenser la baisse de la sensibilité à l'hormone [153, 154]. La baisse de la clairance de l'insuline a été suggérée comme

actrice dans la mise en place de l'hyperinsulinémie et la RI. Selon l'étude de Kurauti et ses collaborateurs, l'activité de l'enzyme de dégradation de l'insuline (permettant la clairance de l'insuline) est réduite dans le foie de souris âgées et l'augmentation compensatoire de l'expression de cette enzyme par l'hyperinsulinémie peut être diminuée ou perdue à un âge avancé ; la clairance de l'insuline peut donc être réduite avec une hyperinsulinémie et une RI encore plus exacerbées [155]. Hamley a rapporté que chez certains adultes non obèses, l'hyperinsulinémie entraînait une nouvelle augmentation de la sécrétion d'insuline et une diminution de la clairance de l'insuline circulante [156]. Le foie joue ainsi le rôle de gardien régulant les quantités d'insuline atteignant les autres tissus insulino-sensibles [151, 152]. Dans les conditions d'homéostasie physiologique, l'action de l'insuline sur les hépatocytes diminue la gluconéogenèse et la glycogénolyse et augmente la glycogénogenèse (mise en réserve du glucose), ce qui entraîne une diminution de la production et de la libération du glucose par le foie [80]. L'une des conséquences majeures de la RI des hépatocytes est l'hyperglycémie à jeun [80, 157]. En général, au niveau moléculaire, la RI dans le foie se traduit par une expression accrue des enzymes gluconogéniques PEPCCK et glucose 6-phosphatase (G-6-Pase) et une diminution de l'expression des enzymes qui régulent la glycogénogenèse et la glycolyse, dont la glucokinase et la pyruvate kinase [80, 158] (**Figure 1. – Figure 5. –**). L'action de l'insuline au niveau hépatique peut aussi influencer les niveaux de lipides circulants [80]. En effet, l'insuline stimule la synthèse des AG et des TG via l'activation du facteur de transcription SREBP-1c, qui régule à la hausse la transcription des enzymes lipogéniques, y compris l'acétyl-coenzyme A carboxylase (ACC) et la synthèse des AG (FAS)[159]. Dans ce contexte, l'hyperinsulinémie, associée aux dérangements métaboliques, est liée à une exagération des taux circulants d'AGL et de TG [80]. La résistance hépatique à l'insuline contribue également à l'hyperlipidémie par une régulation à la baisse du récepteur de la lipoprotéine LDL (LDLr) [160], au moins en partie par une capacité altérée de l'insuline à diminuer la transcription de la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9) qui favorise la régulation négative post-traductionnelle du LDLr. Par conséquent, la RI du foie entraîne une diminution de la clairance des LDL et des lipoprotéines de très basse densité (VLDL). Enfin, il a été étudié que l'absence de récepteurs de l'insuline dans les hépatocytes

augmente la sécrétion d'apolipoprotéine B, la principale apolipoprotéine des LDL et des VLDL [160] (Figure 1. – Figure 5. –).

Fonctions de l'insuline dans le tissu adipeux et RI : Les adipocytes sont les cellules les plus insulino-dépendantes chez les personnes obèses témoignant du rôle important de l'insuline au niveau de ces cellules [80]. L'insuline permet l'absorption des AG des lipoprotéines circulantes en stimulant l'activité de la lipoprotéine lipase dans le tissu adipeux. L'insuline induit également le stockage des TG par le biais de plusieurs mécanismes tels que la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures, la stimulation de la lipogénèse via le majeur facteur SREBP-1c (qui régule l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des AG et lipogénèse dans les adipocytes et le foie) et la suppression de la synthèse des TG et de la lipolyse [80, 81]. Ainsi, dans les conditions de RI, les adipocytes deviennent résistants à l'action anti-lipolytique de l'insuline, ce qui favorise une altération de la capacité des adipocytes à stocker les TG, et de former par la suite des dépôts ectopiques de lipides dans d'autres tissus périphériques (Figure 1. – Figure 5. –) [80, 81].

RI au niveau du muscle squelettique : Le muscle squelettique est le tissu qui absorbe et utilise le plus le glucose [80, 157]. Ainsi une résistance des cellules musculaires à l'action de l'insuline, à cause du dépôt excessif d'AG et de TG provenant du tissu adipeux atrophié et de l'inflammation peut fortement perturber l'homéostasie du glucose dans l'organisme et la sensibilité des autres tissus métaboliques majeurs à l'insuline [161] (Figure 1. – Figure 5. –). Des études ont montré que les souris ayant subi un knock-out du récepteur de l'insuline du muscle ont une résistance profonde à l'action de l'insuline dans le muscle. Cependant, la tolérance au glucose reste normale puisque l'absorption du glucose se fait de façon indépendante de l'insuline dans le muscle, mais il a été aussi observé une absorption accrue du glucose dans les tissus adipeux et une masse adipeuse importante chez ces souris modifiées génétiquement [162].

RI au niveau d'autres tissus tels que l'hypothalamus, le myocarde et l'endothélium vasculaire :

L'insuline intervient dans la régulation de plusieurs processus au niveau de ces tissus[80].

Le système nerveux central (SNC) est par exemple impliqué dans l'homéostasie du glucose. Même si la captation du glucose n'y est pas insulino-dépendante, l'insuline joue un rôle très important

dans plusieurs des fonctions du SNC telles que la régulation de la prise alimentaire, le métabolisme et la cognition [163]. L'action centrale de l'insuline via le nerf vagal contrôle la production hépatique du glucose [80, 164] et supprime l'appétit en activant les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus [165]. L'implication de l'insuline dans la réalisation de ces effets se reflète par une expression importante du récepteur de l'insuline dans les structures cérébrales (*i.e.* les lobes olfactifs, l'hypothalamus, le cortex, l'hippocampe et le cervelet). Par ailleurs, la cascade de signalisation permettant la transduction du signal induit par la liaison de l'insuline à son récepteur présent au niveau des cellules neuronales est similaire à celle des cellules périphériques (phosphorylations IRS/PI3K/AKT et une activation de voies de transduction incluant mTORC1, GSK3 β , FOXO) [166]. Ainsi, l'insulinorésistance cérébrale contribue à l'altération de la régulation de l'appétit, à la dérégulation de l'homéostasie du glucose et à l'hyperglycémie à jeun [80].

Le muscle cardiaque utilise le glucose, les AG et le lactate comme produits pour générer l'ATP [94]. L'insuline, compte tenu de son rôle, fait donc partie des hormones majeures qui contrôlent le métabolisme cardiaque. Les changements dans la sensibilité des cardiomyocytes à l'insuline perturbent le métabolisme normal du substrat par le cœur et diminuent potentiellement la fonction mécanique et la tolérance myocardique à l'ischémie / reperfusion [94]. En effet, en cas de RI, les cardiomyocytes n'arrivent pas à s'adapter à la disponibilité de substrats spécifiques [80]. Bien que l'insuline augmente l'absorption des AG à longue chaîne dans les cardiomyocytes en augmentant l'enzyme FAT / CD36 (*sarcolemmal fatty acid translocase/cluster of differentiation 36*) [94, 167], des niveaux élevés d'insuline suppriment également les taux d'oxydation des AG tissulaires. Dans des modèles animaux d'obésité, la RI myocardique se reflète par une signalisation intracellulaire de l'insuline compromise et une réduction des taux d'oxydation du glucose avec une baisse de la fonction mécanique myocardique et la tolérance à l'ischémie et à la reperfusion [94].

De son côté, la résistance des cellules endothéliales à l'insuline contribue à restreindre son transport et sa délivrance aux tissus cibles [80]. L'action de l'insuline dans le maintien de l'homéostasie métabolique dépend aussi de son transport transendothélial qui permet sa livraison aux tissus cibles [80]. L'insuline augmente également le recrutement capillaire facilitant

ainsi son transport transendothélial vers les tissus cibles et stimule par conséquent l'absorption du glucose [80]. Dans ce contexte, mentionnons que la RI participe à la pathogenèse de l'hypertension, des MCV et des complications microvasculaires. La résistance de l'endothélium vasculaire à l'insuline promeut l'inflammation et contribue à l'implantation de l'athérosclérose [168]. Des études ont montré une augmentation importante du recrutement et de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium de souris présentant un knockout des récepteurs de l'insuline [168]. Ces souris présentent également une expression élevée des protéines d'adhésion VCAM-1 par des mécanismes induits par le signal de l'insuline et non dépendants de l'action de NO [168]. Comme dans d'autres tissus cités précédemment, le système endothélial développe la RI par des mécanismes similaires notamment, la diminution des IRS-1, la présence et l'action de cytokines pro-inflammatoires ou encore l'activation de récepteurs toll-like 4 par des AGL) [80].

L'insulinorésistance serait-elle une alliée à considérer dans certaines conditions métaboliques?

Quoique perçue comme délétère et le précurseur de plusieurs pathologies cardiométaboliques, la RI est toutefois bien conservée au cours de l'évolution, suggérant des aspects bénéfiques pour la survie [169]. La RI, avantageuse d'un point de vue évolutif, constitue en fait une réponse adaptative de certains tissus à des conditions de stress [169].

Les bienfaits de la RI peuvent se manifester dans certaines conditions métaboliques : (i) *Préservation de l'énergie en période de jeûne ou de famine* : Elle permet à l'organisme dans de telles circonstances de maintenir la stabilité de la glycémie, en réprimant les cellules de plusieurs tissus à capter le glucose disponible suite à leur insulino-résistance, le réservant uniquement au cerveau ou aux autres organes essentiels afin de ménager leur fonctionnement [169]. L'absorption et l'oxydation du glucose sont prévenues par le biais de mécanismes tels que la diminution de la phosphorylation des intermédiaires de signalisation de l'insuline (AKT et son substrat de 160 kDa, AS160) [170, 171]. Néanmoins, les niveaux de glycolyse et de gluconéogenèse (cycle de Cori) sont augmentés et servent d'autres objectifs que la formation de glucose et la production d'énergie [169]. Ainsi, la diminution de la formation et de l'oxydation du glucose dans ces circonstances affecte profondément le métabolisme intermédiaire puisque la production d'énergie nécessaire aux processus métaboliques est en grande partie assurée par

l'oxydation des graisses et des corps cétoniques [169]; (ii) *Adaptation à un apport faible en glucose durant une longue période*: une RI partielle s'installe dans ce cas pour canaliser le glucose vers les organes essentiels (ex. le cerveau) tout en forçant les tissus à oxyder les acides gras comme source d'énergie; (iii) *Défense contre l'hypoglycémie* : la présence d'une RI dans des contextes de troubles hormonaux ou génétiques est d'un grand intérêt pour éviter les chutes de la glycémie [113]; (iv) *Longévité au cours du vieillissement* : La RI pourrait favoriser la prolongation de l'espérance de vie, mais des travaux sont nécessaires pour en obtenir l'évidence [172-177]; et (v) *Accommodation au froid* : La RI prendrait place dans les tissus adipeux, en cas de froid intense, pour limiter le déficit extrême de chaleur [178, 179]. En somme, le développement de la RI dans cette toile de fond de stress était d'un grand secours à nos aïeux pour confronter les menaces environnementales, ou même se mesurer à des désordres immunitaires [177, 180, 181]. Cependant, la RI est bien complexe et les réponses semblent différer d'un tissu à un autre, impliquant plusieurs mécanismes et voies de signalisation intracellulaires [141, 182]. Les organes métaboliques restreignent l'oxydation totale du glucose par le cycle de l'acide tricarboxylique et leurs besoins énergétiques sont largement satisfaits par l'oxydation des AG et des corps cétoniques [169].

En revanche, en présence d'abondance nutritionnelle entraînant une suralimentation et par conséquent une surcharge en nutriments au niveau des tissus [141], ces derniers sont forcés à se protéger en résistant à l'action de l'insuline, réduisant ainsi l'entrée excessive de glucose [183, 184]. Également, dans les conditions d'une suralimentation et d'un apport accru de nutriments surtout avec une diète occidentale riche en gras, certains tissus se protègent de la surcharge de nutriments en résistant à l'action de l'insuline [183-185]. En effet, l'incapacité à limiter l'entrée excessive de glucose alors que les taux des AGL sont élevés entraînera des lésions cellulaires et tissulaires par les mécanismes de la glucolipotoxicité [141, 186]. En empêchant l'absorption accrue du glucose, la RI protège les tissus insulino-sensibles contre les produits de glycation avancée et autres métabolites nocifs pouvant provenir de l'activation des voies de polyols, hexosamines et glycogénogenèse [187, 188]. Aussi, les taux élevés de glucose participent à plutôt induire les processus d'estérification des AGL au lieu de leur oxydation ce qui va causer la stéatose intracellulaire et l'accumulation de métabolites tels que le diacylglycérol, le cholestérol et les

céramides dans les tissus [189, 190] (**Figure 6. –** . Ainsi, la résistance de ces tissus à l'insuline prévient l'infiltration lipidique et la lipotoxicité subséquente. Dans ces cas de figure, la RI apparaît aisément comme une réponse de défense de l'organisme face à l'hyperinsulinémie, aux dérèglements métaboliques, à la surcharge en nutriments et aux stimuli nocifs [141, 191]. L'étude en profondeur de ces rôles bénéfique et protecteur de la RI afin d'en saisir la compréhension et les mécanismes sous-jacents pourrait définitivement influencer l'approche scientifique utilisée aussi bien dans la définition de la pathogenèse du SM que dans la recherche et le développement de thérapies des pathologies métaboliques. Les mécanismes d'adaptation à la RI et les fonctions s'y rapportant doivent être pleinement compris avant d'interférer en tentant de promouvoir la sensibilité à l'insuline à tout prix. Par conséquent, la prise en charge des patients obèses et avec DT2 visant à normaliser la glycémie doit faire intervenir des stratégies de décharge des cellules en nutriments. C'est l'exemple des changements des habitudes alimentaires et du mode de vie, de l'utilisation des inhibiteurs du transporteur de glucose SGLT2 et des agonistes du GLP-1, de la chirurgie bariatrique et de la prévention de la sécrétion accrue de l'insuline. En effet, bien qu'un traitement intensif à l'insuline réduise l'hyperglycémie, la mortalité et la morbidité chez certains patients, les mécanismes qui sous-tendent la physiopathologie de la RI aiguë protectrice et adaptatrice demeurent encore moins connus [141, 182] (**Figure 6. –** . Néanmoins, les mécanismes pour surmonter la RI (i.e. insulinothérapie ou utilisation des sulfonyles) et favoriser la sensibilité à l'insuline ne devraient pas pour autant être mis de côté. Il s'agirait donc de déterminer au cas par cas la prise en charge thérapeutique à offrir au patient.

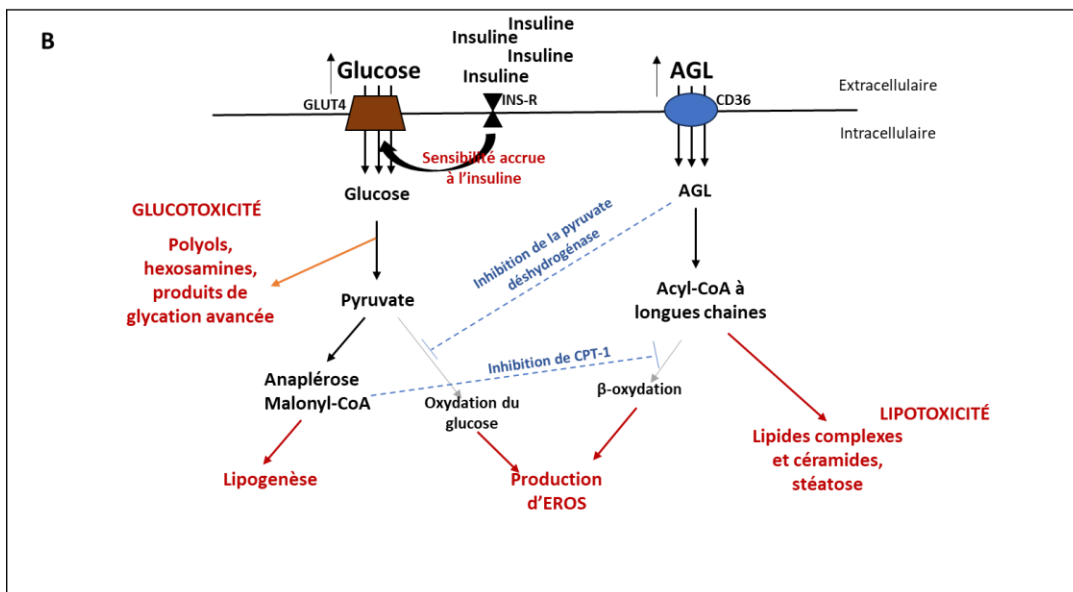
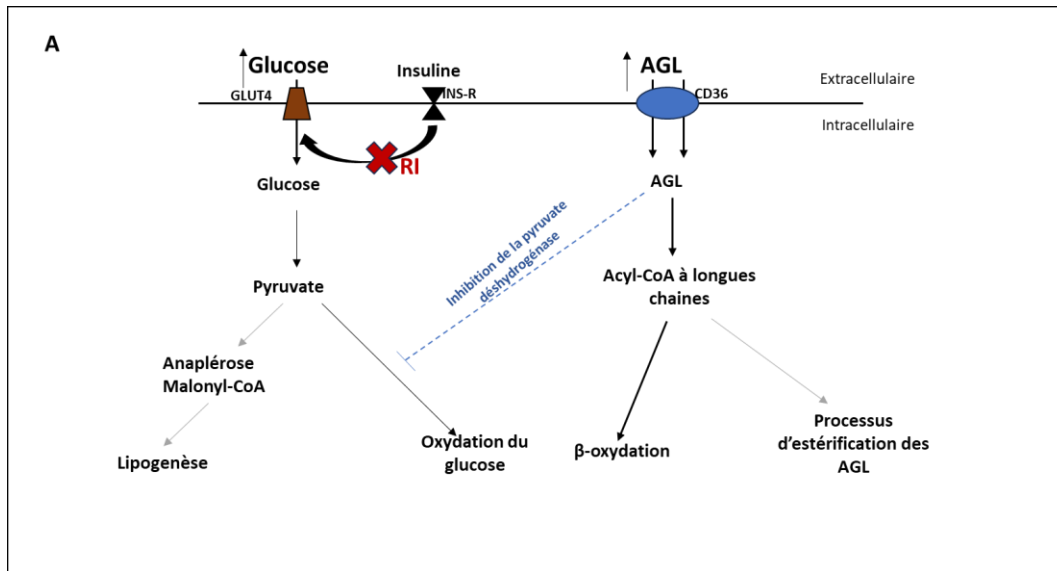


Figure 6. – Figure montrant les mécanismes par lesquels la résistance à l'insuline (A) et la sensibilité accrue et induite à l'insuline (B) peuvent réduire (A) ou contribuer à aggraver (B) le stress métabolique en cas de pathologies métaboliques (adaptée de Nolan et al., 2019) [141]

La figure représente une cellule dans laquelle (A) la RI prévient des effets néfastes pouvant provenir de la surcharge en nutriments et du stress métabolique en limitant le flux de glucose entrant dans la cellule. Dans des circonstances où la RI est annulée par des taux d'insuline exogène élevés (B), il y a une absorption excessive de glucose et d'AGL ce qui conduit à la glucotoxicité et à la lipotoxicité. La disponibilité de concentrations importantes d'AGL inhibe l'oxydation du glucose au niveau de la pyruvate déshydrogénase. Ainsi, le glucose, absorbé de façon excessive à cause de l'insuline, sera contraint d'emprunter les voies

glucotoxiques situées en amont de l'étape de la pyruvate déshydrogénase. Il s'agit notamment des voies des polyols et des hexosamines, ainsi que celles favorisant la production de toxines de la glycation avancée. Aussi, une disponibilité accrue de glucose favorise l'accumulation de malonyl-CoA cytosolique qui inhibe la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1) et le transfert des acyl-CoA à longue chaîne dans les mitochondries pour la β -oxydation. Il en résultera une poussée du métabolisme intracellulaire des AGL vers la synthèse de lipides complexes, tels que les diacylglycérols, les esters de cholestérol et les céramides, et une stéatose provoquant une lipotoxicité. L'apport accru de glucose aux mitochondries en présence d'un apport élevé d'AGL favorise également la production d'espèces réactives de l'oxygène et les dommages oxydatifs.

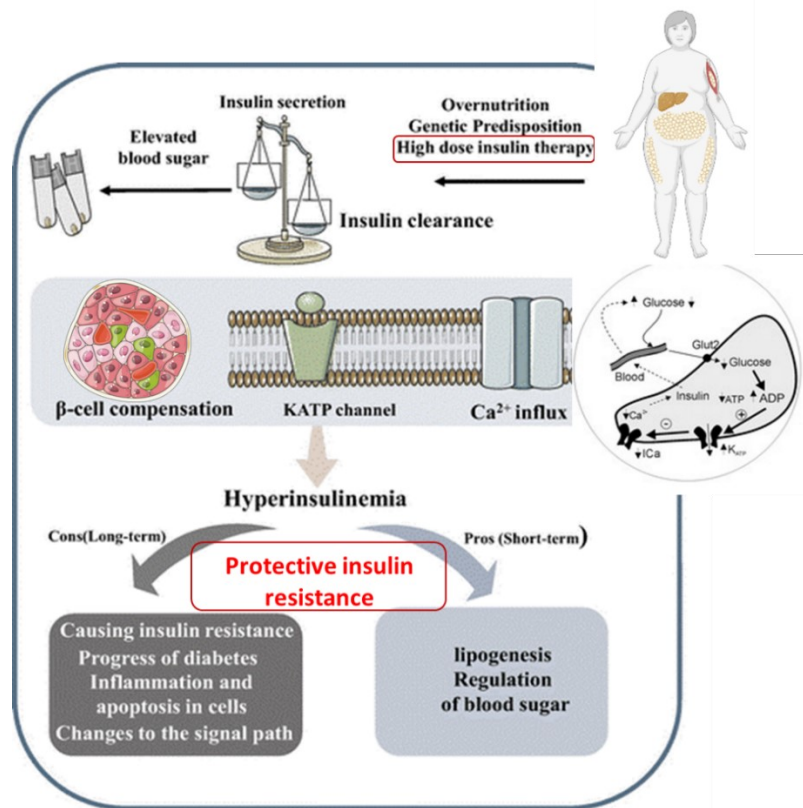


Figure 7. – Schéma récapitulatif montrant l'hypersecretion de l'insuline contribuant à l'hyperinsulinémie avec des dérèglements métaboliques et une résistance à l'insuline de préservation au stade initial du SM (adaptée de Xing et al, 2022) [118]

À court terme, des concentrations élevées d'insuline favorisent la lipogenèse, ce qui peut être bénéfique pour le contrôle de la glycémie. Cependant, l'hyperinsulinémie modifie à long terme le schéma normal de sécrétion d'insuline, entraînant une réduction de la clairance de l'insuline et une sécrétion compensatoire, lente mais accrue par les cellules β . Aussi, l'hyperinsulinémie va ultimement diminuer le taux de prolifération spécifique des tubes cellulaires, augmenter l'apoptose des cellules par l'inhibition de

l'expression de l'eNOS, du PI3k et de l'Akt et l'augmentation de l'expression de la p38 MAPK et de l'ERK, pour ainsi modifier le métabolisme cellulaire. De plus, les tissus résistent à l'action de l'insuline afin de limiter les effets néfastes et toxiques d'une surcharge en nutriments et du stress métabolique.

L'inflammation chronique et un état pro-oxydatif persistant se retrouvent toutefois dans chacune des étapes clés de la mise en place du syndrome de la RI (Figure 8. –)

Stress oxydatif et inflammation chronique

Comme mentionné dans les définitions précédentes, la pathogenèse du SM fait intervenir une multitude de facteurs complexes. Un certain nombre d'études relèvent cependant que le SOx ainsi que l'état inflammatoire chronique sont deux mécanismes clés qui contribuent au développement des pathologies métaboliques et qui représentent à la fois des causes et des conséquences du SM [19, 50].

Stress oxydatif systémique dans la pathophysiologie du SM : Il a été montré qu'un apport calorique excédentaire et une diète riche en gras et en glucides à long terme provoque la mise en place du SOx via la stimulation de plusieurs processus intracellulaires tels que la glycooxydation, la phosphorylation oxydative mitochondriale, la voie de signalisation des polyols et encore d'autres [19, 192-195]. En stimulant ces divers processus, le régime alimentaire occidental riche en gras et en glucides favorise à long terme une augmentation des produits de peroxydation lipidique et des dérivés de carbonylation des protéines et une régulation à la baisse de la réponse antioxydante. Ces diverses conditions prédisposent au développement de plusieurs maladies chroniques. D'ailleurs, il est connu que le SOx est impliqué dans des processus pathoétiologiques de l'obésité, la RI, le DT2, la stéatose hépatique non-alcoolique et les processus athérogènes [19, 192, 196-203]. L'adiposité excessive a été corrélée au SOx systémique à la fois chez l'humain et dans un modèle murin [204, 205]. Aussi, des taux élevés de LDL oxydées ont été associés à la présence du SOx et des taux faibles de HDL contribuant aux dyslipidémies chez des patients avec un SM [206].

Dans les conditions normales d'homéostasie métabolique, des radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène (EROS), produits en petites concentrations en continu, au cours des réactions métaboliques et physiologiques, jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire

[207-210]. Cependant, lorsque la machinerie de défense antioxydante devient défaillante face à une surcharge de production des radicaux libres et des EROs, le SOx s'installe [19, 211]. Dans ce cas, les EROs générées en quantité excessive peuvent attaquer les protéines cellulaires, les lipides et les acides nucléiques, affectant ainsi les fonctions cellulaires et conduisant entre autres à un état inflammatoire, une perte de l'homéostasie métabolique et une altération de la signalisation cellulaire, des mutations génétiques, des dérangements des mécanismes de transport cellulaire et une diminution généralisée de l'activité biologique et de l'activation immunitaire [19, 211]. Des niveaux élevés de biomarqueurs de dommages oxydatifs tels que le MDA, les protéines carbonyles, le 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE), les hydroperoxydes, les produits d'oxydation des protéines, la 3-nitrotyrosine, les produits finaux de glycation avancée (AGE), les métabolites glucidiques et 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OH-dG) ont été remarqués dans les adipocytes et cellules musculaires squelettiques dysmétaboliques [204, 205, 207, 208, 212]. L'accumulation de ces biomarqueurs prooxydants dans les tissus, suite à la défaillance des défenses antioxydantes, concourt à une perte de la sensibilité à l'insuline et à une mise en place de la RI dans les tissus périphériques participant ainsi au SM. Le SOx prend part au développement de la RI en activant plusieurs voies kinases sérine-thréonine, telles que IKK β /NF- κ B et JNK, qui, à leur tour, phosphorylent des protéines IRS conduisant à la dégradation de la transduction du signal de l'insuline [207]. Le SOx contribue également à la RI via la suppression du transporteur GLUT-4 situé dans les membranes cellulaires ou la diminution de son expression, une diminution de la relocalisation du substrat 1 du récepteur de l'insuline IRS-1 et de la PIP (phosphatidylinositol)-kinase entre le cytoplasme et les microsomes, une diminution de la phosphorylation de la protéine kinase B (PKB) et la phosphorylation de la sérine en position 307 de l'IRS-1 [207, 208, 213].

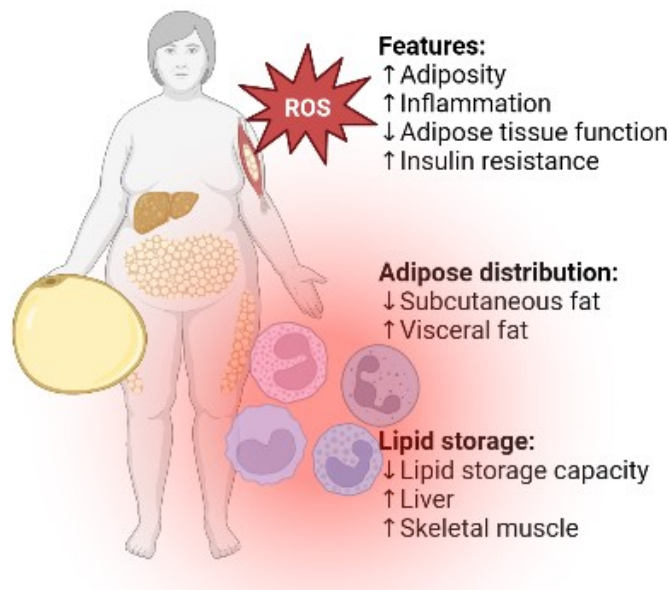


Figure 8. – Implication du stress oxydatif et des espèces réactives de l’oxygène et de l’inflammation dans la mise place de dommages métaboliques; EROS: espèces réactives de l’oxygène (ROS : reactive oxigen species). (Image créée avec BioRender.com) [214].

Tel que décrit précédemment, une altération du phénotype adipocytaire associée au SO_x, et à l’inflammation chronique et systémique constituent des bases indéniables de l’installation des TCM et du SM.

Des évidences scientifiques suggèrent l’existence d’une relation entre les dommages oxydatifs et l’inflammation leur permettant de s’activer mutuellement [19, 215]. Par exemple, les EROS peuvent stimuler plusieurs voies inflammatoires par l’activation des protéines kinase et la phosphorylation des composantes du facteur NF-κB [19, 215, 216]. D’autre part, l’activation du NF-κB empêche la transcription du facteur NRF2 dont la voie de signalisation (NRF2-Keap1) gouverne l’expression de plusieurs défenses antioxydantes [217, 218]. Par ailleurs, il a été démontré que la surexpression de l’unité p65 du facteur de transcription NF-κB régule à la baisse la transcription du facteur NRF2 [219]. En effet, l’expression des deux facteurs (p65/NF-κB et NRF2) est régulée par le même coactivateur transcriptionnel à savoir le complexe CBP-p300 (CREB-binding protein-p300) [218, 219]. Le complexe CBP-p300 régule la transcription de ses gènes cibles dont les deux facteurs de transcription en ajoutant un groupement acétyle sur les résidus de lysine [218]. Cependant, lorsque le CBP donne la priorité au facteur NF-κB (dans des conditions de surexpression de p65 ou encore des conditions pro-inflammatoires), il limite sa

disponibilité pour le facteur NRF2 [219]. De plus, p65 peut limiter la transcription NRF2 en favorisant le recrutement de l'histone désacétylase 3, qui s'associe au CBP pour induire sa désacétylation. La désacétylation du complexe CBP l'empêche alors de jouer son rôle de coactivateur dans NRF2, diminuant son expression génique [219]. Un autre mécanisme proposé obtenu à partir d'une lignée cellulaire hépatique consiste en une capacité de p65 à augmenter les niveaux de Keap1 qui est un régulateur qui réprime l'expression du NRF2 [220]. Ces résultats mettent en relief les multiples voies par lesquelles le SOx et l'inflammation s'influencent mutuellement.

L'inflammation chronique de bas grade et l'activation du système immunitaire sont reconnus comme acteurs dans la pathogenèse de plusieurs désordres métaboliques associés à l'obésité [221]. L'inflammation qui accompagne généralement l'obésité morbide est caractérisée par une activation continue du système immunitaire inné [222]. L'inflammation est définie comme une des réponses physiologiques de l'organisme lorsqu'il est exposé à des stimuli nocifs, quels qu'ils soient, physiques, chimiques ou biologiques [21]. La réponse inflammatoire a généralement pour but de rétablir l'homéostasie métabolique et physiologique et elle implique des actions conjointes de plusieurs types cellulaires et médiateurs en fonction de la nature du stimulus [21]. En présence de stimuli nocifs, dans un premier temps, c'est la réponse inflammatoire aiguë qui est activée. Elle implique le recrutement de composants plasmatiques et de leucocytes au site de l'agression et est initiée par des macrophages et des mastocytes résidant dans les tissus. La réponse inflammatoire aiguë permet la production de différents types de médiateurs inflammatoires dont des chimiokines, des cytokines, des amines vasoactives, des eicosanoïdes et des produits de dégradations protéolytiques [21, 223, 224]. Dans le cas où l'agent malveillant est éliminé, la réponse inflammatoire est restreinte et la réparation des tissus est activée [21, 223, 224]. Cependant, si la neutralisation et l'élimination des stimuli nocifs ou même si la clairance des cellules inflammatoires apoptotiques du tissu enflammé échoue, le processus inflammatoire persiste et un état d'inflammation chronique ou d'auto-immunité survient entraînant le recrutement de différents agents et cellules (*i.e.* les lymphocytes T) et le développement d'infiltrats lymphoïdes dans le tissu [21, 225].

L'état inflammatoire observé lors du développement du SM est cependant assez particulier. L'inflammation sous-jacente aux pathologies métaboliques ne présente pas de signes d'infection ou d'auto-immunité, et aucune lésion tissulaire massive ne semble avoir eu lieu [21]. Il s'agit en effet d'une réaction inflammatoire qui se met en place avec peu de signes cliniques. Elle est généralement silencieuse, et d'une portée moins grande, d'où son qualificatif d'inflammation chronique de bas grade. Quel que soit son origine, l'état inflammatoire chronique de bas grade semble être un acteur majeur à la fois dans l'occurrence du SM et des conséquences physiopathologiques associées [21]. Les mécanismes qui sous-tendent cet état inflammatoire sont assez particuliers et complexes et ne sont pas encore entièrement déterminés, mais on suggère qu'il peut être métaboliquement induit, d'où son qualificatif de "métaflammation" [21, 226, 227].

Des tissus métaboliques majeurs tels que le tissu adipeux, le foie, le muscle et le pancréas sont des sites d'inflammation en cas d'obésité [221]. Une infiltration de macrophages et des cellules immunitaires est observée dans ces tissus en cas de désordres métaboliques avec des cellules présentant un profil pro-inflammatoire [221]. Les cellules immunitaires et les cellules malades sont impliquées dans la production de cytokines pro-inflammatoires, qui interfèrent avec la signalisation de l'insuline dans les tissus périphériques (via l'activation des voies de signalisation JNK ou encore NF- κ B) ou contribuant au dysfonctionnement des cellules β pancréatiques [21, 221]. L'IL-1 β par exemple est impliquée dans la pathogenèse du DT2 par l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Inflammation chronique du tissu adipeux et effets délétères : Le tissu adipeux est très actif métaboliquement et son dysfonctionnement a des répercussions sur plusieurs autres organes périphériques conduisant ainsi à l'installation du SM. Les travaux du Dr. Hotamisligil et ses collaborateurs ont montré une augmentation de l'expression et de la production de la cytokine TNF- α dans le tissu adipeux des personnes obèses promouvant les risques de la RI [221, 228]. Plusieurs autres études ont ensuite confirmé ces observations en montrant une régulation à la hausse de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, accompagnée par la production et la sécrétion augmentées de cytokines et chimiokines au sein du tissu adipeux dysmétabolique [229-232]. D'autres études ont également décrit la présence des

récepteurs toll like (TLRs) notamment les TLR-2 et TLR-4 dans les adipocytes. Ces récepteurs sont activés par les lipoprotéines et lipopolysaccharides (LPS) bactériens, mais aussi par certains types d'AG, notamment les AG saturés (AGS) [21, 233, 234]. Ainsi, l'ingestion à long terme d'une diète riche en AGS contribue à activer les récepteurs TLR-2 et TLR-4. L'activation des récepteurs TLR induit elle-même la translocation du facteur de transcription NF- κ B vers le noyau favorisant l'expression de facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α , l'IL-6 et d'autres chimiokines [21, 233]. Par conséquent, les récepteurs TLRs sont très activés dans des conditions d'hyperlipidémie, intensifiant ainsi l'inflammation systémique et aggravant le SM [21, 233]. Par ailleurs, dans les conditions d'obésité, le tissu adipeux est sujet à l'infiltration des cellules immunitaires et des macrophages. La présence des macrophages dans le tissu adipeux catalyse la production des cytokines et chimiokines en plus de leur formation par les adipocytes irrégulières. Le recrutement des cellules immunitaires et macrophages par le tissu adipeux dysmétabolique, les dommages métaboliques des adipocytes et la production de cytokines pro-inflammatoires sont fonctions du degré de sévérité de l'obésité et convergent vers l'inflammation systémique et vers le développement de la RI et du SM [21, 221]. L'exposition des adipocytes à des stimuli, inducteurs de stress (le SOx, l'inflammation, les cytokines proinflammatoires ou encore des niveaux très augmentés d'AG et leurs métabolites), active des voies de signalisation incluant des protéines kinases telles que les MAPK, P38-MAPK, c-JNK, IKK β (kinases des inhibiteurs du NF- κ B), mTORC ou encore les protéines kinase PKC [21, 207, 223, 226] (Figure 4. –). Comme souligné précédemment, certaines de ces kinases interfèrent et inhibent la transduction du signal de l'insuline. Des kinases telles que l'IKK, PKC et JNK, impliquées dans la régulation de plusieurs gènes pro-inflammatoires, sont aussi reconnues pour leur capacité d'inhiber le substrat du récepteur à l'insuline et empêcher la transduction du signal de l'insuline [21, 235](Figure 4. –). La perte de l'homéostasie métabolique du tissu adipeux affecte d'autres organelles dont la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (RE) conduisant au stress du RE et au dysfonctionnement, pouvant déborder sur les tissus périphériques [21, 236].

Inflammation chronique au niveau hépatique : L'une des pathologies les plus couramment associées à l'obésité viscérale est la NAFLD. L'inflammation joue un rôle très important dans la pathogenèse et la progression de la NAFLD, et en vue des dommages métaboliques hépatiques

persistants, elle se trouve associée avec des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6 et IL-1 β) [221, 237]. L'état pro-inflammatoire hépatique en cas d'obésité pourrait éventuellement être une réponse pro-inflammatoire subaiguë des cellules hépatiques à la présence de stimuli, semblable à celle observée dans l'inflammation du tissu adipeux à la suite de l'accumulation de lipides dans les adipocytes [221]. En ajout, des médiateurs pro-inflammatoires potentiellement produits par le tissu adipeux dysmétabolique peuvent aussi initier la condition d'inflammation au niveau hépatique [221].

Inflammation chronique du muscle squelettique et ses conséquences : Le muscle est un autre tissu métabolique majeur qui développe la RI et dont des études ont révélé une infiltration par les macrophages en cas d'obésité [221]. Les macrophages ont été observés dans les dépôts de gras intermusculaires chez des souris obèses [229]. Cependant, la présence des macrophages au niveau du muscle est nettement inférieure à celle décrite dans le tissu adipeux [221]. Dans tous les cas, les macrophages produisent des médiateurs de la réponse pro-inflammatoire qui renforce la RI des cellules musculaires [207, 229, 238].

Inflammation chronique du pancréas et ses conséquences : Comme mentionné précédemment, les cellules β pancréatiques s'efforcent de contrecarrer la RI des tissus périphériques, en augmentant leur capacité de production de l'insuline. Elles finissent par s'hypertrophier ce qui conduit à une hyperglycémie chronique. En outre, l'inflammation a été aussi remarquée dans les îlots pancréatiques des patients avec DT2 [239]. Les îlots pancréatiques de ces patients présentent l'apoptose des cellules β , une fibrose, des dépôts d'amyloïdes, une infiltration de macrophages et des cytokines pro-inflammatoires [239]. Dans ce contexte, il est important de souligner que l'IL-1 β , une cytokine pro-inflammatoire, agit comme un régulateur majeur de l'inflammation des îlots pancréatiques dans le DT2 via l'augmentation du recrutement de cellules immunitaires et de la production d'autres cytokines et chimiokines contribuant à la défaillance des cellules β à produire l'insuline et à leur apoptose [240, 241].

Les biomarqueurs inflammatoires systémiques sont généralement considérés comme facteurs de risque du développement du SM et des pathologies cardiométaboliques associées. Des études prospectives ont par exemple identifié le nombre de globules blancs, les taux de cytokines pro-

inflammatoires, les chimiokines et plusieurs autres marqueurs indirects de l'inflammation comme prédicteurs du DT2 [242-249]. Par ailleurs, le nombre de globules blancs ainsi que les niveaux circulants des facteurs de coagulation (fibrinogène et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI1), des protéines de phase aiguë telles que la protéine C-réactive (CRP) et l'amyloïde A sérique (SAA), des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6), et des chimiokines sont élevées chez les patients obèses et DT2 [242-249]. Dans la plupart des cas, les marqueurs pro-inflammatoires corrélaient positivement avec la RI et le SM. L'étude populationnelle "Hoorn" a été la première à montrer que la protéine CRP est un prédicteur de mortalité chez les personnes atteintes de DT2 sur une période de 5 à 7 ans [250]. D'autres études observationnelles chez des personnes avec le DT2 ont par la suite montré que les marqueurs de l'inflammation et de la coagulation, et en particulier la CRP, sont des prédicteurs indépendants des maladies cardiaques et coronariennes [251, 252]. Toutefois, l'association entre la CRP et le risque cardiovasculaire semble être beaucoup plus faible chez les patients atteints de DT2 que chez la population en général, ce qui montre le besoin d'études supplémentaires et approfondies [252, 253]. Dans l'investigation expérimentale ADVANCE, les concentrations plasmatiques d'IL-6 ont significativement influencé et amélioré la prédiction des événements macro vasculaires et des décès chez les patients atteints de DT2 [254].

En accord avec les travaux évoqués précédemment, la perte de poids des patients obèses s'est montrée à plusieurs reprises associée à une diminution des biomarqueurs de l'inflammation, engendrant probablement une amélioration des paramètres métaboliques, à savoir la sensibilité à l'insuline [21, 221, 255]. En fin de compte, il s'avère qu'un mode de vie plus sain et des traitements thérapeutiques adéquats entraînent une baisse des facteurs inflammatoires permettant de freiner les désordres métaboliques engagés [21, 221, 255].

Traitements disponibles et moyens de prévention

Comme indiqué précédemment, l'épidémiologie des pathologies cardiométaboliques à caractère inflammatoires est en progression inquiétante, faisant craindre une explosion "pandémique" future si aucune solution n'est envisagée dans ce domaine [256, 257]. Par conséquent, à l'instar d'autres maladies, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été mises en place afin de prévenir ou

traiter ces conditions métaboliques. La meilleure approche dans les stratégies de lutte contre le SM et les pathologies métaboliques reste cependant la prévention [57, 258].

L'approche préventive permet de réduire les risques de la manifestation et de la progression des dommages métaboliques conduisant aux TCM. Les mesures préventives se résument surtout à l'adoption des habitudes alimentaires et d'un mode de vie plus sain afin de maintenir un poids-santé, de préserver l'équilibre de la balance Redox et de réduire les conditions inflammatoires métaboliquement induites [19, 259]. Il s'agit d'avoir une alimentation équilibrée diversifiée avec des apports adéquats en légumes, en fruits, en produits céréaliers non raffinés, en gras polyinsaturés, et accompagnée de pratique de l'exercice physique afin de préserver, voire améliorer l'homéostasie métabolique [259, 260]. Le régime alimentaire peut en effet affecter la santé métabolique dépendamment de sa composition [57]. Cependant, dans la pratique, chez les personnes déjà souffrantes ayant un stade plus ou moins avancé, les modifications des habitudes de vie à elles seules ne sont pas toujours suffisamment efficaces pour combattre et supprimer les désordres métaboliques [258]. Généralement, les programmes d'ajustements des habitudes de vie sont associés à la prise de médicaments afin de contrôler à long terme les conditions pathologiques reliées au SM [8, 258]. Par exemple, les patients souffrants de DT2 ou d'hypertension ou des deux nécessitent une prise en charge thérapeutique en ajout à l'adoption des habitudes de vie plus saines. Le régime alimentaire et la pratique d'exercice physique peuvent mener à la perte de poids et au rétablissement progressif de l'homéostasie métabolique et physiologique. Toutefois, les états pro-thrombotiques requièrent la médication [258]. Aussi, il existe des lignes directrices concernant les traitements thérapeutiques adéquats à chaque pathologie métabolique du SM et les médicaments sont souvent à prises quotidiennes et pour toute la vie chez les patients souffrant d'une ou plusieurs conditions pathologiques du SM [258].

Quelques exemples de traitements pharmacologiques et effets secondaires : Les traitements pharmacologiques du SM et autres pathologies coronariennes incluent les agents anti-ischémiques, les anti-agrégants plaquettaires (antithrombotiques), des statines comme classe d'hypolipémiants (agissant sur l'inhibition de l'enzyme HMG-CoA réductase), et les fibrates (agonistes des PPAR α) ayant aussi des effets bénéfiques pour les dyslipidémies [258, 261]. On peut également citer les agents anti-hypertenseurs tels que les inhibiteurs d'enzyme de

conversion de l'angiotensine ou des inhibiteurs des récepteurs de l'angiotensine non seulement pour le traitement de l'hypertension artérielle, mais aussi l'insuffisance cardiaque chronique. Il y a aussi les antagonistes d'IL-1 β , des sensibilisants à l'insuline, les β -bloquants pour les patients diabétiques, les inhibiteurs de la dipeptyl peptidase 4 ou encore les agonistes du récepteur de GLP-1 (glucagon like protein-1) qui sont des agents anti-hyperglycémiques et normoglycémians [221, 258, 261]. En agissant sur la composante du SM qui leur est spécifique, les approches thérapeutiques sus-citées peuvent également s'attaquer à d'autres mécanismes impliqués dans la pathophysiologie du SM.

L'obésité étant l'une des causes majeures du SM et des complications associées, le contrôle de la prise de poids s'avère être l'un des points clés stratégiques de la prise en charge du SM. Avec l'avancée de la recherche scientifique, de plus en plus de médicaments anti-obésité sont développés et mis sur le marché afin de contrôler la prise de poids chronique [262]. On peut citer par exemple le semaglutide qui fait partie de la classe des analogues du GLP-1 pour perdre du poids ou encore le setmelanotide qui est une thérapie récemment approuvée et qui peut être utilisée dans des cas de maladies génétiques ultra-rares caractérisées par une obésité très sévère [262]. Des méta-analyses récentes scrutant l'efficacité de nouveaux médicaments anti-obésité ont montré une fenêtre de 2.9 à 6.8 % de perte de poids sur une période d'au moins 12 mois tenant compte de la normalisation de l'effet placebo [262]. Ainsi, on peut noter une réduction de poids d'environ 6.8 % pour le phentermine/Topiramate, 5.4 % pour le liraglutide, 4.0 % pour le naltrexone/bupropion, 2.9 % pour l'orlistat et 3.1 % pour le lorcasérine [262]. Notons que, de son côté, la chirurgie bariatrique peut également être proposée comme alternative dans les cas d'obésité morbide. Les médicaments utilisés pour les pathologies métaboliques ont parfois des effets secondaires désagréables voire graves (*i.e.* crampes et baisse de la force musculaire, pensées et comportements suicidaires, hypertension, accidents vasculaires et cérébraux, infarctus) [262]. Plusieurs médicaments anti-obésité ont été retirés du marché à cause de leurs effets secondaires, et c'est le cas par exemple du lorcasérine éliminé par la US Food and Drug Administration (FDA) pour des risques de développement de cancer chez les patients [262].

Quoique certaines études soutiennent que la meilleure alternative pour contrecarrer le SM et les TCM reste l'emploi d'agents pharmacologiques pour chaque désordre métabolique, l'absence

d'un traitement "fédérateur" visant l'ensemble des composantes du SM oriente vers la prise concomitante de plusieurs médicaments à long terme [50]. Ce recours a pour conséquence une "polypharmacie", des interactions médicamenteuses, des effets indésirables et une faible compliance [50, 263, 264]. Actuellement, on peine à identifier une ou des molécules qui pourraient prévenir la progression de la maladie ou au moins réduire les risques de sa progression d'un stade clinique à l'autre. Le défi est difficile à relever en raison du peu d'informations mécanistiques disponibles sur la pathophysiologie du SM et de son origine multifactorielle. De plus, le contrôle des effets secondaires indésirables et de la toxicité retarde de son côté les progrès dans ce domaine de développement thérapeutique [57]. Il s'avère donc plus qu'urgent de continuer à démasquer les biomarqueurs/prédicteurs pouvant servir de cibles thérapeutiques et permettant de développer de nouveaux traitements pour prévenir/traiter les TCM et possiblement sans effets secondaires supplémentaires aux effets des médicaments disponibles sur le marché. Au cours des deux dernières décennies, les stratégies visant à limiter les effets délétères du SM se sont concentrées sur l'utilisation de composés naturels et les régimes alimentaires contenant des fruits, des légumes verts, des grains entiers, des légumineuses, des probiotiques, de la vitamine C, de la vitamine E et des AG polyinsaturés ω -3 [265-270].

Les nouvelles stratégies basées sur l'alimentation et les produits naturels de santé

Les stratégies de prévention et de prise en charge non pharmacologique des TCM incluent l'utilisation de composés naturels, nutraceutiques qui pourraient présenter des propriétés bénéfiques sur la santé métabolique et cardiovasculaire.

L'alimentation et les régimes alimentaires

L'importance de l'alimentation dans le maintien de l'homéostasie métabolique n'est plus un fait nouveau [271, 272]. L'organisme peut tirer toute l'énergie, les matériaux de structure et les composés dont il a besoin des aliments ingérés [272, 273]. On peut noter les macronutriments, des constituants quantitativement importants (les glucides, les lipides et les protéines), et les micronutriments (les vitamines, les minéraux et d'autres substances indispensables à l'organisme) dans les aliments [272, 273]. Une fois digérés et absorbés par l'organisme, les

nutriments peuvent être utilisés comme source d'énergie importante pour la croissance et le fonctionnement adéquat de différents tissus et organes [272, 273]. Ils servent d'éléments de structure [273] et de catalyseurs et régulateurs de plusieurs réactions biochimiques favorisant le fonctionnement normal de l'organisme [273]. En outre, il est très bien connu que plusieurs nutriments régulent des processus physiologiques allant même jusqu'à la modulation de l'expression de gènes [273], d'où plusieurs concepts notamment celui des aliments fonctionnels, des nutraceutiques, des alicaments et de la nutriginomique [274-276]. L'alimentation n'est donc pas un acte banal mais chaque aliment ingéré peut, à plus ou moins long terme, influencer l'équilibre de l'organisme. Un apport inadéquat de nutriments peut soit conduire à une malnutrition, à une dénutrition ou à une suralimentation, qui pourrait avoir des conséquences néfastes sur la santé lorsqu'elle n'est pas prise en charge de façon efficace [277]. Dans le cas de maladies issues de déficiences nutritionnelles (carences en nutriments spécifiques), il est conseillé d'apporter les nutriments qui permettent de remplir les lacunes et restaurer l'état de santé [278]. Il existe également des programmes de fortifications/enrichissements de certains produits alimentaires en nutriments spécifiques pour lesquels les individus peuvent présenter des carences [279-281]. Dans ce contexte, Santé Canada contrôle les programmes d'enrichissement (le lait enrichi en vitamine D, la farine enrichie en acide folique, et la restitution des vitamines et minéraux perdus au cours de la transformation des aliments) [282]. Les diverses démarches démontrent l'importance de l'alimentation dans les stratégies mises en place afin de prévenir des problèmes de santé publique.

Plusieurs évidences scientifiques montrent qu'une diète non diversifiée, riche en gras et en glucides augmente les risques de développer les TCM et le SM [283-285]. La consommation régulière d'aliments ultra-transformés riches en gras saturés et en sucres raffinés est associée à une hyperinsulinémie, un profil métabolique altéré et à une dégradation de l'état de santé [285-288]. Il est donc conseillé de réduire l'apport d'aliments à charge glycémique élevée, de consommer des glucides complexes (aliments riches en fibres au lieu des formes raffinées), des légumes, des protéines végétales, beaucoup de fruits et d'augmenter son apport en AG insaturés au lieu des formes saturées [289]. Plusieurs études scientifiques confirment qu'en modifiant les proportions des nutriments ou en éliminant/ajoutant certains nutriments dans l'alimentation, on

peut prévenir l'apparition ou la progression de plusieurs maladies nutritionnelles et des TCM (Figure 9. –). Par conséquent, les effets des diètes sur l'homéostasie métabolique sont dépendants de leur composition, et le mode alimentaire est un déterminant majeur de l'état de santé (Figure 9. –).

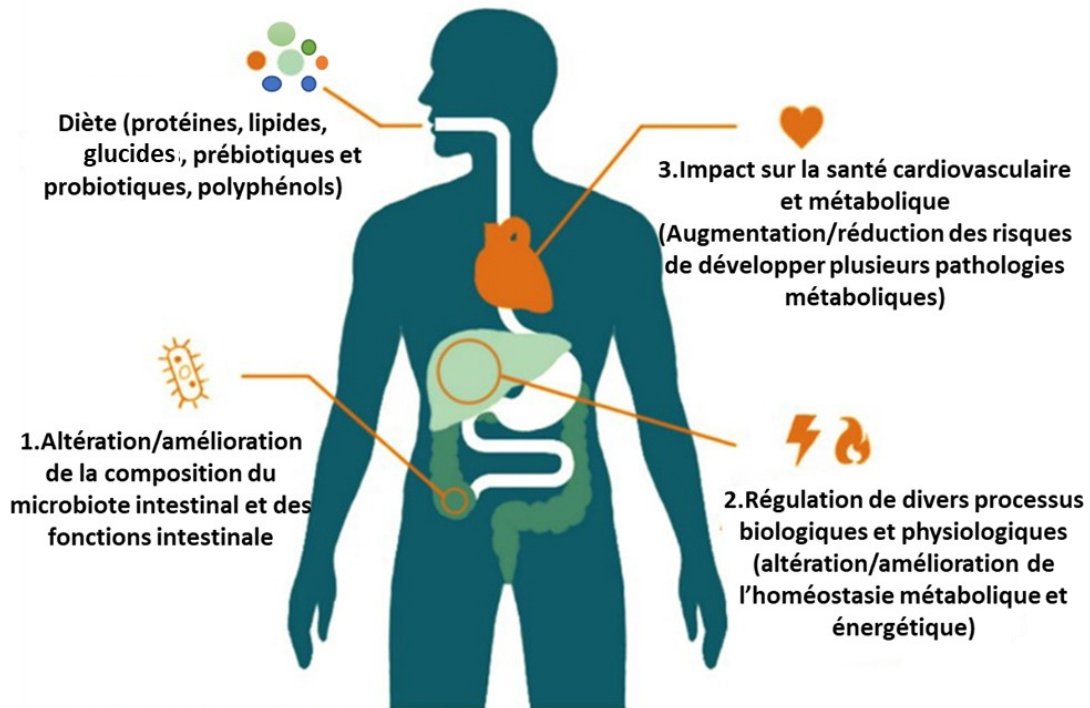


Figure 9. – Effets des diètes selon leur composition sur la santé intestinale et métabolique (figure adaptée de Singh RK et al, 2017) [290].

L'alimentation affecte de façon importante l'état de santé. En fonction de sa composition, une diète peut d'une part fournir des métabolites et produits de digestion qui vont impacter l'homéostasie métabolique et d'autre part, modifier la composition et la diversité du microbiote intestinal, qui au final affecte la santé métabolique.

Une prise en charge thérapeutique non pharmacologique, incluant des modifications dans les habitudes de vie et les comportements alimentaires, figure parmi les stratégies de prévention/traitement de plusieurs pathologies [291]. Dans plusieurs cas, il s'agit de changer les habitudes alimentaires pour prévenir l'obésité, l'adiposité excessive, les dyslipidémies, l'hyperglycémie post prandiale et la RI [291, 292]. Multiples études sont effectuées afin de déterminer des régimes alimentaires efficaces qui peuvent promouvoir la santé métabolique tout en prévenant des déficiences nutritionnelles. Tenant compte de toutes ces informations,

plusieurs modèles diététiques sont utilisés afin d'améliorer l'état de santé et de prévenir l'apparition ou la progression de plusieurs pathologies. Les effets des diètes, comme la diète occidentale, la diète méditerranéenne, la diète cétogène, la diète paléolithique et le végétarisme, sur la santé métabolique ont déjà été évalués dans plusieurs études.

- La diète occidentale ou diète riche en aliments transformés

Les environnements alimentaires obésogènes se sont imposés dans les pays très développés [285]. Ce modèle diététique est basé sur des aliments ultra-transformés riches en gras trans et saturés, en protéines animales, en féculents et sucres raffinés et faibles en fibres et en plusieurs micro nutriments [285]. Cette diète peut contenir des additifs, des agents colorants et conservateurs [285, 286]. Plusieurs évidences scientifiques démontrent que les personnes consommant en grande quantité et régulièrement des aliments ultra transformés sont plus à risque de développer l'obésité en comparaison aux personnes qui en consomment moins [285, 286]. Des études ont montré que des apports alimentaires riches en sucres, en AG trans et saturés mais pauvres en fibres, antioxydants naturels et gras insaturés peuvent stimuler le système immunitaire inné [287, 288, 293]. Ces habitudes alimentaires vont par conséquent stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires [287, 288, 293]. Un apport important et régulier d'aliments transformés, associé à un niveau d'activité physique faible, favorise le développement de plusieurs désordres métaboliques, et entre autres un SOx persistant, jumelé à une inflammation chronique, à des taux de LDL-cholestérol et de TG élevés, à une augmentation du ratio TG-HDL-cholestérol, et même une altération de la signalisation de l'insuline [286]. La diète occidentale classique est donc associée à des risques cardiovasculaires élevés [286]. Les mécanismes biologiques soutenant ces associations sont de plus en plus étudiés. Néanmoins, il est très important de noter qu'il y a d'autres variantes de la diète occidentale avec des modifications des proportions des macronutriments visant à réduire les risques d'altération du profil métabolique. En remplaçant les AGS de la diète occidentale par des AG insaturés, les risques d'athérosclérose sont abaissés dans des modèles murins *Ldlr*^{-/-} [294]. Aussi, l'étude RESMENA-S (Metabolic Syndrome Reduction in Navarra-Spain) effectuée en Espagne a montré qu'en modifiant les proportions en macronutriments, les risques du SM étaient diminués [289]. Dans cette étude, l'apport en glucides complexes (fibres), en AG insaturés, en antioxydants naturels

(fruits, légumes) et en aliments à indice glycémique faible était élevé [289]. Cette variante se rapproche de la diète méditerranéenne.

- La diète méditerranéenne

La diète méditerranéenne est mise en relief dans plusieurs études en vue de ses effets bénéfiques. La diète méditerranéenne est composée d'aliments très riches en antioxydants et anti-inflammatoires naturels, en AG insaturés, en phytostérols et en fibres qui ont des effets physiologiques très importants. La diète méditerranéenne classique est faible en AGS et riche en gras monoinsaturés (huile d'olive) et polyinsaturés (poissons). Elle est également riche en glucides complexes et en fibres [295]. L'huile d'olive contient non seulement les AG monoinsaturés mais aussi des composés phénoliques dont les propriétés bénéfiques pour la santé humaine sont bien connues. Ces composés peuvent exercer des actions antioxydantes et antiinflammatoires. Leurs actions physiologiques dans la prévention et le traitement du SM sont étudiés [296-299]. Les PP d'huile d'olive sont également capables d'abaisser les niveaux de LDL-cholestérol [300]. Ainsi la présence des PP et des acides phénoliques en grande quantité dans cette diète (huile d'olive, légumes, fruits) lui confère des effets biologiques additionnels. Plusieurs évidences scientifiques suggèrent que la diète méditerranéenne peut être considérée comme une diète antiinflammatoire capable de prévenir l'apparition ou la progression de maladies à caractère inflammatoire [301-308]. Cette diète peut également réduire les risques cardiovasculaires [302, 309, 310]. Des concentrations circulantes faibles de marqueurs inflammatoires ont été observées chez des patients consommant la diète méditerranéenne. Plusieurs études d'interventions nutritionnelles randomisées et contrôlées démontrent qu'une bonne adhérence à la diète méditerranéenne est associée à des risques réduits de MCV [301, 303, 311-315]. Les effets protecteurs et bénéfiques se traduisent par une amélioration du profil lipidique (taux de cholestérol et de TG diminué), une amélioration de l'homéostasie du glucose et des taux élevés de HDL-cholestérol. Velazquez-Lopez et ses collaborateurs ont montré qu'une augmentation de la consommation d'AG oméga 3, du Zinc et de la vitamine E, combinée à une réduction des AGS chez les enfants est associée à une amélioration du profil lipidique [316]. Venturini et ses collaborateurs ont quant à eux démontré les effets bénéfiques synergiques que les AG polyinsaturés et l'huile d'olive vierge pourraient avoir sur le métabolisme lipidique chez des

patients ayant le SM [317]. Azzini et ses collaborateurs ont expliqué les faibles taux d'incidence du SM dans la population italienne par les taux circulants élevés de caroténoïdes, de vitamines A et E, d'antioxydants endogènes, de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) et des taux circulants faibles de cytokines pro-inflammatoires et de malondialdéhyde (MDA) [318]. Une diète méditerranéenne enrichie en noix, par exemple, présente des avantages dans le traitement du SM [319]. Cette diète a également des effets bénéfiques pour les fonctions endothéliales [320]. Le bilan de plusieurs études effectuées jusqu'à présent avec cette diète ne démontre que des effets biologiques avantageux pour la prévention ou le traitement des pathologies métaboliques.

- Une diète majoritairement à base de végétaux

Plusieurs études scientifiques ont montré les effets bénéfiques de ce modèle diététique basé majoritairement sur les végétaux sur la santé métabolique. Cette diète a été retrouvée comme capable d'améliorer le profil des lipides (diminution des TG, du LDL-cholestérol, augmentation du HDL-cholestérol), de diminuer l'expression de marqueurs pro inflammatoires et pro oxydants [321-324].

En dehors de tous ces modèles diététiques, il y a aussi depuis plusieurs années la promotion d'un régime alimentaire hypocalorique (restriction calorique) qui consiste à réduire les apports caloriques habituellement ingérés [325-329]. Il faut cependant se nourrir de manière suffisante au niveau qualitatif et surtout éviter d'atteindre un stade de malnutrition. Plusieurs bienfaits biologiques et métaboliques ont été associés à la restriction calorique, notamment la perte de poids, l'amélioration du profil des lipides, la prévention de conditions inflammatoires et la réduction des risques cardiovasculaires [325-330]. Cependant, la restriction calorique peut être très difficile à mettre en œuvre dans la vie réelle. Pour cette raison, des interventions imitant la restriction calorique ont été mises au point, notamment le jeûne intermittent, l'alimentation limitée dans le temps et la modulation des macronutriments. Néanmoins, les effets secondaires possibles de la restriction calorique et ses alternatives doivent être soigneusement pris en compte et elle doit être mise au point avec le suivi des professionnels de la santé. Parmi les effets secondaires, on peut citer la malnutrition, impact sur le système immunitaire permettant une

susceptibilité aux infections, la perte de la masse maigre, la baisse de la densité osseuse et l'impact sur la force musculaire [330].

Plusieurs autres types de régimes alimentaires dont les objectifs sont d'améliorer l'état de santé des personnes existent. Toutefois, malgré les effets bénéfiques de certaines diètes, les variabilités interindividuelles liées à la génétique et au mode de vie de chaque individu ne permettent pas d'obtenir des résultats convaincants des études d'interventions alimentaires. Par conséquent, le régime alimentaire idéal par excellence n'est pas "encore" établi et les réponses à une diète peuvent varier de façon très importante d'un individu à un autre. Actuellement, la nutrition personnalisée, considérant la génétique et les caractéristiques individuelles, est proposée par plusieurs groupes comme un des meilleurs moyens dans les stratégies préventives [331].

Les produits naturels de santé

Les produits de santé naturels, encore appelés produits de médecine douce, sont des composés biologiquement actifs d'origine naturelle qui se distinguent des aliments et des médicaments [332]. Les produits de santé naturels incluent les plantes médicinales, les vitamines et minéraux, les remèdes traditionnels, les AG essentiels, les probiotiques et d'autres produits (i.e. acides aminés et nutraceutiques) [332]. De plus en plus de personnes s'intéressent aux bienfaits biologiques et physiologiques de ces composés [333] et l'OMS estime qu'environ 80 % de la population utilisent des remèdes à base de plantes [334]. Depuis 2004, au Canada, ces composés ont même été assujettis à un cadre réglementaire approprié pour les produits de santé naturels au Canada (Santé Canada, législation et lignes directrices sur les produits de santé naturels). Ce fort intérêt se remarque également dans le domaine de la recherche scientifique, pharmacologique et pharmaceutique [334]. L'impact des composés naturels biologiquement actifs, dont les plantes médicinales, sur la santé humaine n'est pas un fait nouveau [333]. Des études ethnobotaniques ont révélé que l'utilisation des plantes thérapeutiques visant à traiter les différents maux dont pourrait souffrir l'être humain se fait depuis la préhistoire. L'ère moderne avec une approche plus rationnelle associée à l'évolution de la science permet d'étudier les herbes médicinales d'une manière plus fondamentale et mécanistique. En effet, plusieurs études effectuées sur les composés naturels biologiquement actifs permettent de comprendre entre autres leur pharmacocinétique, leurs mécanismes d'actions et les principales maladies qu'ils

peuvent cibler. Ainsi, il a été identifié que les laurales, les magnoliales et les ranunculales sont très enrichies en alcaloïdes benzoisoquinolines utilisés pour traiter la douleur. Il y a aussi l'exemple de *Cannabis sativa* qui contient des cannabinoïdes dont les effets médicaux et pharmacologiques sont étudiés. Des études ont démontré les effets bénéfiques de nutriments tels que les AG polyinsaturés (oméga3), les vitamines K, C et E ou [265-270]. Des données suggèrent qu'un apport élevé en ménaquinones et un statut élevé en vitamine K sont associés à une moindre occurrence du SM et des désordres cardiométaboliques [335, 336]. Plusieurs autres phytonutriments bioactifs ont été identifiés et étudiés dans le cadre des stratégies de prise en charge thérapeutique du SM et des pathologies cardiométaboliques. Il est cependant important de noter que dans certaines études cliniques humaines d'interventions, l'utilisation de molécules nutritionnelles purifiées n'a pas été couronnée de succès et n'a pas réussi à inverser l'obésité ou les pathologies connexes [337, 338]. Par conséquent, le traitement combinant plusieurs types de produits naturels pourrait s'avérer stratégique en raison des actions synergiques pouvant augmenter leur biodisponibilité et les avantages dépendamment des cibles moléculaires et offrant des avantages comparativement aux agents chimiques [339]. Parmi les composés bioactifs des plus étudiés, on retrouve les PP dotés de propriétés bénéfiques pour la santé humaine.

Les PP et les acides phénoliques simples sont des composés synthétisés sous forme de métabolites secondaires par les plantes et sont communément disponibles dans une alimentation saine et variée riche en légumes, fruits, herbes, céréales et grains entiers [340]. L'intérêt des chercheurs pour ces composés phénoliques est de plus en plus retentissant compte tenu de leur fort potentiel pour la santé [14-16, 340]. Malgré certaines variabilités notables, la plupart des données des différentes études effectuées convergent dans le même sens et permettent d'évaluer l'importance de l'intégration des PP dans les stratégies nutritionnelles et thérapeutiques non pharmacologiques de prévention et de prise en charge du SM et des TCM. Les progrès récents en nutraceutiques ont en effet levé le voile sur les bienfaits biologiques des PP, notamment au niveau du SOx et de l'inflammation qui sous-tendent l'insulinorésistance et la dyslipidémie, principales composantes du SM et du DT2. Notre laboratoire s'est depuis longtemps penché sur les bienfaits des PP provenant de fruits qui exercent des effets antioxydants, anti-inflammatoires et hypolipidémiant. Ces actions des PP favorisent aussi une homéostasie

entérocytaire tout en améliorant la dysbiose du microbiote, ce qui permet de lutter contre les facteurs de risque cardio-métaboliques [341]. Les PP apparaissent donc comme des composés thérapeutiques prometteurs dans le traitement ou dans la prévention du SM et des pathologies cardiométaboliques et surtout sans effets secondaires additionnels à ceux de la médication courante.

Les polyphénols dans le maintien de la santé métabolique

Plusieurs études ont montré qu'une diète riche en PP prévient l'apparition ou la progression de pathologies cardiométaboliques chroniques par la régulation de différentes fonctions physiologiques [340, 342-346]. Les PP et les acides phénoliques simples constituent une large variété de composés naturels pouvant se trouver dans les fruits, les légumes, les herbes, les produits céréaliers, les grains entiers, les épices, les assaisonnements et d'autres aliments tels que le chocolat, les boissons dont le vin, les jus, et l'huile d'olive vierge [340].

Consommation des polyphénols : Plusieurs aliments à base de plantes sont riches en PP et on estime que les fruits et les légumes consommés fournissent plus de 8000 composés phénoliques classés en différentes familles. Les flavonoïdes sont les plus abondants dans notre alimentation et parmi les fruits les plus enrichis en PP, on retrouve les baies. Néanmoins, la consommation journalière de PP par un sujet est difficile à estimer compte tenu de la diversité structurale et de la grande variabilité de la quantité de PP des aliments consommés [347]. Deux grandes bases de données publiques rassemblent la teneur en PP des aliments et des boissons. Le Département de l'agriculture des États-Unis (USDA) qui dispose des bases de données pour les flavonoïdes, les PACs et les isoflavones et la base de données Phenol-Explorer (qui est beaucoup plus inclusive que celle du USDA) [348]. Il y a de plus en plus d'études avec pour objectifs d'estimer la quantité de PP consommés journalièrement par les populations. Cependant, il faut noter plusieurs limites à ces études et aussi des variabilités inter-individuelles, régionales et ethniques qui ne permettent pas de définir des valeurs exactes typiques concernant la quantité de PP consommés ou à consommer par jour afin de tirer au maximum profit de leurs bienfaits biologiques. Certaines études s'appuyaient uniquement sur la base de données de l'USDA et donc n'estimaient que les valeurs de l'apport en flavonoïdes ne tenant pas compte des autres classes de PP [348-354]. Parmi

ces études, certaines n'incluaient même pas les PACs dans leurs estimations alors que pour certains aliments, les flavan-3-ols dont les PACs sont les principaux contributeurs [348, 350, 352]. Aussi, certaines études n'incluaient que les PP de petites tailles moléculaires et facilement hydrolysables dans leurs estimations. Ceci est le cas de plusieurs études avec des apports de PP estimés de 820 à 1741 mg de PP/jour et de 377 à 460 mg/jour dans des pays d'Europe et le Brésil respectivement [348, 355-360]. Par contre, des études qui tenaient compte d'un plus large éventail de PP estimaient les valeurs dans un intervalle de 863 mg et 2591 à 3016 mg de PP /jour [348, 361]. De nombreuses autres études sont basées sur des données collectées depuis longtemps ce qui ne reflète pas forcément le régime alimentaire actuel avec la promotion d'un retour aux produits naturels et la consommation de plus en plus de fruits et légumes [348, 362]. On peut néanmoins se rendre compte en comparant la consommation de PP à celle des vitamines que les PP sont les plus consommés [347].

Production et consommation des canneberges : La production mondiale de canneberge en 2019 était de 687 534 tonnes, les États-Unis étant le principal producteur (359 111 tonnes), suivis du Canada avec 172 440 tonnes [363]. Les canneberges représentaient environ 18.5 % (environ 156 575 tonnes métriques) de la production fruitière globale canadienne en 2021. Au premier rang, on retrouve les pommes représentant environ 41.5 % de la production fruitière globale [364]. Au Québec, on a estimé à environ 100 083 tonnes le volume de production de canneberge. En 2021, la quantité de canneberges fraîches consommée au Canada s'élevait à 2.6 kg par personne [365]. La composition chimique des canneberges varie en fonction des conditions environnementales, du milieu de culture, des cultivars ainsi que du processus de maturation [366]. Les quantités de PP dans les canneberges sont faibles aux stades de maturation immature et semi-mature et augmentent dans les canneberges mûres. Les canneberges sont des fruits très riches en composés phénoliques dont les tannins, les acides phénoliques et les flavonoïdes (anthocyanines, flavonols et PACs) [363]. Dans l'ordre des quantités les plus élevées aux plus faibles de classes de PP qui ont été détectées dans les fruits de canneberge, on retrouve les flavan-3-ols (41,5-52,2%), les flavonols (18,6-30,5%), les anthocyanines (8,0-24,4%) et les acides phénoliques (5,0-12,1%) [367]. Les fruits de la canneberge se distinguent de la plupart des aliments et autres fruits de type baies en ce qu'ils disposent d'un puissant pouvoir antioxydant,

anti-inflammatoire et qu'ils sont riches en PACs de type A connus pour leurs effets bénéfiques [368]. En raison de leur composition et de leur richesse en antioxydants et composés phénoliques, les canneberges ont été reconnues comme nutriments disposant de propriétés bénéfiques pour la santé, et ce, malgré une certaine dichotomie dans les différentes études [369-371].

Des interventions expérimentales ont montré par exemple que la consommation de jus de canneberge augmente la capacité antioxydante du plasma tout en réduisant considérablement l'oxydation des lipides chez les femmes ayant des problèmes de santé [372, 373]. Malgré les divergences et les controverses dans les données, une certaine série d'études montrent que la canneberge prévient les TCM, réduit les risques de DT2 [374], améliore le profil lipidique, réduit le risque d'athérosclérose en diminuant les lipoprotéines de basse densité, en réduisant la pression artérielle [375-382].

En raison de ces évidences scientifiques, nous nous sommes intéressés aux PACs purifiés à partir de la canneberge dans notre étude.

Caractéristiques et classification des polyphénols

Les PP sont caractérisés par la présence d'un ou de plusieurs groupements phénoliques et ils possèdent un ou plusieurs groupements hydroxyles sur leurs cycles benzène [383]. Selon la complexité de leurs structures, les PP sont subdivisés en deux groupes que sont les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (acides phénoliques, stilbènes, lignans) (Figure 10. –) [340, 383-386]. Les flavonoïdes sont des groupes phénoliques complexes qui disposent de deux cycles benzènes (nommés **A** et **B**) reliés par un hétérocycle (nommé **C**) dans leurs structures (Figure 10. –). Selon les modifications structurales de l'hétérocycle C, les flavonoïdes sont différenciés en flavonols, en flavones, en isoflavones, en flavanones, en flavan-3-ols, et en anthocyanines [383, 385] (Figure 10. –).

Dépendamment du degré de polymérisation des flavonoïdes, les polymères et les oligomères peuvent être distingués [387]. C'est le cas des tannins qui sont subdivisés en deux groupes hétérogènes que sont les tannins condensés (PACs) et les tannins hydrolysables (ellagitannins) (Figure 10. –). Les PP sont généralement retrouvés sous forme conjugués dans les substances naturelles. Ils peuvent se lier aux protéines et aux glucides par des liaisons assez stables. Ils

peuvent être conjugués à plusieurs types de sucres dont les plus communs sont le glucose, le galactose, le rhamnose, la xylose, le rutinose, l'arabinopyranose et l'arabinofuranose [388]. Ces modifications chimiques de glycosylation et d'autres telles que les méthylations et l'ajout de résidus gallates contribuent à la stabilité structurelle des flavonoïdes pendant le stockage dans les vacuoles et les chloroplastes [389-391]. Une fois que la plante, le fruit ou la graine est récolté, les flavonoïdes ont généralement une bonne stabilité dans ces différentes formes dérivées et conservent des concentrations élevées dans les aliments et les boissons. Toutes ces modifications chimiques de la structure et l'ajout de résidus influencent l'absorption et la biodisponibilité des PP [392-395].

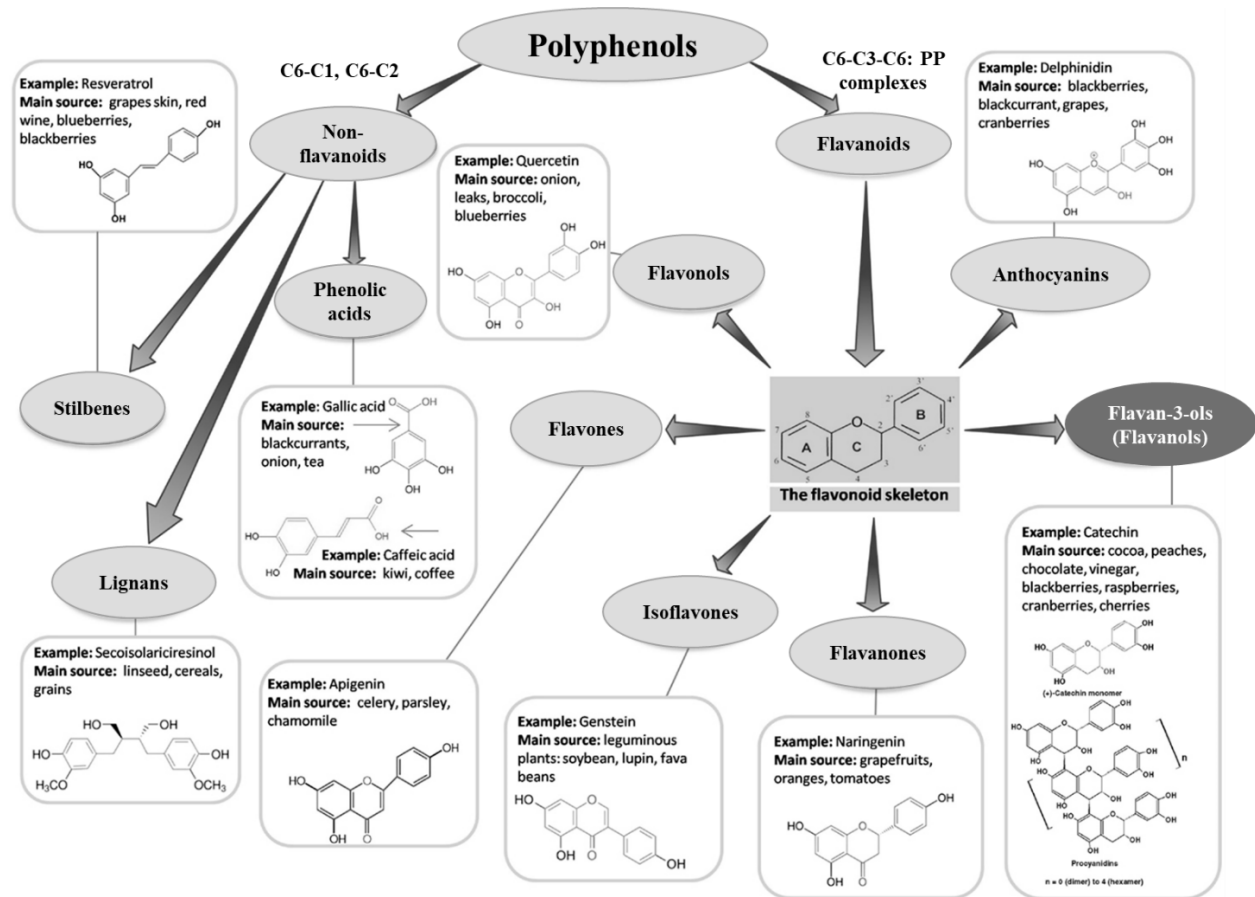


Figure 10. – Classification générale des polyphénols (adaptée de Goszcz et al., 2015 et Pinto et al., 2017)[348, 386]

Les PP, selon la complexité de leur structure, sont subdivisés en deux groupes que sont les flavonoïdes (PP complexes) et les non-flavonoïdes (acides phénoliques, stilbènes, lignans). Dans le groupe des flavonoïdes,

se retrouvent, les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanones, les flavan-3-ols, et les anthocyanines.

Mécanismes d'actions, d'absorption et biodisponibilité des polyphénols

Les PP exercent leurs actions métaboliques via une multitude de mécanismes suite à leur absorption [341]. Un résumé succinct et concis est présenté dans cette partie introductive de la thèse des PP.

Quelques mécanismes d'actions majeurs des polyphénols

Une fois ingérés et absorbés, les PP peuvent aider à prévenir plusieurs conditions métaboliques en régulant des processus cellulaires et physiologiques par divers mécanismes d'actions étudiés et reconnus. Les mécanismes d'actions des PP vont au-delà des simples propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Ils font intervenir des actions prébiotiques permettant la production de post-biotiques (métabolites microbiens) et la modification de la composition et de la richesse du microbiote intestinal. Par ailleurs, des actions épigénétiques et des fonctions de régulation d'expression ou d'activités de diverses enzymes sont aussi connues.

Fonctions antioxydantes des polyphénols

L'une des propriétés les plus connues des PP est leur fonction antioxydante contribuant à l'équilibre de la balance prooxydants/antioxydants. Les PP sont connus comme des contributeurs majeurs à l'activité antioxydante totale du fruit [145]. Ils le font par don d'un électron ou d'un atome d'hydrogène à des EROS, d'azote et de chlore basées soit sur le transfert d'atomes d'hydrogène, soit sur un transfert d'électrons uniques par transfert de protons. Plusieurs mécanismes d'action permettent aux PP d'accomplir ces fonctions antioxydantes (**Figure 11. –**).

- Piégeage directe des radicaux libres [396-398].
- Inhibition des enzymes impliquées dans le SOx et chélation des métaux/ions métalliques responsables de la production des radicaux libres et espèces réactives [399, 400].
- Modulation de l'activation des systèmes de défense antioxydante et la régulation du processus de détoxification par les enzymes de phase II [401-407].

- Prévention de la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines et les dommages du matériel génétique [408-411].
- Protection de la perméabilité et l'intégrité des membranes ainsi que les fonctions mitochondriales [412-415].

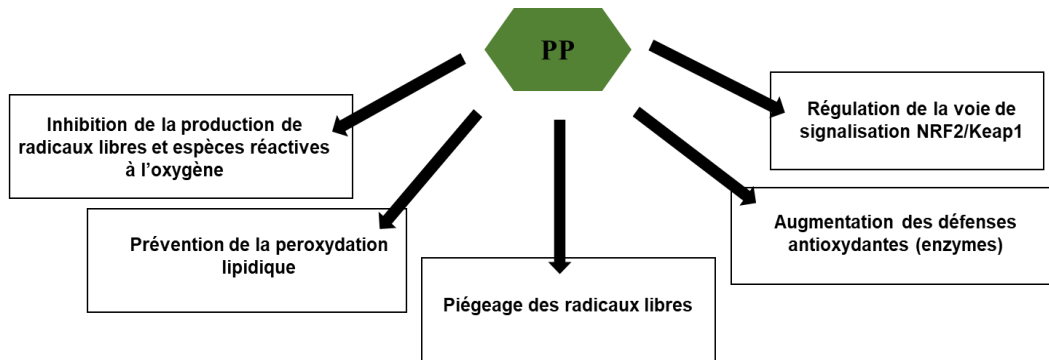


Figure 11. – Récapitulatif simplifié des propriétés antioxydantes des polyphénols (figure récapitulative réalisée à l'aide du logiciel powerpoint)

Propriétés anti-inflammatoires

Plusieurs études ont démontré une interaction à double sens entre les voies de signalisation du SOx et de la réponse inflammatoire ainsi que le rôle pathogénique du SOx dans des maladies chroniques inflammatoire [416-419]. Les radicaux libres et autres espèces réactives produits durant les réactions pro-oxydantes peuvent stimuler la réponse pro-inflammatoire résultant à la production de cytokines pro-inflammatoires. L'inflammation chronique est aussi connue pour être impliquée dans les pathologies cardiométaboliques dont la RI, le DT2, et les MCV [420]. Les PP peuvent donc diminuer la réponse pro-inflammatoire en prévenant le SOx.

Outre leur fonctions antioxydantes, plusieurs autres mécanismes permettent aux PP d'effectuer leur action anti-inflammatoire notamment l'inhibition des enzymes impliqués dans l'oxydation et dans le processus inflammatoire [421]. Les PP ont été reconnus comme capables de réduire l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique (i.e. la cyclooxygénase (COX), la lipoxygénase (LOX) et l'oxyde nitrique synthase (NOS) [422]. L'inhibition de l'activité de ces enzymes réduit la production de leucotriènes, de prostaglandines et de NO qui sont des médiateurs majeurs de l'inflammation. Les PP peuvent moduler l'activité de protéines kinases à tyrosine et Ser/Thr, qui sont connues pour être impliquées dans les processus

d'activation cellulaires telles que l'activation des lymphocytes B et la prolifération des cellules T [423-428]. Les PP sont également capables de prévenir l'activation de l'inflammasome NLRP3, de moduler les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes, et d'interférer sélectivement avec la production de molécules pro-inflammatoires telles que les cytokines/chemokines [429]. La quercétine et la catéchine par exemple exercent une action inhibitrice de l'expression du TNF α et de l'IL-1 β et stimulent la libération de l'IL-10 [426, 427].

Mécanismes épigénétiques

Un autre mécanisme d'action suggéré pour l'action des PP est l'activation de modifications épigénétiques, incluant la méthylation de l'ADN, la régulation des microARNs, l'activité des sirtuines et l'acétylation des histones [430-433]. Les PP de divers extraits peuvent agir comme inhibiteurs des histones acétyltransférases et modulateurs de la méthylation des résidus de lysines sur les histones [434]. La modulation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans les réponses oxydantes ou pro-inflammatoires par les PP pourrait également résulter de leur capacité à interagir avec les facteurs épigénétiques incluant les sirtuines ou les miARNs. Quelques chercheurs rapportent la possibilité que les PP puissent moduler l'expression de plus d'une centaine de miARNs impliqués dans divers processus cellulaires dont le SOx et l'inflammation [435]. Comme exemples, les PP de raisin ont exercé des actions antiinflammatoires et antioxydantes chez des souris obèses en modulant l'expression de miR-33a et miR-122 [436]. D'autre part, les PP extraits d'huile d'olive vierge ont aussi prévenu le SOx et l'inflammation dans des adipocytes en régulant probablement l'expression de miR155-5p et miR34a-5p [430, 437]. La quercétine et l'isorhamnétine ont atténué la réponse pro-inflammatoire et le SOx dans les macrophages stimulés par le LPS. Ces deux composés ont également diminué l'expression du miR155 [438].

Les sirtuines sont des protéines enzymatiques capables de déacétyler les protéines histones ou non-histones telles que le facteur NF- κ B, la protéine forkhead box class O (FOXO) 3, la p53, la PPAR γ , la PGC1 α et la synthase eNOS [431-433]. Des études ont démontré que la SIRT1 pouvait également déacétyler et supprimer l'activité transcriptionnelle de AP-1 conduisant à une régulation à la baisse de l'expression génique de COX-2. La catéchine et la curcumine, deux composés phénoliques, peuvent induire une hypoacétylation de RelA/p65 en inhibant

directement l'activité des enzymes histones acétyltransférase qui conduisent à réduire les fonctions du facteur NF-κB et les réponses inflammatoires associées.

Plusieurs autres composés phénoliques ont été identifiés dans des études *in vitro* comme des inhibiteurs de l'activité de la ADN méthyltransférase (DNMT), un autre mécanisme épigénétique [439]. L'epigallocatechine a été le premier PP décrit capable d'inhiber la méthylation de l'ADN en se liant sur le site catalytique de la DNMT [439]. D'autres études ont suggéré que certains flavonoïdes dont les catéchines inhibent l'activité de la DNMT en favorisant la méthylation de l'ADN et en catalysant le groupement méthyle provenant de la S-adénosyl méthionine (SAM) vers une cytosine. Par ailleurs, les flavonoïdes pourraient aussi induire indirectement la déplétion de l'adénosyl méthionine, le transfert d'un groupement méthyle de SAM vers une cytosine, due à la méthylation des composés eux-mêmes, et par rétro-inhibition de la DNMT due à l'accumulation du S-adénosyl homocystéine [440-442].

Absorption et biodisponibilité des polyphénols

Afin de mieux cerner les mécanismes d'action des PP surtout leurs actions prébiotiques, il est important de comprendre leur métabolisme et leur niveau d'absorption *in situ*.

Après ingestion, les classes de PP décrites précédemment sont absorbées de façon très différente dépendamment de leur complexité structurale, de leur interaction avec d'autres nutriments/constituants alimentaires et de la diversité du microbiote intestinal de l'hôte [394, 443]. L'étude de l'absorption et de la biodisponibilité des PP est importante afin de déterminer lesquels sont les mieux absorbés et lesquels conduisent à la synthèse de métabolites bioactifs. Les PP les mieux absorbés sont les isoflavones et les acides phénoliques tels que l'acide caféique et l'acide gallique, suivis des catéchines et des flavanones [444]. À contrario, les PP de grande taille moléculaire, les oligomères et les polymères tels que les PACs, les catéchines galloylées et les anthocyanines sont moins bien absorbés [445]. Les PP complexes et ceux de grande taille moléculaire ont donc une faible biodisponibilité et des niveaux circulants relativement bas [394, 443].

Le métabolisme des PP commence au niveau gastrique en raison de l'acidité gastrique avec généralement des réactions d'hydrolyse et de clivage de résidus complexés aux PP. Quoiqu'une

très faible partie des PP biotransformés au niveau gastrique est déversée dans le sang, la majeure partie des PP, métabolisés ou non métabolisés, est destinée à être biotransformée au niveau du grêle et du côlon par des réactions métaboliques supplémentaires (Figure 12. –). Les réactions de biotransformation des PP représentent des mécanismes clés de contrôle de l'absorption intestinale des PP.

Dans l'intestin grêle, les résidus de sucre sont clivés du squelette phénolique. Les PP glycosylés sont généralement métabolisés en dérivés aglycones par les enzymes telles que la lactase phlorizine hydrolase (LPH se trouvant au niveau de la membrane des entérocytes) et la β -glucosidase (cBG dans le cytosol des entérocytes pour les glycosides polaires) [446-448]. Les produits aglycones peuvent ensuite entrer dans les cellules épithéliales via une diffusion passive ou par un transport actif où ils vont subir d'autres réactions cataboliques, un processus qui est qualifié de métabolisme de phase II et permettant d'obtenir des dérivés de plus petite taille qui vont être absorbés [446-448] (Figure 12. –). Il faut également noter que la nature des résidus de sucres peut affecter l'absorption des PP glycosylés dans le petit intestin [449]. Les flavonoïdes liés au rhamnose (la quercétine-3-O-rhamnoside, la quercétine-3-O-rhamnoglucoside) par exemple ne peuvent être métabolisés dans l'intestin grêle par les enzymes endogènes mais doivent atteindre le côlon et être catabolisés par les rhamnosidases sécrétées par les bactéries du microbiote intestinal [449] alors que les (-)-épicatéchines (flavan-3-ols) qui sont souvent acylées sont absorbées au niveau entérocytaire sans aucune réaction d'hydrolyse [450].

Les PP de grande taille moléculaire, au-delà des trimères, à l'exemple des PACs ne peuvent être directement absorbés par le petit intestin dans leurs formes natives [451]. Ils sont généralement métabolisés par les enzymes produites par les bactéries du colon (Figure 12. –). Ces bactéries du microbiote, avec un potentiel enzymatique élevé, peuvent effectuer des réactions de décarboxylation et d'hydrogénation de résidus alcènes, des réactions de clivage de résidus de sucres ou encore des clivages des liaisons carbone-carbone de l'hétérocycle ou des cycles aromatiques. Ces différentes réactions métaboliques produisent plusieurs métabolites ayant des propriétés bénéfiques. Les principales réactions du catabolisme microbien de nombreux flavonoïdes comprennent la fission des cycles aromatiques A et B de leur structure et dans laquelle l'hétérocycle C est dégradé, conduisant à la formation de composés aromatiques

hydroxylés à partir du cycle A et d'acides phénoliques à partir du cycle B [452]. Plusieurs autres réactions ou clivages tels que la déhydroxylation, la déméthylation et la décarboxylation peuvent se produire au cours du métabolisme microbien des produits aglycones des flavonoïdes et des acides phénoliques en plus des mécanismes de fission des cycles aromatiques. Le métabolisme des flavonoïdes du microbiote intestinal et leur circulation entéro-hépatique sont déterminants pour leur biodisponibilité [452]. Le métabolisme des PP dans le colon peut aussi être affecté par plusieurs facteurs tels que la structure chimique, la composition et la diversité du microbiote de l'hôte [394]. Le [Tableau 2. –](#) fait un récapitulatif de quelques espèces de bactéries pouvant intervenir dans le métabolisme des différentes classes de PP.

Les acides hydroxycinnamiques (groupe des non-flavonoïdes) sont généralement estérifiés en sucres, acides organiques et lipides. Bien que le principal site de leur métabolisme soit le microbiote intestinal en raison de l'absence d'estérases spécifiques dans les tissus humains capables de rompre leurs liaisons ester spécifiquement, environ un tiers seulement de leur absorption peut également se faire à partir de l'intestin grêle [453-456]. D'autres classes d'acides hydroxycinnamiques tels que les ellagitannins (polymères) ne peuvent pas être métabolisés par l'action des enzymes LPH ou de cBG et ne sont donc pas absorbés à partir de l'intestin grêle. Ces composés phénoliques pénètrent dans le côlon, où les micro-organismes clivent les fractions conjuguées. Les produits aglycones obtenus sont largement métabolisés par les micro-organismes du microbiote intestinal, ce qui conduit à la synthèse de divers acides hydroxy phénylacétiques [457, 458].

La faible absorption des PP consommés au niveau du petit intestin est évidemment liée à un métabolisme actif et effectif impliquant les bactéries du microbiote intestinal [459].

Après l'absorption des produits finaux ou aglycones au niveau de l'intestin grêle ou du colon, ils subissent quelques modifications supplémentaires comme la méthylation, la sulfatation et la glucuronidation appelées métabolisme de phase II ([Figure 12. –](#)). Tous les produits finaux (de l'intestin grêle et du colon) vont ensuite entrer dans la circulation sanguine via la veine porte hépatique atteignant le foie où ils vont être la cible d'autres modifications supplémentaires ([Figure 12. –](#)). Une partie des métabolites va être excrétée dans l'urine, une autre partie va être

acheminée vers des organes et tissus cibles via la circulation sanguine pour y effectuer des fonctions biologiques [460-462] (Figure 12. – Figure 13. –). D'autres métabolites vont être transportés vers l'intestin sous forme de constituants biliaires pour y être hydrolysés par des enzymes de la flore intestinale libérant ainsi de nouveaux aglycones [452, 463, 464] (Figure 12. –). Ces nouveaux dérivés vont être réabsorbés pour une partie et une autre partie va être excrétée dans les fèces [452, 463, 464]. Le recyclage entérohépatique des PP permet de maintenir une concentration non négligeable de métabolites et de composés phénoliques dans la circulation sanguine [452, 463, 464].

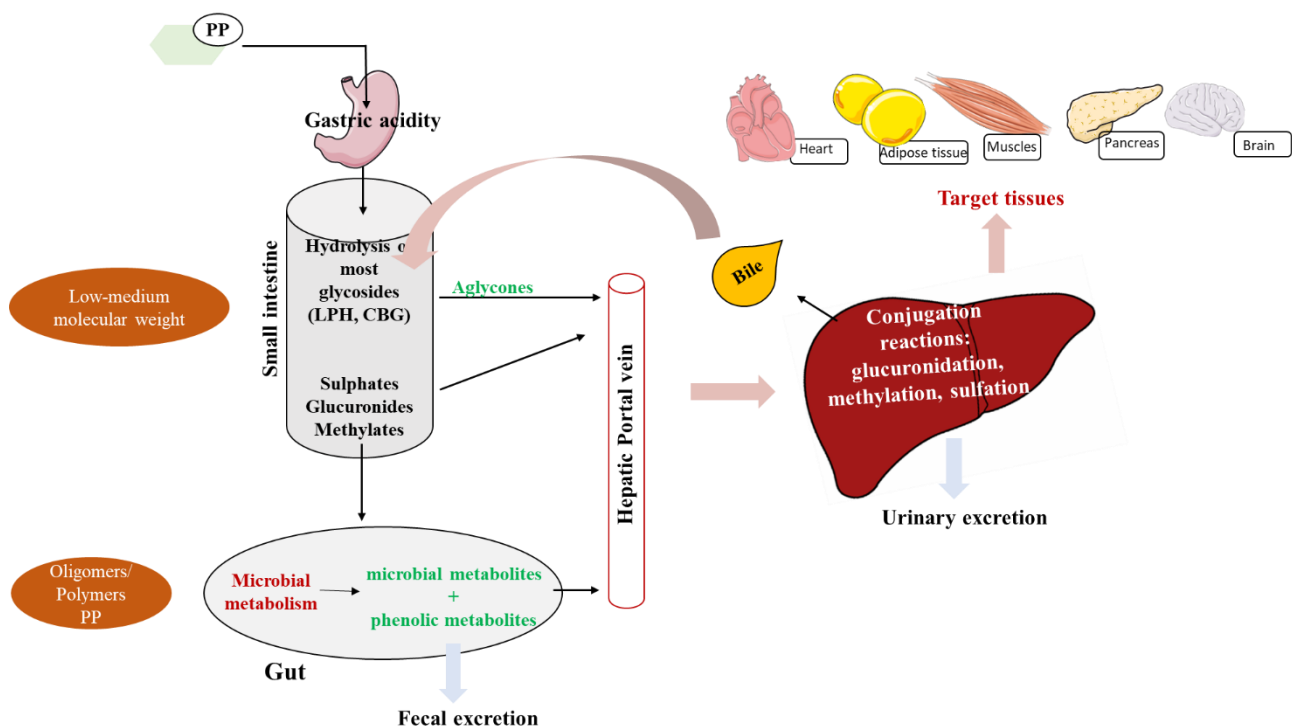


Figure 12. – Absorption et métabolisme des polyphénols et leurs dérivés chez l'humain (schéma réalisé à l'aide du logiciel powerpoint inspirée de la revue citée ici) [341].

Le métabolisme des PP commence au niveau gastrique (pH très acide) avec les réactions d'hydrolyse; la majorité de tous les PP ingérés biotransformés au niveau gastrique ou non sont ensuite acheminés vers le petit intestin où ils subissent des réactions de clivage de résidus de sucre avec l'intervention de la LPH et la cBG; les dérivés aglycones obtenus peuvent être absorbés directement à partir de là mais certains vont subir d'autres types de réactions métaboliques appelés métabolisme de phase II (méthylation, sulfation et glucuronidation) avant d'être absorbés. Les PP complexes et ceux de grandes tailles moléculaires se rendent au colon étant donné qu'ils ne peuvent être métabolisés dans le petit intestin. Dans le colon, ces

PP vont être métabolisés par les bactéries du microbiote intestinal, donnant ainsi des métabolites microbiens et phénoliques. Les produits finis issus du petit intestine et du colon vont être déversés dans la circulation sanguine via la veine porte hépatique, et peuvent donc rejoindre le foie, où ils seront soumis à d'autres réactions métaboliques de phase II. Après ces réactions, ces produits conjugués sont acheminés vers des organes et tissus cibles via la circulation sanguine. Certains produits conjugués pourront cependant être excrétés dans l'urine. D'autres produits sont excrétés sous forme de composants biliaires dans l'intestin. Les métabolites non absorbés sont éliminés dans les fèces.

Interactions polyphénols - microbiote intestinal : effet prébiotique des polyphénols et action bénéfique des post biotiques

La métagénomique (l'étude du génome des microorganismes et notamment les bactéries qui habitent notre intestin et qui régulent plusieurs de nos processus physiologiques de façon très profonde), la nutrition et la génétique font parties des facteurs particulièrement questionnés dans la mise en place des stratégies de prévention et de prise en charge des pathologies cardiométaboliques.

Importance du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est un régulateur majeur de l'immunité et participe largement à la modulation de l'expression génique de l'hôte. L'intestin humain contient en moyenne 10^{14} (100000 milliards) de bactéries provenant de 1000 espèces différentes et cette flore microbienne contribue au bon fonctionnement des systèmes digestif et immunitaire [465-467]. Ces bactéries disposent d'un fort potentiel hydrolytique et enzymatique qui leur permet de dégrader des aliments non digérés dans le tractus gastro-intestinal, au niveau de l'estomac du jéjunum, de l'iléon et du colon dans un gradient croissant [468].

Deux voies métaboliques principales (saccharolytique et protéolytique) peuvent être distinguées dans la digestion des aliments par le microbiote [469]. Dans la voie saccharolytique, le microbiote intestinal clive les sucres conduisant à la production de la majorité des AG à chaîne courte (AGCC). La deuxième voie catabolique est représentée par la fermentation des protéines, qui est également responsable de la formation d'AGCC, mais conduit aussi à d'autres métabolites comme l'ammoniac, les thiols, les phénols, les indoles et diverses amines. Le microbiote intestinal, par

son potentiel catalytique et hydrolytique, produit en effet de nombreuses molécules de signalisation et des composants structurelles bactériennes (LPS et peptidoglycanes) qui peuvent affecter plusieurs processus physiologiques de l'hôte. Ces molécules sont capables d'interagir avec les cellules de surface de la muqueuse de l'hôte généralement via des récepteurs spécifiques déclenchant ainsi de nombreux mécanismes de signalisation en aval [470]. Le microbiote intestinal peut également influencer le métabolisme de l'hôte et d'autres fonctions via plusieurs voies de signalisation, y compris les voies des métabolites microbiens (par exemple, la voie de la triméthylamine (TMA)/triméthylamine-N-oxyde (TMAO), la voie des AGCC et les voies des acides biliaires (BA) [471-480]. D'autres mécanismes par lesquels les bactéries du microbiote intestinal peuvent réguler les voies métaboliques impliquent l'interaction entre certains métabolites microbiens et les hormones endocriniennes telles que la ghréline, la leptine, le GLP-1 et le peptide YY (PYY) [260, 481]. Le microbiote intestinal, peut donc par ses métabolites moduler plusieurs fonctions biologiques et peut être impliqué dans le développement ou la prévention/le traitement du SM [482].

La TMAO par exemple, le produit d'oxydation hépatique de la TMA, est reconnue comme un promoteur possible des maladies cardiométaboliques et de l'athérosclérose [483, 484]. Certains essais cliniques ont également établi un lien entre les niveaux de TMA/TMAO et des MCV [471, 480, 484-488]. Les AGCC, quant à eux, sont capables d'activer les voies des récepteurs couplés aux protéines G (GPRs) qui influencent la sécrétion de la rénine et la modulation de la pression artérielle [472]. Des études ont démontré les effets métaboliques intéressants des AGCC tels que la régulation de la réponse inflammatoire ou encore les actions anti-obésité et anti-adiposité [473, 489, 490]. Les AGCC peuvent affecter la fonction pancréatique, la libération d'insuline, ainsi que la régulation de l'appétit en stimulant les cellules L intestinales à sécréter le GLP-1 via les récepteurs GPR41 et GPR43 [491, 492]. Une étude a démontré qu'une supplémentation à long terme avec le propionate, un AGCC, a significativement amélioré les taux de GLP-1 et de PYY postprandiaux permettant ainsi de réduire l'apport calorique et de diminuer la prise de poids [493]. Aussi, l'administration d'acétate (AGCC) par voie rectale et intraveineuse était liée à une amélioration de la concentration plasmatique de PYY et de GLP-1 chez les humains [494]. D'autres métabolites microbiens tels que les BA par exemple permettent l'absorption des graisses et des

molécules liposolubles mais peuvent également affecter la composition du microbiote intestinal [495, 496]. Tout comme les AGCC, les BA peuvent également participer à la régulation du métabolisme des lipides (au niveau systémique et hépatique) et du métabolisme du glucose [260, 476, 477]. Les taux de TG circulants et de HDL-c ont été associés au microbiote intestinal indépendamment de l'IMC et d'autres troubles métaboliques [497].

Les récents progrès des techniques de séquençage de l'ADN ont permis de découvrir l'extraordinaire diversité des groupes bactériens qui sont présents dans l'intestin, mais aussi les variations de la composition de la microflore d'un individu à l'autre, voire d'une population à une autre [498]. La majorité de la communauté microbienne du côlon est composée de 5 phylums (Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Verrucomicrobia et Actinobacteria) [499] avec une grande diversité au niveau des espèces et de leur abondance relative (1000-1400 espèces) [459]. Dans un écosystème intestinal sain, les Bacteroidetes et Firmicutes anaérobies contribuent à plus de 90% du total des espèces bactériennes [499]. Cependant, les variabilités interindividuelles dans le rapport des Firmicutes aux Bacteroidetes peuvent être notées en raison de différences dans les génomes de l'hôte et de facteurs environnementaux, tels que l'utilisation d'antibiotiques, l'alimentation et le mode de vie [500, 501].

Outre ses métabolites, la composition du microbiote intestinal en elle-même est également associée à de nombreuses MCV et métaboliques. Par exemple, le microbiote intestinal est appauvri en plusieurs espèces bactériennes telles que les bacteroides, Roseburia et Akkermansia, ainsi que Faecalibacterium prausnitzii en cas de pathologies métaboliques à caractères oxydatif et inflammatoire [502]. Les taux d'Akkermansia muciniphila ont été inversement corrélés avec une altération du métabolisme du tissu adipeux, des perturbations métaboliques et l'inflammation chronique chez des souris obèses [44]. L'athérosclérose a été liée à une richesse en *Lactobacillus* [503] et des niveaux faibles de *Roseburiam* [504] et une autre étude a montré que le matériel génétique de certaines bactéries présentes dans l'intestin des personnes atteintes d'athérosclérose a été identifié dans les plaques d'athérome [505, 506]. L'hypertension a été associée à une augmentation du ratio Firmicutes/Bacteroides et à une diminution de la diversité et de la richesse du microbiote [507] alors que l'insuffisance cardiaque a été associée à une augmentation de la présence de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus viridans*.

Récemment, une relation a été établie entre la composition du microbiote intestinal et la gravité de l'infarctus du myocarde chez des rats [508, 509]. Par ailleurs, un traitement par des antibiotiques à large spectre ou l'administration du probiotique *Lactobacillus plantarum* réduit la survenue et l'intensité de l'infarctus cardiaque [508, 509].

Ainsi, une infection, une maladie ou encore la prise d'antibiotiques peuvent perturber et déséquilibrer la composition du microbiote intestinal affectant ainsi notre capacité à nous défendre contre les bactéries pathogènes. De plus en plus d'études associent la composition du microbiote à l'état de santé et montrent que notre alimentation est la meilleure voie pour protéger et renforcer ce microbiote [510, 511].

Les PP, comme les fibres et d'autres nutriments, sont capables de moduler la composition du microbiote intestinal. Cette capacité prébiotique représente l'un des mécanismes d'actions sous-jacent aux effets bénéfiques des PP dans la prévention et le traitement du SM et des pathologies cardiométaboliques, un aspect auquel nous nous sommes intéressés dans notre programme de recherche. Comme décrit, la majorité des PP est métabolisée par les bactéries intestinales en métabolites phénoliques bioactifs (Figure 12. –) et en contrepartie les PP et leurs métabolites dérivés modulent aussi la composition du microbiote. Ainsi, il existe une relation mutuelle bidirectionnelle entre les PP et le microbiote intestinal (Figure 12. – Figure 13. –) et les conséquences de ces interactions peuvent avoir des applications thérapeutiques dans la prise en charge des TCM et du SM.

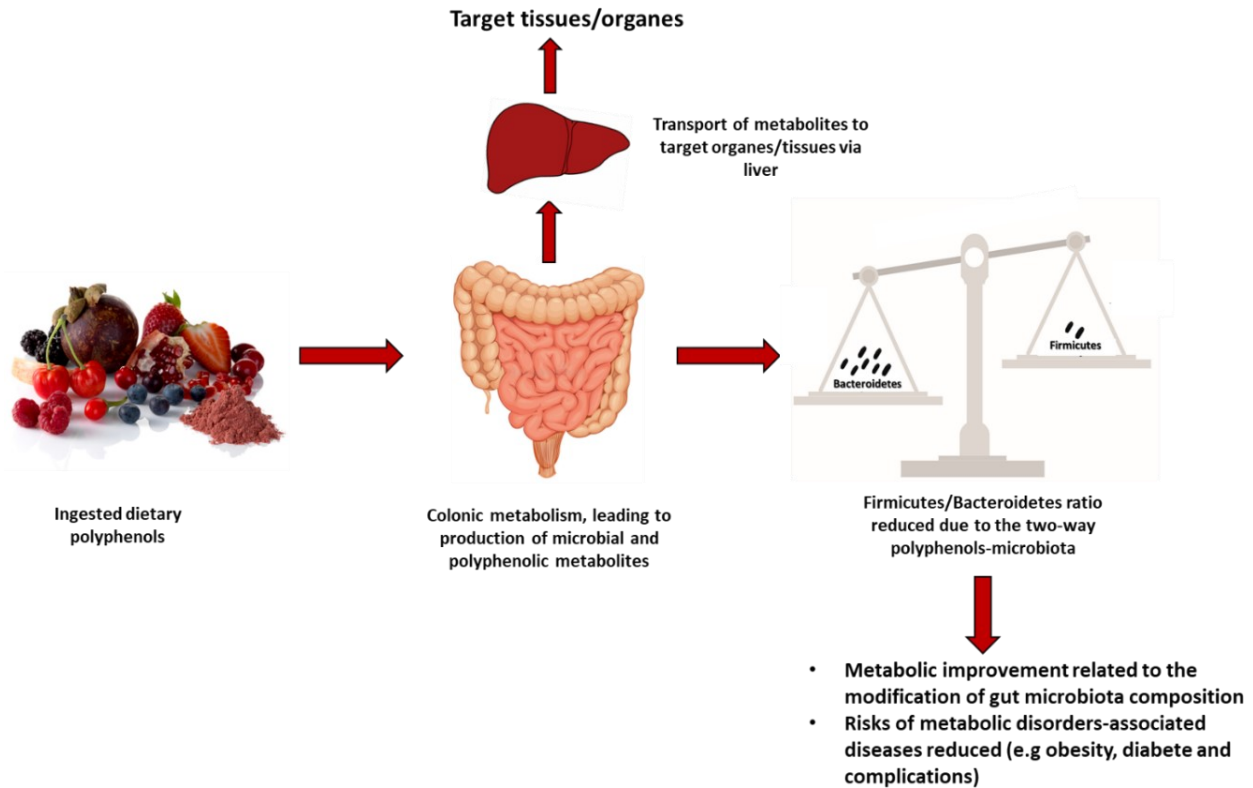


Figure 13. – Modulation du microbiote intestinal par les composés phénoliques (schéma réalisé à l’aide du logiciel powerpoint).

L’interaction synergique entre les PP et les bactéries du microbiote intestinale permet la production de métabolites mais aussi la modulation de sa composition. Étant donné que la composition du microbiote intestinal est associée à l’homéostasie métabolique de l’hôte et au développement de plusieurs maladies, le métabolisme des PP provoque la prolifération de bactéries bénéfiques et pourrait ainsi participer à améliorer la santé métabolique de l’hôte.

Métabolites microbiens des polyphénols (post biotiques) et leurs effets bénéfiques

Comme mentionné précédemment, la majorité des PP ingérés ne sont pas directement absorbés mais subissent des modifications métaboliques par le microbiote intestinal ce qui met en exergue leurs activités prébiotiques. En effet, on estime à environ 5 -10 % le taux d’absorption des PP en comparaison à d’autres types de nutriments [45]. Ainsi, une question de plus en plus soulevée est de comprendre comment les PP peuvent induire tous les effets physiologiques bénéfiques significatifs lorsqu’ils n’ont qu’une très faible biodisponibilité. Il s’agit du “low bioavailability/high

bioactivity paradox'' [512]. Des études sur la stabilité des extraits polyphénoliques ont démontré que les bactéries du microbiote intestinal peuvent changer les profils en PP des extraits et peuvent donc affecter leurs fonctions physiologiques [513]. Tenant compte de ces informations, il a été supposé que la majorité des PP ingérés subissent une biotransformation intensive à travers des réactions métaboliques de phase I et II au niveau du foie et surtout dans le côlon avec la participation cruciale et efficace du microbiote intestinal [45]. Les composés phénoliques sont pour la majorité métabolisés par le microbiote intestinal donnant ainsi des métabolites; ce processus métabolique en retour affecte la composition en bactéries du microbiote intestinal [44, 514] (**Figure 12. – Figure 13. –**). Les métabolites des PP sont ainsi de plus en plus étudiés afin de déterminer leur potentiel d'action dans la prévention des MCV et des pathologies cardiométaboliques. Des bienfaits biologiques de certains métabolites issus du métabolisme des PP par le microbiote intestinal ont été démontrés et retrouvés soit similaires ou soit supérieurs aux bienfaits des PP "parents"[512]. À l'exemple des PP parents, les métabolites peuvent exercer des actions bénéfiques à un niveau local durant leur transit dans la cavité orale et dans le tractus gastro-intestinal ou au niveau systémique après leur absorption [512]. Une liste non-exhaustive des métabolites communément retrouvés suite à l'ingestion de PP spécifiques est disponible dans le **Tableau 2. –**.

Tableau 2. – Liste non-exhaustive des métabolites des PP et leurs propriétés biologiques

Polyphénols parents	Exemples	Métabolites	Bactéries impliquées dans le métabolisme	Quelques fonctions des métabolites	Références
Flavonols	Quercétine	3,4 DHPAA 3-HPAA 4-HPAA	<i>Clostridium orbiscindens</i> <i>Eubacterium oxidoreducens</i> <i>Eubacterium ramulus</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i>	Piégeage des radicaux libres d'oxygène (tous les métabolites), ↑ Glutathion S-transferase (3,4 DHPAA), ↑ NRF2-AhR (3,4 DHPAA) ↓ Cytokines pro-inflammatoires (3,4 DHPAA) ↑ Sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose (3,4 DHPAA) ↑ Fonctions des cellules β pancréatiques (3,4 DHPAA) Effets protecteurs des fonctions endothéliales (3,4 DHPAA)	[463, 515-528]
Flavones	Apigénine	Phloretine 3-HPPA 4-HPPA 4-HCA	<i>Clostridium orbiscindens</i> ,	Piégeage des radicaux libres d'oxygène (3-HPPA) ↓ Cytokines pro-inflammatoires (3-HPPA) ↑ Sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose (3-HPPA) ↑ Fonctions des cellules β pancréatiques (3-HPPA) Effets protecteurs des fonctions endothéliales (3-HPPA)	[515, 516, 519-523, 528, 529]
Flavanones	Naringénine	3,4-DHPPA 3-HPPA 4-HPPA	<i>Clostridium</i> strains <i>Eubacterium ramulus</i>	Piégeage des radicaux libres d'oxygène (3-HPPA) ↓ Cytokines pro-inflammatoires (3-HPPA; 3,4 DHPPA)	[463, 516, 519, 520, 522, 523, 530-533]

				<p>↑ Fonctions des cellules β pancréatiques (3-HPPA)</p> <p>Effets protecteurs des fonctions endothéliales (3-HPPA)</p>	
Isoflavones	Daidzéine	(S)-Équol O-DMA	<p><i>Bacteroides ovatus,</i> <i>Streptococcus intermedius,</i> <i>Ruminococcus productus,</i> <i>Eggerthella sp. Julong 732,</i> <i>Enterococcus faecium EPI1,</i> <i>Lactobacillus mucosae EPI2,</i> <i>Fingoldia magna EPI3</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>HGHA136</i></p>	<p>Stimulation des défenses antioxydantes (les 2 métabolites)</p> <p>↑ Activité enzymatique de la catalase et de la superoxyde dismutase</p> <p>Effet antiathérogène (Équol)</p>	[534-536]
Flavan-3-ols	Monomères (catéchines, epicatéchines) et proanthocyanidines	<p>3-HPPA 3,4-DHPPA 3',4'-DHPVL 3,4-DHPVA 3'-HPVL 3',4',5'-THPVL 3',5'-DHPVL</p>	<p><i>Clostridium coccooides,</i> <i>Bifidobacterium spp.</i> <i>Eggerthella lenta,</i> <i>Flavonifractor plautii</i></p>	<p>Piégeage des radicaux libres d'oxygène (3-HPPA)</p> <p>↓ Production d'espèces réactives de l'oxygène (3'-HPVL, 3',4'-DHPVL)</p> <p>↓ Synthèse de NO (3',4',5'-THPVL; 3',4'-DHPVL)</p> <p>↓ Expression de iNOS (3',4'-DHPVL)</p> <p>Maintien des fonctions et l'homéostasie endothéliales (3',4'-DHPVL):</p> <p>↓ VCAM1 et MCP1 (3',4'-DHPVL)</p> <p>↓ Pression sanguine systolique (3',4',5'-THPVL; 3',5'-DHPVL)</p>	[460, 537-549]
		Acide protocatechique		<p>Propriétés antidiabétiques dues à leur capacité antioxydantes (tous les métabolites):</p> <p>↓ Dommages à l'ADN</p>	

Anthocyanines	Cyanidine, Peonidine Pelargonidine Malvidine Delphinidine	Acide Vanillique Acide 4- hydroxybenzoïque Acide Syringique Acide gallique	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12	<p>↓ Production d'espèces réactives de l'oxygène</p> <p>↑ Taux de glutathion au niveau cellulaire</p> <p>↑ Absorption du glucose par les cellules HepG2</p> <p>↑ Synthèse du glycogène par les cellules HepG2</p> <p>↑ Homéostasie mitochondriale</p>	[550-555]
Acides hydroxycinnamiques	Acides chlorogéniques	3-HPPA 3,4-DHPPA Acide caféique	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i>	<p>Piégeage des radicaux libres d'oxygène (3-HPPA)</p> <p>↓ Cytokines pro-inflammatoires (3-HPPA; 3,4 DHPPA)</p> <p>Propriétés antidiabétiques due à sa capacité antioxydante: (acide caféique)</p>	[516, 519, 522, 523, 556, 557]
Tannins hydrolysables	Ellagitannins	Acide ellagique Urolithine A Urolithine B	<i>Butyrivibrio</i> spp.	<p>Capacité antioxydante élevée (acide ellagique, urolithine A et B)</p> <p>↓ Dommages cellulaires (acide ellagique, urolithine A et B)</p> <p>↓ Médiateurs proinflammatoires (acide ellagique et urolithine A)</p> <p> ↓ Activation de NADPH oxydase (urolithine A)</p> <p>↓ Production de PGE2 (urolithin A et B)</p> <p> ↓ Expression de mPGES-1 et COX-2 (urolithine A and B)</p> <p>↓ Glycation des protéines (urolithin A et B)</p> <p> ↓ Accumulation de triglycérides (acide ellagique et urolithine A)</p> <p> ↓ Expression de gènes et protéines adipogéniques (urolithine A)</p>	[558-570]

				↑Oxydation des AG (urolithin A)	
Lignans	Secoisolariciresinol	Entérodiolé Entérolactone	<i>Bacteroides distasonis</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Bacteroides ovatus</i> , <i>Clostridium cocleatum</i> , <i>Butyribacterium methylotrophicum</i> , <i>Eubacterium callanderi</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Peptostreptococcus productus</i> , <i>Clostridium scindens</i> , <i>Eggerthella lenta</i>	Capacité antioxydante Effets immunomodulateurs ↓Activité du NF-κB ↓Cytokines proinflammatoires	[571-574]
Stilbènes	Resveratrol	DHR 3,4'-dihydroxy-trans-stilbène 3,4'-dihydroxybibenzyl e (lunularin) Picéide	<i>Slackia equolifaciens</i> <i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	Activité antioxydante Élimination de radicaux libres (DHR) ↓Production de NO (DHR) ↓Inflammation hépatique et début de stéatose(picéide) ↑NRF2/Keap1(picéide) ↑miR200a (piceid) Amélioration du métabolisme de glucose et des lipides(picéide) ↑LDLR et GCK (picéide) ↓PCSK9 (picéide) ↓SREBP-1C, G6Pase (picéide)	[575-580]

3,4-DHPPA, acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique; **3-HPPA**, acide 3-hydroxyphénylpropionique; **4-HPPA**, acide 4-hydroxyphénylpropionique; **4-HCA**, acide 4-hydroxycinnamique; **3,4-DHPAA**, acide 3,4-dihydroxyphénylacétique; **3-HPAA**, acide hydroxyphénylacétique; **4-HPAA**, acide 4-hydroxyphénylacétique; **O-DMA**, O-demethylangolensine, **3,4-DHPVA**, acide 3,4-dihydroxyphényl-γ-valérique; **3',4',5'-THPVL**, 3',4',5'-trihydroxyphényl-γ valerolactone; **3',4'-DHPVL**, 3',4'-Dihydroxyphényl-γ-valerolactone; **3',5'-DHPVL**, 3',5'-Dihydroxyphényl-γ-valerolactone; **3'-HPVL**, 3'-hydroxyphényl-γ-valerolactone; **DHR**, Dihydroresvératrol, **NO**, Oxyde nitrique. ↑augmentation, ↓diminution.

Propriétés bénéfiques et quelques mécanismes d'actions des métabolites

Comme indiqué dans le [Tableau 2. –](#), le métabolisme des PP par le microbiote intestinal fournit plusieurs types de métabolites qui ont des propriétés bénéfiques sur la santé métabolique permettant de réduire les risques cardiovasculaires. Les études surtout *in vivo* ou cliniques d'interventions nutritionnelles s'intéressent de plus en plus à certains métabolites tels que les valérolactones, l'urolithine A, le DHR et la picéide ainsi que les acides phénoliques simples dont l'acide cafféique.

Les valérolactones et les métabolites des PACs : Les flavan-3-ols représentent une classe de PP très connue et très étudiée compte tenu de leurs panoplies d'actions biologiques. On retrouve notamment dans cette classe, les catéchines, les épicatechines, les épigallocatechines mais aussi les PACs. La bio-activité et les propriétés physiologiques des flavan-3-ols sont fortement influencées par l'état pathologique de l'hôte qui à son tour affecte le microbiote intestinal qui métabolise ces PP [581]. Ainsi un métabolisme non- efficace et -efficient des flavan-3-ols par le microbiote intestinal affecte énormément les effets bénéfiques qu'ils pourraient avoir. Ces informations confirment l'hypothèse selon laquelle les effets physiologiques bénéfiques attribués aux PP sont en partie obtenus par le biais de leurs métabolites. Leurs métabolites, les valérolactones et leurs dérivés, font parties des métabolites phénoliques microbiens les plus étudiés. Une étude a démontré que l'administration d'extraits de thé vert enrichis en catéchines aux souris sous une diète obésogène riche en gras a permis de prévenir la stéatose hépatique [582]. Cet effet bénéfique a été obtenu par la prévention de l'endotoxémie métabolique et de l'inflammation systémique ainsi qu'une diminution de l'expression de biomarqueurs spécifiques des dommages hépatiques. Cependant, l'analyse des métabolites a révélé l'absence de catéchines (PP parents) mais plutôt la présence d'environ 13 de ses métabolites dont les valérolactones dans le foie [582]. Les propriétés antiinflammatoires des catéchines et leurs effets bénéfiques dans la prévention des pathologies métaboliques pourraient donc être dépendantes de leur métabolisme de phase I et II mais également leur biotransformation au niveau du microbiote intestinal. L'administration de phényl-valérolactones à des rats ayant développé de l'hypertension a permis de baisser la pression systolique environ 2 à 4h post-administration [548]. Dans une autre étude, Rodriguez-Mateos et ses collaborateurs ont évalué l'expression de

marqueurs précoces de l'athérosclérose chez des sujets sains après l'ingestion de boissons de canneberges enrichies en PACs. Les résultats ont montré une amélioration de la vasodilatation débit-dépendante en fonction du temps atteignant un maximum 4h environ post-ingestion de la boisson [583]. De façon très intéressante, l'augmentation maximale de la vasodilatation corrèle avec la présence de valérolactones (métabolites PACs) au niveau circulant [583]. Les propriétés bénéfiques des valérolactones et de l'acide valérique au niveau de la pression sanguine sont liées à leur capacité à inhiber l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et leur capacité à diminuer la synthèse de l'oxyde nitrique par les cellules endothéliales [548, 583]. Les travaux de Van Rymenant et ses collaborateurs ont aussi démontré dans des modèles murins les effets bénéfiques vasorelaxants des valérolactones et de leurs dérivés [549].

Des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires ont été retrouvées pour ces métabolites dans des études *in vitro*. La consommation d'aliments enrichis en bleuets par des patients obèses ayant développés le SM a permis d'améliorer la réponse glycémique post-prandiale et de réduire les risques inflammatoires [584]. L'étude a rapporté une diminution du taux de méthylamines, d'acétoacétate, d'acétone et de succinate qui sont reconnus comme des biomarqueurs dans le développement du DT2 [584]. Les auteurs ont également remarqué une diminution dans l'expression de marqueurs de l'inflammation tels que la COX-2 et les cytokines pro-inflammatoires [584]. De façon très saisissante, l'analyse métabolomique a permis de remarquer une accumulation des acides p-hydroxy-phénylacétique et 3-(3'-hydroxyphenyl) -3-hydropropionique qui proviennent de la déshydrogénation microbienne intestinale des procyanidines et des PACs [584]. Cette étude démontre l'importance du métabolisme intestinal des PP dans leurs bienfaits biologiques. Ces études illustrent donc que les propriétés bénéfiques attribuées aux flavan-3-ols dans la prévention de l'hypertension et d'autres MCV et pathologies cardiométaboliques sont obtenues via leur métabolisme.

L'urolithine A et les métabolites des ellagitannins : Les variabilités interindividuelles dans le métabolisme des PP dont les ellagitannins sont très connues. En effet, tout comme le métabolisme des PACs, le métabolisme des ellagitannins est affecté par la composition du microbiote intestinal. En effet, dépendamment de la composition de leur microbiote, certains sujets métabolisent les ellagitannins en urolithine A (métabotype A, UM-A), d'autres produisent

l'uroolithine B (métabotype B, UM-B) et une dernière catégorie de personnes n'en produisent pas (métabotype 0, UM-0) [585]. Cependant d'une façon générale dans la littérature, les urolithines ont été trouvés comme de potentiels contributeurs majeurs des effets bénéfiques attribués aux ellagitannins dans la prévention des MCV. À l'instar des valérolactones, les urolithines sont des métabolites de plus en plus étudiés compte tenu des effets bénéfiques de leurs précurseurs, les ellagitannins. En effet, des taux plasmatiques élevés d'uroolithine A ont été identifiés chez des individus avec des traits moins sévères du SM (adiposité abdominale diminuée, réponse glycémique améliorée) [586]. Une corrélation a été établie entre le métabolisme des ellagitannins en urolithines A, B chez des individus en surpoids/obèses et les risques de MCV [585]. Les auteurs de l'étude proposent que les métabotypes d'uroolithines pourraient servir de biomarqueurs aux MCV. Selma et ses collaborateurs ont démontré que les risques de développer des complications cardiovasculaires chez les patients obèses varient selon leur capacité à faire un métabolisme efficace des ellagitannins. Les sujets obèses ou en surpoids producteurs d'uroolithine B sont plus à risques de développer des complications cardiovasculaires avec des taux circulants de cholestérol et de LDL-cholestérol élevés [585]. En comparaison avec le métabotype UM-B, le métabotype UM-A semble plutôt être protecteur contre les MCV. Les patients en surpoids ou obèses producteurs d'uroolithine A ont des taux de HDL-c circulants élevés [585]. Une autre étude *in vivo* a montré la capacité de l'uroolithine A à prévenir l'apoptose myocardique et à stimuler la capacité antioxydante des cardiomyocytes chez des souris soumises à une ischémie/reperfusion myocardique [568].

Plusieurs études *in vitro* ont aussi démontré les effets antioxydants, antiinflammatoires de l'uroolithine A qui est le métabolite principal des ellagitannins. Des études *in vitro* ont montré la capacité de ce métabolite à réguler la voie de signalisation du NF- κ B, à diminuer l'expression de la COX-2, des prostaglandines et des cytokines pro-inflammatoires dans différents types cellulaires. L'uroolithine A a aussi révélé des capacités à prévenir la glycation de protéines. Ce métabolite est impliqué dans des mécanismes épigénétiques via la régulation de l'expression de SIRT1 et la modulation de l'état d'acétylation des histones via l'inhibition des histones acétyltransférases.

Le DHR et la picéide : Les effets bénéfiques du resvératrol (RSV) dans la prévention de pathologies cardiométaboliques dont la RI et le DT2 sont très bien connus et documentés[587]. Le RSV est un composé phénolique très bien étudié et qui a été reconnu comme pouvant prévenir l'obésité, l'adiposité, l'accumulation du gras au niveau hépatique, l'hypertension et les dyslipidémies [588]. Cependant, certaines études *in vivo* ou cliniques d'interventions avec le RSV ne réussissent pas à démontrer les mêmes bienfaits du RSV sur la RI, le DT2 et d'autres TCM [588]. Ainsi, il est proposé que les effets bénéfiques de ce composé soient en partie obtenus par le biais de ses métabolites [588]. Une étude a montré qu'un apport de RSV à des souris obèses n'améliorait pas l'homéostasie du glucose et donc ne pouvait prévenir le développement du DT2 [589]. Néanmoins, la même étude a démontré qu'une transplantation fécale du microbiote ou l'administration de filtrat fécal stérile de souris métaboliseurs du RSV à des souris obèses permettait d'améliorer de façon plus efficace l'homéostasie du glucose. La transplantation fécale a également permis d'améliorer le profil métabolique des souris obèses tout en diminuant la réponse pro-inflammatoire et l'hypertension artérielle. Cette étude suggère donc que le métabolisme du RSV par le microbiote intestinal permettrait d'obtenir des postbiotiques (métabolites) à actions bénéfiques plus efficaces que le RSV au niveau physiologique [589]. Ainsi pour atteindre tous ses effets biologiques bénéfiques pour la santé métabolique, le RSV doit être efficacement métabolisé par le microbiote et ce sont plutôt les métabolites qualifiés de postbiotiques qui atteignent les organes métaboliques et y agissent. L'un des métabolites de RSV le plus étudié à part le DHR est la picéide [588]. Elle dispose d'une plus grande biodisponibilité et d'une plus grande capacité antioxydante que le RSV [590]. Le SIRT1, le NF- κ B et le NRF2 se retrouvent parmi ses principales cibles moléculaires[588]. Des études *in vivo* ont aussi montré la capacité de la picéide à améliorer la sensibilité à l'insuline, prévenir la stéatose et les dyslipidémies [578-580]. De plus en plus d'études soutiennent que les effets bénéfiques du RSV sont liés à son métabolisme intestinal qui en retour affecte la composition du microbiote intestinal en favorisant les bactéries à actions "positives" [588].

Les métabolites des isoflavones : La composition de microbiote intestinal affecte également l'efficacité du métabolisme et les propriétés biologiques des isoflavones. À l'exemple des ellagitannins, les métabotypes métaboliseurs des isoflavones peuvent être prédicteurs des

risques cardiovasculaires. Selon la composition du microbiote intestinal, la daidzéine peut être métabolisée en *O*-DMA ou en equol. Frankenfeld et al. ont proposé que les métabotypes de la daidzéine peuvent servir de nouveaux biomarqueurs pour prédire les risques de plusieurs maladies surtout cardiométaboliques [591]. Il a été démontré que les métabotypes producteurs de *O*-DMA étaient associés à l'obésité chez les adultes [592]. Hazim et ses collaborateurs ont quant à eux récemment démontré que les métabotypes producteurs d'equol sont plutôt associés à des effets cardiovasculaires bénéfiques [593]. Certaines études ont en effet fait la corrélation entre la production d'equol suite à une ingestion de boisson de soja (riche en isoflavones) et des risques réduits de maladies des artères coronaires. Ces effets bénéfiques sont probablement liés aux capacités antiathérogènes de ce métabolite [44, 535]. La production d'equol a été également associée à des propriétés vasculaires positives incluant une amélioration de la pression artérielle et des fonctions endothéliales [535]. Des études *in vitro* ont aussi montré les capacités antioxydantes du *O*-DMA et de l'equol via l'activation de l'expression génique et de l'activité enzymatique d'enzymes antioxydantes telles que la catalase et la superoxyde dismutase [536]. En plus de ses capacités antioxydantes, l'equol a également des propriétés antiathérogènes qui lui permettent de prévenir le développement de maladies cardiaques [535].

Les métabolites des anthocyanines : Les anthocyanines font également partie des PP les plus étudiés pour leurs propriétés antioxydantes, antiinflammatoires et surtout hypoglycémiantes et antidiabétiques. Cependant l'étude de la pharmacocinétique et des mécanismes d'actions de ces composés a permis de remarquer qu'ils ont une biodisponibilité très faible. Ainsi, ce sont plutôt leurs produits de biotransformation intestinale qui sont les plus retrouvés dans la circulation sanguine et qui pourraient effectuer les actions biologiques. Les métabolites d'anthocyanines les plus retrouvés chez l'humain sont des acides phénoliques simples incluant les acides vanillique, protocatechique et syringique, l'aldéhyde phloroglucynol. Les acides hydroxyphénylpropionique et acétique sont également identifiés comme métabolites des anthocyanines. Ces métabolites disposent de plusieurs propriétés bénéfiques. De nombreuses études *in vitro* de même qu'*in vivo* ont révélé les effets protecteurs, antioxydants et antiinflammatoires de ces métabolites. Les mécanismes d'action incluent leur capacité à piéger les radicaux libres ou encore à activer des enzymes cytoprotectrices de phase 2 telles que le glutathion *S*-transférase. Ils

peuvent également induire la translocation du NRF2 dans le noyau afin d'activer les processus de défense antioxydante et cytoprotectrice. Des études *in vitro* ont aussi révélé que ces acides phénoliques simples obtenus par le métabolisme des anthocyanines stimulent l'absorption du glucose par les myocytes et diminuent l'activité des enzymes α -glucosidase et α -amylase ce qui rentre dans les stratégies thérapeutiques anti-diabétiques [555].

Toutes ces études semblent montrer que les effets bénéfiques cardiométaboliques obtenus à partir des PP dépendent de façon très profonde de leur métabolisme microbien et de la composition du microbiote intestinal de l'hôte. En effet, comme décrit précédemment, les PP sont métabolisés par le microbiote en composés facilement absorbés et acheminés vers les tissus périphériques où ils peuvent jouer leurs rôles physiologiques. Un métabolisme efficace des PP nécessite la présence de certains types de bactéries dans le côlon. Ainsi, en fonction des bactéries du microbiote et de l'état de santé de l'hôte, les PP vont être métabolisés en certains types de métabolites qui peuvent avoir des effets bénéfiques très importants. Il est cependant nécessaire de noter qu'il y'a un manque notoire d'études d'interventions avec les métabolites de PP. La plupart des études incluant celles évoquées font plus des corrélations entre l'absence des substrats (PP parents), la présence des produits spécifiques (métabolites) et l'obtention d'effets physiologiques bénéfiques qui étaient associés aux PP parents. Néanmoins, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* démontrent des propriétés bénéfiques des métabolites et tentent d'expliquer leurs mécanismes d'actions.

Régulation de la composition et de la diversité du microbiote intestinal par les polyphénols et impact sur la santé

De plus en plus d'études associent la composition du microbiote à l'état de santé et montrent que notre alimentation est la meilleure voie pour maintenir, protéger et renforcer le microbiote.

L'obésité et le DT2 sont associés à une altération de la composition du microbiote intestinal avec des taux élevés de Firmicutes, des quantités réduites de Bacteroides et des niveaux de bactéries productrices de butyrate diminués [466, 467, 594-596]. À la suite de l'administration de vancomycine à des patients atteints du SM, il a été remarqué une réduction de l'abondance de bactéries productrices de butyrate et une diminution de la sensibilité à l'insuline [597].

Cependant, la transplantation de patients insulino-résistants et atteints du SM avec un microbiote fécal provenant de donneurs sains a montré que les matières fécales de sujets sains amélioraient la sensibilité à l'insuline associée à un nombre accru de bactéries productrices de butyrate[598]. Ces données suggèrent donc que l'ajout de probiotiques ou de nutraceutiques de type prébiotique à un médicament standard pourrait offrir des avantages chez les patients souffrant de maladies métaboliques ou d'autres maladies associées à une altération de la composition du microbiote intestinal, à condition que le type et la quantité d'espèces microbiennes intestinales puissent être influencés par les nutriments qui y sont métabolisés.

De nombreuses études ont prouvé l'effet modulateur de la PP sur la composition du microbiote [599-601]. Les PP et leurs métabolites, selon leur structure et leur voie métabolique, peuvent remodeler la composition du microbiote intestinal en favorisant certaines espèces de bactéries (bactéries probiotiques généralement bénéfiques) et en inhibant les bactéries potentiellement pathogènes. Cette action majeure des PP et des métabolites pourrait avoir des applications thérapeutiques et de nombreuses études ont démontré la modulation du microbiote intestinal par les PP[602]. Cet effet prébiotique a été démontré dans plusieurs essais *in vitro*, précliniques et cliniques.

Les niveaux de la bactérie *Akkermansia muciniphila* ont été augmentés par l'administration d'extraits riches en PP comme par exemple l'extrait de canneberge riche en PACs [603], l'extrait de raisin [604], l'extrait de grenade riche en ellagitanins [605] et d'autres produits riches en PP [606-608]. L'enrichissement du microbiote en *Akkermansia* s'est avéré bénéfique contre l'obésité, le DT2 ainsi que l'inflammation intestinale et cette bactérie a été récemment proposée comme un biomarqueur de la santé intestinale et métabolique [44]. L'ingestion d'aliments riches en dihydro-flavonols a permis d'augmenter la présence de *Faecalibacterium prausnitzii* ainsi que les niveaux intestinaux d'autres bactéries productrices de butyrate telles que *Roseburia*, *Lactobacilli* et *bifidobactéria* [342, 609]. Il a été démontré par ailleurs que les composés phénoliques du thé et leurs métabolites inhibent de manière significative la croissance de certaines bactéries pathogènes comme *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* qui sont des firmicutes [610, 611]. De plus, les niveaux de *Clostridium spp* ont été significativement diminués par les PP de vin rouge contrairement aux *Lactobacillus spp.* qui elles, ont été augmentées [612].

En ajout à ces travaux, Massot-Cladera et ses collaborateurs ont montré une diminution importante du niveau des genres *Clostridium* et *Staphylococcus* dans les fèces de rats lorsqu'ils ont été nourris avec une diète enrichie en cacao [613]. Les PP peuvent réguler la composition du microbiote en stimulant la croissance des Bactéroïdes et en inhibant celle des Firmicutes (**Figure 13. –**) et par conséquent influencent la balance Bactéroïdes/Firmicutes [459]. Cette balance est reconnue pour être diminuée dans certaines pathologies. La modulation du rapport Bactéroïdes/Firmicutes par les PP s'explique par la composition enzymatique et la capacité des deux groupes de bactéries; selon Rastmanesh [614], les Firmicutes ont un taux disproportionnellement plus faible d'enzymes dégradant les glycanes contrairement aux Bactéroïdètes. Par conséquent, les Bactéroïdètes sont plus aptes à participer au métabolisme des PP en raison de leur capacité de dégradation.

Le **Tableau 3. –** résume quelques études d'intervention cliniques sur les effets des PP dans la composition du microbiote.

Tableau 3. – *Quelques études d'intervention montrant les effets prébiotiques des polyphénols*

Sources des PP	Étude	Résultats	Références
Boisson au cacao (494 mg de flavanols de cacao/jour durant 4 semaines)	Sujets volontaires en bonne santé (n = 22, 12 hommes et 10 femmes)	<i>Bacteroides spp.</i> (ns), <i>E. coli</i> (ns), <i>Lactobacillus</i> (+), <i>Enterococcus spp.</i> (+), <i>Bifidobacterium spp</i> (+), <i>E. rectale-C. coccoides</i> group (+), <i>C. histolyticum</i> (-)	[615]
Jus concentré de cerises acidulées (8 oz -5 jours)	Sujets volontaires (n=9)	<i>Bacteroidetes</i> (+) <i>Ruminococcus</i> (+) <i>Parabacteroides</i> (+) <i>Alistipes</i> (+) <i>Prevotella</i> (+) <i>Lachnospiraceae</i> (-) <i>Streptococcus</i> (-) <i>Dialister</i> (-) <i>Clostridium IV and XI</i> (+) <i>Subdoligranulum</i> (+) <i>Lactobacillus</i> (+) <i>Bifidobacterium</i> (+) <i>Collinsella</i> (-) <i>Assacharobacter</i> (-) <i>Barnesiella</i> (-) <i>Butyricimonas</i> (-) <i>Prevotellaceae</i> (-) <i>Faecalibacterium</i> (-)	[616]
Vin rouge (272 mL/jour-20 jours) / Vin rouge sans alcool (272 mL/jour-20 jours) /	Hommes adultes en bonne santé (n=9)	<i>Bifidobacterium</i> (+), <i>Enterococcus</i> (+), <i>Eggerthella lenta</i> (+)	[617]

Gin (100 mL/jour-20 jours)			
Extrait de grenade (1000 mg - 4 semaines)	Sujets volontaires en bonne santé (n=20)	<i>Firmicutes</i> (-), <i>Collinsella</i> (-), <i>Actinobacteria</i> (+), <i>A. muciniphila</i> (+), <i>Butyrivibrio</i> (+), <i>Enterobacter</i> (+), <i>Lactobacillus</i> (+), <i>Prevotella</i> (+), <i>Serratia</i> (+), <i>Veillonella</i> (+)	[605]
Vin rouge (272 mL/jour-20 jours) / Vin rouge sans alcool (272 mL/jour-20 jours) / Gin (100 mL/jour-20 jours)	Hommes adultes en bonne santé (n=10)	<i>Enterococcus</i> (+), <i>Prevotella</i> (+), <i>Bacteroides</i> (+), <i>B. uniformis</i> (+), <i>Bifidobacterium</i> (+), <i>Eggerthella lenta</i> (+), <i>Blautia coccoides-E. rectale groups</i> (+)	[618]

(+) : modulation à la hausse, (-) : modulation à la baisse, ns : pas d'effets significatifs observés dans la présence des bactéries

L'intestin : un organe clé dont la défaillance contribue à la perte générale de l'homéostasie métabolique

Structure et fonctions de l'intestin

L'intestin est l'un des organes les plus importants de l'organisme et il comprend l'intestin grêle et le gros intestin et s'étend du pylore à l'anus [619]. L'intestin grêle est divisé en trois segments distincts notamment le duodénum, le jéjunum et l'iléon, alors que le gros intestin est constitué du cæcum, du côlon et du rectum. Dans leur structure et organisation, l'intestin grêle et le côlon disposent de quatre couches concentriques dont la muqueuse intestinale, la sous-muqueuse, la musculuse et l'adventice ou séreuse disposées respectivement de la lumière intestinale vers les parties les plus profondes [619] (Figure 14. –).

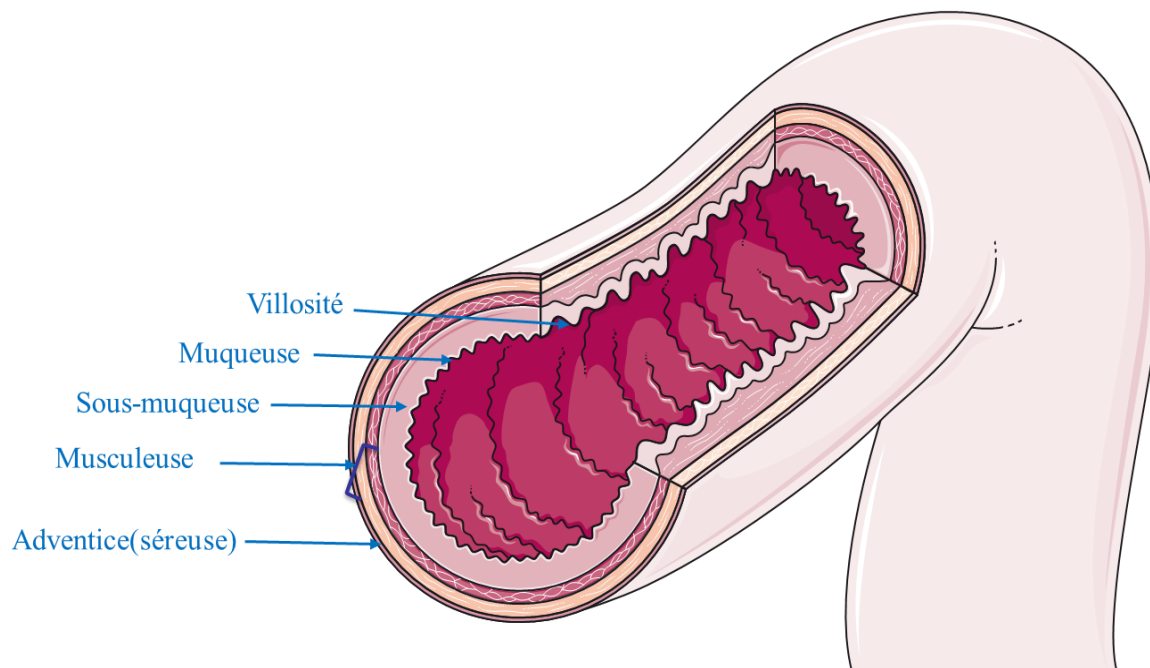


Figure 14. – Structure de l'intestin grêle (tirée de Servier medical art)

L'intestin grêle présentant la villosité et les quatre couches concentriques dont la muqueuse intestinale, la sous-muqueuse, la musculuse et l'adventice respectivement de la lumière intestinale vers les parties les plus profondes. Servier medical art est une ressource en ligne d'illustrations dans un contexte scientifique/médical et libre d'utilisation ([SMART - Servier Medical ART](#)).

La muqueuse intestinale : Elle est constituée d'une couche interne qui est l'épithélium intestinal, en contact avec la lumière, reposant sur la lamina propria ou le chorion riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques (**Figure 15. – Figure 16. –**), le tout rattaché à la musculaire-muqueuse (muscularis mucosae) constituée de fibres musculaires lisses. Du côté de la lumière intestinale, on peut remarquer la présence de villosités qui sont des replis formés par la muqueuse intestinale (**Figure 15. – Figure 16. –**), alors que du côté de la couche musculaire sont retrouvées des invaginations qui sont des glandes exocrines tubuleuses de l'épithélium encore appelées cryptes de Lieberkühn.

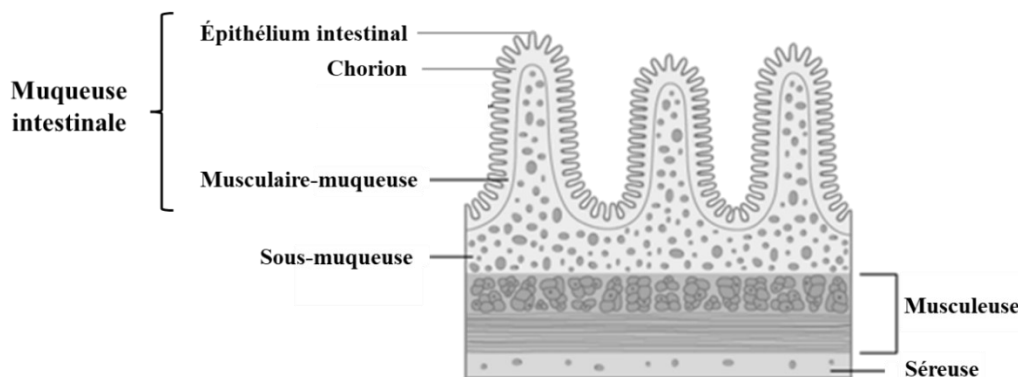


Figure 15. – Structure de la muqueuse intestinale

Structure de la muqueuse intestinale avec l'épithélium intestinal, le chorion et la musculaire-muqueuse, le tout reposant sur la musculature. L'image a été tirée de [620] et a été adaptée.

Il est très important de noter que contrairement à l'intestin grêle qui présente des villosités (plus longues dans le jéjunum et un peu plus courtes dans l'iléon), le côlon lui n'en présente pas et s'organise uniquement en cryptes. De plus, les cellules caliciformes sont plus abondantes dans le côlon en comparaison à l'intestin grêle et la couche de mucus, plus importante et la perméabilité paracellulaire y est plus faible.

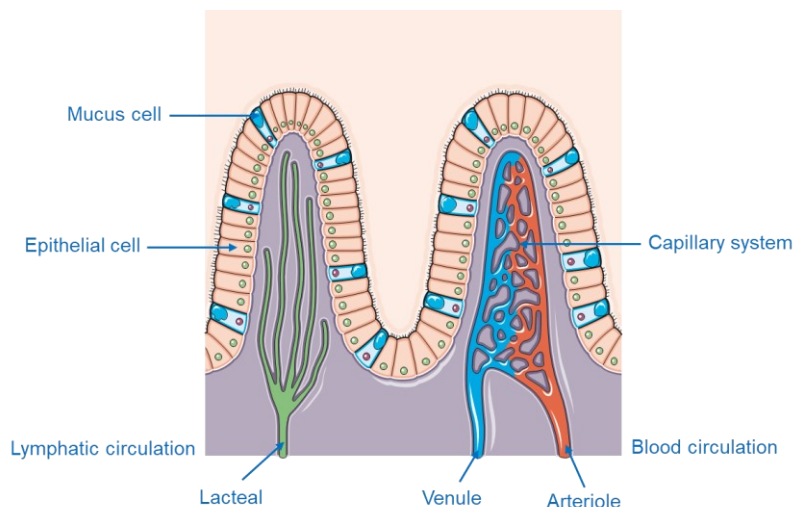


Figure 16. – Anatomie de l’intestin grêle présentant la villosité (tirée de Servier medical art)

Structure de la villosité intestinale riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques avec les différents types cellulaires qui peuvent la recouvrir. Servier medical art est une ressource en ligne d’illustrations dans un contexte scientifique/médical et libre d’utilisation ([SMART - Servier Medical ART](#)).

Des cellules différenciées et donc polarisées présentant ainsi un pôle apical et un autre basolatéral, recouvrent les villosités (**Figure 17. –**). Parmi ces cellules, on peut retrouver :

Les entérocytes : Ce sont des cellules épithéliales plus ou moins cylindriques à renouvellement rapides et reliées par des jonctions serrées formant ainsi une barrière semi-perméable assez étanche et assurant la fonction d’absorption de l’intestin [619]. Elles représentent plus de 80 % des cellules intestinales et sont caractérisées par la présence de nombreuses microvillosités de taille égale au niveau de leur pôle apical (bordure en brosse) [619]. Les fonctions des entérocytes incluent donc l’absorption d’eau, de minéraux et nutriments ainsi que la protection contre les agents pathogènes.

Les cellules caliciformes : Elles sont encore appelées cellules à mucus ou cellules de gobelet dont la fonction principale est la production du mucus qui va recouvrir la surface de l’épithélium. Le mucus (mucopolysaccharides) étant une substance qui se compose essentiellement de mucines, de glycoprotéines et de glucides et qui est indispensable à la protection de la muqueuse contre les microbes et contre des produits bactériens. Le mucus se charge aussi de la lubrification des parois afin de faciliter l’élimination des fèces et d’assurer l’adhérence de la flore intestinale [621,

622]. Une modification qualitative et quantitative des mucines et du mucus peut affecter l'intégrité de la barrière physique de l'épithélium augmentant ainsi la perméabilité intestinale et déclenchant une réponse immunitaire pouvant générer une inflammation intestinale. Plusieurs nutriments à effets prébiotiques et des probiotiques sont utilisés afin d'améliorer la production et la sécrétion de mucus. La proportion relative des cellules de gobelet augmente progressivement le long de l'intestin grêle.

Les cellules entéro-endocrines : Ce sont des cellules spécialisées avec des fonctions endocriniennes qui peuvent être regroupées ou dispersées parmi les autres cellules. Ces cellules représentent environ 1 % des cellules épithéliales de la muqueuse [623] et l'épithélium gastro-intestinal en compte au moins dix types. La présence de ces cellules dans le revêtement du tube digestif a fait de l'épithélium gastro-intestinal le principal organe endocrinien. Durant la période post-prandiale, chaque type de cellules endocrines (K, L, I, G, S, delta par exemple) sécrète une hormone ou un peptide différent dont la cholecystokinine [624], la ghréline [625-627], la sécrétine [628], le GLP-1 [629, 630], PYY [631], qui passe dans la circulation sanguine et régule la digestion. Ces hormones peuvent par exemple entraîner un effet de satiété, déclencher la vidange gastrique ou stimuler la sécrétion d'insuline par le pancréas. Le rôle de ces cellules est donc très important aussi bien au niveau du tractus gastro-intestinal mais aussi au niveau d'autres organes périphériques où elles régulent de nombreux processus métaboliques. Outre leur fonction endocrinienne, les cellules entéroendocrines sont capables de détecter les métabolites du microbiote intestinal et, à leur tour, coordonnent les actions antibactériennes et métaboliques de la réponse immunitaire innée intestinale de l'hôte au microbiote [623].

Les cellules M (cellules Microfolds) : Il s'agit de cellules épithéliales spécialisées appartenant au système immunitaire. Elles peuvent après endocytose transférer les pathogènes et antigènes présents dans la lumière de l'intestin vers le tissu lymphoïde sous-épithélial et ainsi, induire une réponse immunitaire [632].

Comme décrit précédemment, la muqueuse intestinale forme des invaginations du côté de la couche musculaire appelées cryptes. On retrouve à cet endroit plusieurs types cellulaires tels que celles citées précédemment et retrouvées le long des villosités (les entérocytes, les cellules

caliciformes, les cellules entéro-endocrines) (Figure 17. –). Néanmoins, le fond des cryptes est généralement tapissé de cellules de Paneth qui sont des cellules séreuses, volumineuses et pyramidales avec des fonctions de défenses vis-à-vis des pathogènes par le biais de la production de défensines, du lysozyme et d'agents anti-microbiens [633-635]. On retrouve également au fond des cryptes des cellules souches capables de se diviser, de se différencier et de migrer le long des villosités assurant une homéostasie intestinale et un renouvellement permanent de l'épithélium intestinal [633-635](Figure 17. –).

Toutes ces cellules épithéliales reposent sur la lame basale composée de glycoprotéines, de nidogène et de protéoglycanes [636].

On retrouve également d'autres types cellulaires tels que les cellules immunitaires entre autres les lymphocytes T, les plasmocytes, les cellules dendritiques et les macrophages ainsi que des lymphocytes et macrophages intra-épithéliaux entre la lame basale de l'épithélium intestinal et la musculaire-muqueuse (Figure 17. –). S'ajoutent à ces cellules dispersées, des regroupements de follicules lymphoïdes formant des structures nommées des plaques de Peyer (Figure 17. –), essentiellement situées dans la dernière partie de l'intestin grêle et plus précisément au niveau de l'iléon. Elles appartiennent au tissu lymphoïde associé à l'intestin nommé GALT (*gut associated lymphoid tissue*) et interviennent dans les réponses immunitaires et dans la protection face aux agents pathogènes [637-639]. C'est au niveau de l'épithélium de ces plaques de Peyer que se situent les cellules M précédemment décrites.

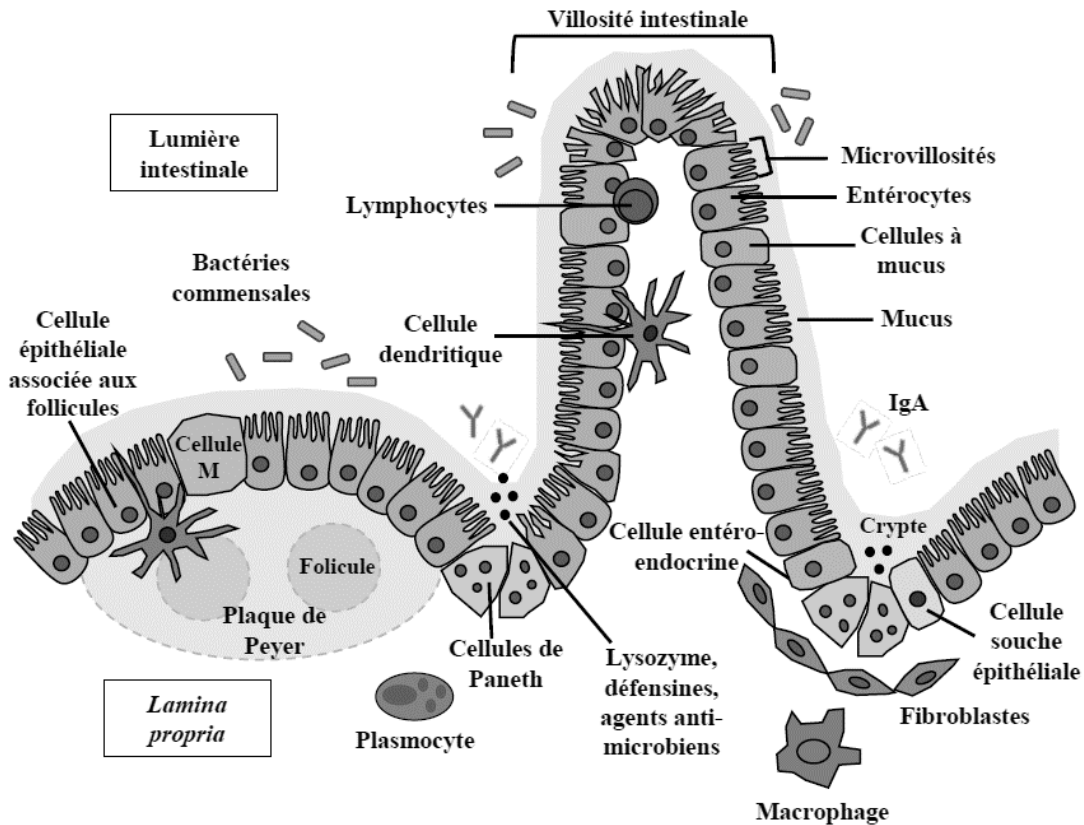


Figure 17. – Anatomie de l'intestin grêle présentant la villosité, les différentes cellules qui y sont présentes et d'autres micro-organismes (adaptée de Abreu et al, 2010) [640]

Plusieurs types cellulaires (les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules entéro-endocrines) peuvent être observés le long des villosités intestinales et le fond des cryptes est tapissé de cellules de Paneth. Des cellules immunitaires telles que les lymphocytes T, les plasmocytes, les cellules dendritiques et les macrophages ainsi que des lymphocytes et macrophages intra-épithéliaux entre la lame basale de l'épithélium intestinal et la musculaire-muqueuse sont également présentes au niveau des villosités. En ajout à ces différentes cellules, on va retrouver aussi des plaques de Peyer.

De par sa structure et les types cellulaires qui le constituent, l'intestin a donc de nombreuses fonctions permettant de maintenir l'homéostasie métabolique de l'organisme allant de la digestion/absorption de nutriments, la régulation du bilan hydrique, la production d'hormones et de messagers à la protection contre les agents pathogènes.

En résumé, l'intestin joue un rôle primordial dans le métabolisme, l'absorption, la sécrétion et le transport de métabolites et de nutriments [25-28] et, par la sécrétion de peptides et de

métabolites, intervient dans la régulation de plusieurs fonctions clés telles que le métabolisme énergétique, l'homéostasie du glucose et des lipides [25-28]. La barrière épithéliale intestinale reconnue comme très étanche intervient dans la protection de l'organisme contre des endotoxines métaboliques et contre des agents pathogènes [25-28]. Outre le mucus et les effecteurs cellulaires cités précédemment, la formation de jonctions (jonctions serrées, jonctions d'ancrages et jonctions communicantes) entre les cellules épithéliales est très importante dans le maintien de l'étanchéité de la barrière intestinale. Les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires telles que l'occludine, les claudines, et les protéines JAM (*junctional adhesion molecule*), mais aussi de protéines d'échafaudage ou de pontage (*zonula occludens* : ZO-1, ZO-2 et ZO-3) situées dans le cytoplasme des cellules [641]. La cohésion de l'épithélium intestinal quant à elle est assurée par les jonctions d'ancrage constituées par les jonctions adhérentes et les desmosomes [642].

Le maintien et l'efficacité de cette fonction barrière de l'intestin est très important dans la prévention de plusieurs pathologies. Ainsi, il a été remarqué une altération dans l'organisation des jonctions serrées entraînant une hyperperméabilité intestinale en cas de maladies à caractère inflammatoires[643-649]. L'hyperperméabilité intestinale favorise le passage d'endotoxines et d'éléments pathogènes de l'intestin vers la circulation puis vers des organes périphériques tels que le foie et dans l'autre sens, les éléments pathogènes et autres stimuli peuvent passer facilement du foie ou d'autres organes périphériques vers l'intestin (**Figure 18. –**).

Outre la présence de cellules intestinales avec plusieurs fonctions physiologiques, l'intestin regorge également des milliards de bactéries formant le microbiote ou la flore intestinale et ces bactéries influencent/participent les/aux fonctions intestinales. Comme décrit précédemment, le microbiote intestinal de par sa composition et sa richesse influence et régule de façon profonde la santé intestinale et métabolique par le biais de la production de métabolites et autres produits microbiens. Une dysbiose bactérienne associée à une perte de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale contribue à l'installation de plusieurs maladies. Par ailleurs, l'étude de nouvelles modalités d'interactions entre le microbiote, la membrane intestinale et le système immunitaire suggère qu'un déséquilibre du microbiote intestinal contribuerait à promouvoir l'endotoxémie

métabolique et l'inflammation chronique qui est une étape importante dans la pathogenèse des maladies métaboliques [29].

Le fonctionnement de plusieurs organes périphériques dont le foie [30], le métabolisme entéro-endocrinien [31], les métabolismes lipidique et énergétique [32], le risque cardio-vasculaire [33] sont donc affectés par les fonctions intestinales et le microbiote intestinal. Par conséquent, une défaillance dans les fonctions intestinales favorise le développement de plusieurs anomalies métaboliques dans l'organisme.

L'axe intestin - foie

L'intestin interagit avec le reste de l'organisme et plusieurs de ces interactions sont de plus en plus étudiées afin de comprendre les mécanismes qui sous-tendent la pathogenèse de plusieurs maladies et afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs à cibler dans les traitements thérapeutiques de ces maladies. On peut citer par exemple les interactions intestin-cerveau (gut-brain axis) ou encore les interactions intestin-foie (gut-liver axis).

L'axe intestin-foie est un concept faisant référence à la relation bidirectionnelle et fonctionnelle entre l'intestin, sa flore et le foie, résultant de l'intégration des signaux générés par des facteurs nutritionnels, génétiques et environnementaux [650, 651]. Ledit concept a été évoqué pour la première fois en 1987, et depuis, plusieurs études ont montré l'implication de cet axe dans le maintien de la santé gastro-intestinale et dans la pathogenèse de beaucoup de maladies hépatiques [650-654]. En effet, les nutriments, les métabolites et antigènes microbiens de même que les BA peuvent réguler l'homéostasie métabolique et affecter la réponse immunitaire au niveau intestinal et hépatique [650, 651]. Les nutriments, les produits métaboliques intestinaux et bactériens sont acheminés directement au foie via la voie vasculaire de la veine porte et inversement, le foie, par les sécrétions biliaires, influence l'intestin et ses fonctions (**Figure 18. –**).

Le foie, à cause de la circulation portale, demeure le premier organe qui rentre en contact avec les produits et métabolites ou autres composés ayant traversés la barrière intestinale, qu'il s'agisse de produits bénéfiques ou de composés nocifs. Par ailleurs, le foie pourrait agir comme un pare-feu secondaire qui contrôle les produits et métabolites provenant de l'intestin et qui va

protéger l'organisme contre les produits nocifs ayant échappés à la barrière intestinale (gardien primaire) jusqu'à une certaine portée [650, 651, 654-656]. Néanmoins, lorsqu'avec le concours d'une hyperperméabilité intestinale et d'un foie déjà dysmétabolique, un trop grand nombre de composés nocifs et d'agents pathogènes traversent la barrière intestinale, le foie devient encore plus défaillant ce qui permet une dissémination systémique des toxines et d'autres produits nocifs dans le reste de l'organisme provoquant une endotoxémie métabolique et une inflammation chronique. Des études ont déjà montré que l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale est compromise dans les conditions de pathologies hépatiques et dans plusieurs maladies métaboliques telles que l'obésité, la maladie du foie gras non-alcoolique, la RI ou encore le DT2 [643-648]. Parmi les métabolites microbiens intestinaux associés aux maladies hépatiques, on peut citer par exemple les BA secondaires, les indoles, l'alcool et le TMA [654].

Aussi, dans le sens inverse, les lésions et les maladies hépatiques telles que la MAFLD, la NAFLD et la NASH ont été associés à la colonisation bactérienne chronique et pathologique de l'intestin grêle (SIBO, *small intestinal bacterial overgrowth*) [657-659] suggérant que les sécrétions biliaires et d'autres produits provenant d'un foie métaboliquement sain contribuent à maintenir le microbiote intestinal à l'état probiotique [660, 661]. La SIBO contribue à l'inflammation hépatique et la progression de la cirrhose du foie via l'altération de la barrière épithéliale intestinale [662, 663]. Aussi, il a été montré que la stase biliaire due à l'endotoxémie métabolique participerait à altérer la composition et la diversité du microbiote gastro-intestinal et à affecter la motilité gastro-intestinale [664].

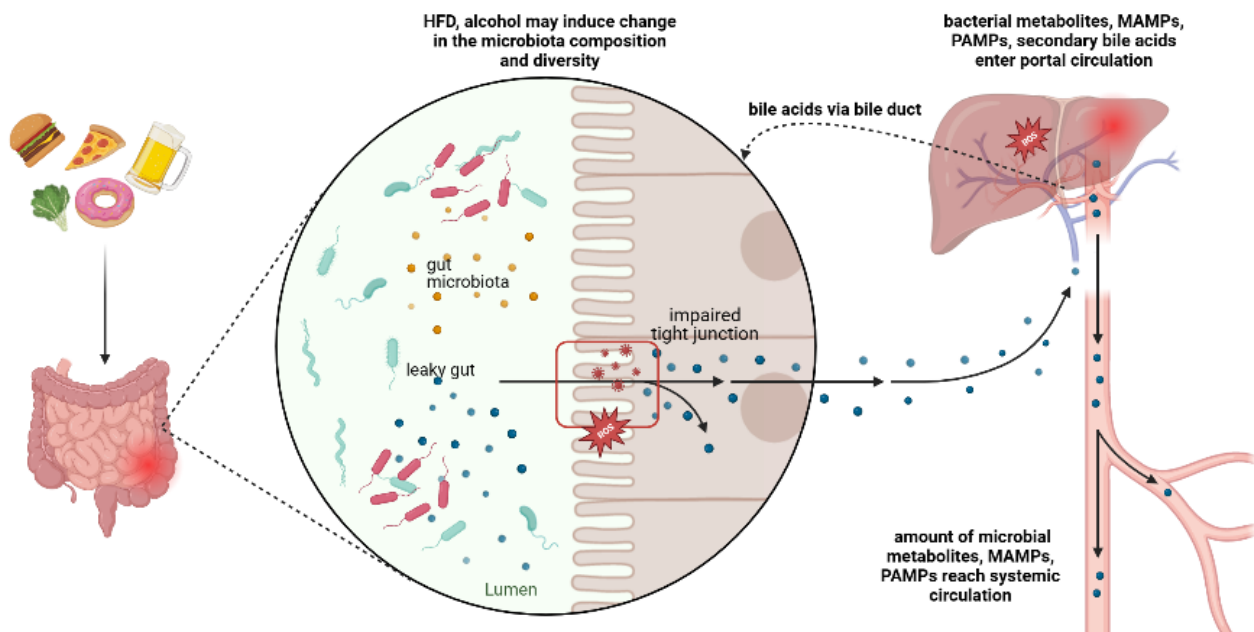


Figure 18. – Interaction anatomique et physiologique entre l'intestin et le foie : axe intestin-foie (illustrée avec BioRender.com et inspirée de Ohtani et al, 2021)[654].

Le foie et l'intestin sont liés et une altération de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale conduit à un passage en grandes quantités de composés microbiens intestinaux (motifs moléculaires associés aux microbes, MAMPs et motifs moléculaires associés aux pathogènes, PAMPs), de métabolites microbiens vers le foie. Inversement, le foie aussi par les sécrétions biliaires, peut affecter l'intestin et ses fonctions. Parmi les causes de l'hyperperméabilité intestinale, on peut retrouver l'alcoolisme et les diètes riches en gras et en fructose. Les diètes riches en gras peuvent également stimuler le métabolisme des BA au niveau hépatique conduisant à la production de BA secondaires. Ces derniers peuvent augmenter la perméabilité intestinale en agissant comme des détergents et en produisant des ROS.

Quelques modèles de cellules intestinales

De nombreux modèles cellulaires de barrière intestinale sont apparus au fil des années avec l'avancement de la recherche scientifique. Les modèles cellulaires intestinaux vont de la simple monoculture de cellules épithéliales et évoluent rapidement vers des co-cultures de plus en plus complexes et des organoïdes. Le [Tableau 4. –](#) fait un récapitulatif de quelques exemples de modèles cellulaires intestinaux.

Tableau 4. – Exemples de modèles cellulaires intestinaux

Modèles cellulaires	Avantages	Limites
Modèles de monoculture		
Cellules Caco 2 (cellules épithéliales intestinales)	<p>Modèle de barrière intestinale (adaptées pour l'étude de la perméabilité)</p> <p>Caractéristiques morphologiques et biochimiques d'entérocytes matures</p> <p>Capables de former une monocouche et sont polarisées</p> <p>Expression de protéines des jonctions serrées, d'enzymes hydrolytiques et de marqueurs de différenciation</p>	<p>Non sécrétrices (pas de production de mucus)</p> <p>Variabilité dans la perméabilité</p> <p>Conditions de culture différentes selon les laboratoires et des difficultés dans la reproductibilité des résultats</p> <p>TEER trop élevée dans des études <i>in vitro</i> par rapport à ce qui est réellement observée dans l'intestin humain</p> <p>Ne permet pas de mimer la réponse du système immunitaire inné intestinal face aux antigènes</p>
Cellules T84	<p>Modèle de barrière intestinale</p> <p>Capables de se différencier, se polariser et former des jonctions serrées</p> <p>Présentent des caractéristiques coliques lorsqu'elles se différencient avec des microvillosités plus courtes que celles des caco-2</p>	<p>Non sécrétrices (pas de production de mucus)</p> <p>Ne permettent pas de mimer la réponse du système immunitaire inné intestinal face aux antigènes</p>
Cellules HT-29	Modèle capable d'exprimer les caractéristiques des cellules intestinales matures (entérocytes ou cellules productrices de mucus)	Consomment des quantités importantes de glucose

Modèles de coculture		
Caco2 x HT29-MTX	Proche des conditions physiologiques (présence de cellules sécrétrices de mucus)	Plusieurs paramètres à prendre en compte afin d'obtenir un modèle de coculture fonctionnel et proche des conditions physiologiques (ratio caco2-HT29, temps de culture, milieu de culture) Ne miment pas tous les états physiologiques de l'intestin (homéostasie métabolique ou non)
Caco2 x cellules hépatiques (HepG2)	Miment l'axe intestin – foie (joue un rôle crucial dans le développement de la plupart de pathologies hépatiques)	Absence de cellules immunitaires (pouvant mimer un intestin sain ou inflammé) afin d'étudier les conséquences au niveau hépatique
Caco2 x cellules immunitaires (THP1 / U937)	Très courant Permettent d'avoir un modèle intestinal sain ou inflammé Monocytes se différencient en macrophages en présence de certains stimuli et sécrètent des cytokines et chimiokines Étude de changements pathophysiologiques qui ont lieu <i>in vivo</i> dans un intestin inflammé Peuvent rester en suspension Cellules compétentes pour la production de ROS (U937)	Absence de cellules productrices de mucus
Caco 2 x lymphocytes humains (cellules Raji B)	Miment l'épithélium associé au follicule, constitué d'entérocytes et de cellules M, bordant la surface des plaques de Peyer	Absence de cellules productrices de mucus

	Permettent la transformation de Caco-2 en cellules M, capables de transporter différentes particules à travers l'épithélium intestinal	
Modèles de triple coculture		
Caco-2 x HT29-MTX x Raji B	Plus fonctionnelles pour l'étude de l'absorption intestinale de particules/composés/médicaments	
Cellules caco 2 x cellules dendritiques x monocytes/macrophages	Plus complexes et complets (permettant de mimer la pathophysiologie des MII) Miment la réponse du système immunitaire inné intestinal face aux antigènes	Absence de cellules productrices de mucus
Cellules épithéliales T84 x cellules de gobelets LS 174 T x cellules immunitaires THP1 et suspension bactérienne en apical	Présence de cellules sécrétrices Plus complexes et complets	
Modèles d'organoïdes		
Organoïdes intestinaux	"Mini-organes" de laboratoire Structures tissulaires en 3 dimensions Complexité cellulaire, structurelle et architecturale permettant de mimer l'intestin Fonctionnels pour l'étude et la compréhension des pathologies affectant le tube gastro-intestinal	

Chapitre 3 – Problématique, Hypothèse et Objectifs

Problématique

Le tractus gastro-intestinal, dont la lumière de l'intestin, est continuellement exposé à divers stimuli avec des propriétés oxydantes provenant de nutriments ingérés, du cholestérol oxydé et aussi d'un apport concomitant de fer et de vitamine C (acide ascorbique). Aussi, les microbes et les infections, l'ischémie/reperfusion, la production d'acide gastrique et l'administration d'anti-inflammatoires peuvent promouvoir la formation d'EROS [34-36]. Une production exagérée d'EROS peut causer beaucoup de dégâts au niveau des membranes cellulaires, des biomolécules de l'organisme mais aussi induire une perte de l'intégrité de la barrière intestinale conduisant à une hyperperméabilité intestinale, une inflammation et une endotoxémie métabolique. L'influx de neutrophiles et de monocytes pendant l'inflammation intestinale peut également contribuer à la production des radicaux libres via la stimulation des enzymes du métabolisme oxydatif et la production des prostaglandines et des leucotriènes. Le SOx et l'inflammation peuvent compromettre les fonctions nerveuses, endocriniennes, digestives et immunitaires de l'intestin. Ces deux mécanismes sont sous-jacents au développement de la RI, du DT2, des maladies du foie gras métaboliquement induites (MAFLD) ou encore d'autres pathologies métaboliques. La relation entre le SOx et l'inflammation est bien reconnue depuis plusieurs années [37-41].

Une production élevée de cytokines pro-inflammatoires au niveau du colon et de l'iléon avec une accumulation de lipides dans le tissu adipeux mésentérique ont en effet été démontré chez des souris soumises à une diète riche en gras avant même qu'elles aient développé l'obésité [665-667]. Plusieurs études ont aussi montré que le microbiote intestinal contribue au développement de désordres métaboliques. En effet, des souris gnotobiotiques ou « germ-free » sous une diète obésogène ne développent pas l'inflammation intestinale, l'obésité, la RI et les pathologies métaboliques qui sont associées [668]. Cependant, lorsque ces souris germ-free sont colonisées avec le microbiote d'autres souris obèses, elles développent rapidement des pathologies métaboliques [668].

Le SM lié à l'obésité est donc associé à une inflammation intestinale, un état pro-oxydant ainsi qu'une perte de l'homéostasie métabolique intestinale avec une dysbiose microbienne et une production élevée d'endotoxines et une hyperperméabilité intestinale. Ces deux derniers facteurs sont les causes principales de l'endotoxémie métabolique. Les toxines produites au niveau intestinale dans des conditions de désordres métaboliques peuvent être acheminées, à cause de l'hyperperméabilité intestinale, vers les autres organes périphériques dont le foie, les muscles et le tissu adipeux. Ces organes, dont les fonctions sont déjà dérégulées, se retrouvent alors avec des toxines qui contribuent aussi à aggraver leur état dysmétabolique.

Tenant compte de toutes ces informations et connaissant le rôle central de l'intestin dans le maintien de l'homéostasie métabolique générale, il est donc intéressant de cibler cet organe dans des stratégies thérapeutiques ou de prévention des TCM, du SM et des pathologies cardiométaboliques connexes.

Cependant, le tout n'est pas d'identifier les cibles thérapeutiques majeures mais de trouver également la/les molécule(s) thérapeutiques à large spectre qui pourraient atténuer les composantes du SM sans effets secondaires additionnels aux effets de la médication courante. Dans ce but, de plus en plus d'études proposent les aliments fonctionnels et les nutraceutiques dont les PP dans la prévention et/ou les traitements thérapeutiques non pharmacologique supplémentaires à la médication déjà disponible sur le marché. Néanmoins, force est de reconnaître que les résultats des effets physiologiques et bénéfiques des PP varient beaucoup d'une étude à l'autre. En effet, la qualité nutritionnelle, l'absorption, la biodisponibilité et donc le potentiel thérapeutique des PP varient d'une classe de PP à une autre. Ainsi, les PP ne s'équivalent pas en termes d'effets métaboliques bénéfiques. Il faut reconnaître aussi que les effets bénéfiques des PP sont influencés par la source du PP et les individus qui en consomment (variabilités inter-individuelles). Il est par conséquent nécessaire de trouver les PP qui peuvent préserver/améliorer la santé métabolique intestinale, exercer des effets bénéfiques métaboliques à large spectre sur le SM tout en réduisant les effets secondaires.

Depuis plusieurs années, en collaboration avec nos collègues de l'INAF, notre laboratoire s'intéresse aux composés phénoliques provenant de différentes sources (pommes, canneberges,

bleuets, et bien d'autres) afin d'étudier et comprendre leurs mécanismes d'action sous-jacents à leurs effets bénéfiques métaboliques et d'en évaluer leur capacité thérapeutique dans la prise en charge pathologies cardiométaboliques et intestinales. Des résultats prometteurs ont été obtenus mais on a remarqué aussi que les PP de plus grande taille moléculaire auraient une capacité d'action particulièrement différente de certains PP de petite taille et des acides phénoliques simples.

Hypothèse générale

Compte tenu de leur taille moléculaire et de leurs propriétés antioxydante et anti-inflammatoire indiscutables, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les PACs de canneberges pourraient aider à prévenir ou du moins contrer la perte d'homéostasie intestinale et métabolique qui peut s'installer en conditions de SOx et d'inflammation. Nous proposons également que ces PACs pourraient exercer des actions bénéfiques au niveau des tissus métaboliques clés dont le foie par le biais de leur métabolisme et de leur action prébiotique. Ceci contribuerait à prévenir la dysbiose intestinale et à améliorer la santé intestinale mais aussi hépatique et la santé métabolique en général. Les PACs pourraient donc cibler les composantes du SM et atténuer par conséquence sa sévérité.

Les canneberges sont des fruits très riches en composés phénoliques dont les tannins, les acides phénoliques et les flavonoïdes qui sont présents majoritairement (anthocyanines, flavonols et surtout les PACs) [363]. Les fruits de la canneberge se distinguent de la plupart des aliments et autres fruits de type baies en ce qu'ils disposent d'un puissant pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire et qu'ils sont riches en PACs de type A connus pour leurs effets bénéfiques pour la santé [368]. En raison de leur composition et de leur richesse en antioxydants et composés phénoliques, les canneberges ont été reconnues comme nutriments disposant de propriétés bénéfiques pour la santé. Aussi, il s'agit de fruits très cultivés au Canada et qui font déjà partie des habitudes alimentaires de la population. Ainsi, pour ces raisons, nous avons décidé de faire nos études avec les PACs de canneberges afin de contribuer à comprendre les mécanismes d'actions de ces composés.

Objectifs de l'étude

L'objectif central de ce programme de recherche est de démontrer rigoureusement les effets bénéfiques des PACs dans le maintien de l'homéostasie métabolique intestinale et hépatique et d'en étudier les mécanismes d'actions. Les effets des PACs sur la RI, les dyslipidémies, et les dérèglements intestinaux ont été étudiés. De façon plus spécifique, ce projet a pour objectifs :

1) de définir la capacité des PACs à réduire les défauts métaboliques induits par le traitement d'un complexe pro-oxydant au niveau intestinal ;

2) de définir la capacité des PACs à réduire les défauts métaboliques induits par l'administration d'une diète riche en lipides et en sucre ;

3) d'examiner si ces effets sont associés à la neutralisation du SO_x, l'atténuation de l'inflammation, la maîtrise de l'endotoxémie ou l'amélioration de l'intégrité de la barrière intestinale ;

4) d'examiner au travers d'une revue de littérature les différents mécanismes d'action des PP et d'évaluer l'éventualité d'une action prébiotique qui gouverne toutes les fonctions biologiques reconnues des PP ;

5) de comprendre les mécanismes d'action et d'étudier les propriétés bénéfiques d'un des métabolites (post biotiques), DHPVL, issus du métabolisme des PACs par le microbiote intestinal, dans la prévention des dérèglements métaboliques.

Chapitre 4 – Méthodologie

Trois principaux volets expérimentaux ont été considérés pour mon projet doctoral.

Caractérisation des polyphénols et étude cellulaire

Dans un premier volet expérimental, nous avons étudié les mécanismes d'actions des PP de grande taille moléculaire dont les PACs dans la prévention des dérèglements métaboliques et dans l'homéostasie intestinale. Notre choix s'est porté sur les PACs car ce sont des composés phénoliques qui sont très faiblement absorbés dans leurs formes natives mais sont essentiellement métabolisés au niveau du colon. Par conséquent, ils peuvent exercer des actions bénéfiques au travers du tractus gastro-intestinal et peuvent modifier la composition et la diversité du microbiote intestinal. Aussi, peu d'études se sont intéressées à cette classe de PP compte tenu de leur faible taux d'absorption et du fait que leurs modes d'actions sont moins bien connus. Il est également très important de souligner que dans la littérature, les études ont été effectuées avec des extraits de PP qui sont des mélanges de plusieurs PP, ce qui ne permet pas forcément d'identifier clairement les types de PP ayant les meilleurs effets bénéfiques. Il faut ainsi souligner que l'utilisation de mélanges ou d'extraits ne permet pas de confirmer ou de discriminer la possibilité que les effets bénéfiques des PP soient dus à des actions synergiques entre plusieurs composés phénoliques d'un même extrait. Nous avons décidé dans un premier temps de caractériser les PP de la canneberge, de choisir la classe de PP qui nous intéresse et, par la suite, de définir leur métabolisme intracellulaire intestinal, d'examiner leur caractère antioxydant et anti-inflammatoire, et d'élucider les mécanismes d'action.

L'extraction des PP à partir de canneberge, effectuée par nos collaborateurs de l'INAF, a permis d'obtenir plusieurs fractions phénoliques dont les profils ont été caractérisés par UPLC-MS/MS Q-TOF. Nous avons choisi les fractions très enrichies en PACs pour nos études.

Les effets des PACs dans le maintien de l'homéostasie intestinale ont été investigués en utilisant la lignée cellulaire Caco-2/15 d'origine intestinale. Ces cellules épithéliales intestinales sont dérivées d'un adénocarcinome colorectal et sont capables d'acquérir l'ensemble des caractéristiques physiologiques de l'intestin grêle humain suite à leurs différenciation [669]. Pour

nos expériences, elles sont cultivées sur filtre durant 10 jours, ce qui permet leur polarisation apicale et leur différenciation spontanée, simultanément à la formation de jonctions serrées permettant de constituer une barrière hermétique entre le compartiment apical (lumière intestinale) et le compartiment basolatéral (circulation sanguine) mimant les caractéristiques de l'intestin humain (**Figure 19. – Figure 19. –**). L'utilisation du modèle cellulaire a permis d'isoler et spécifier l'action des PACs au niveau intestinal sans l'effet des autres organes.

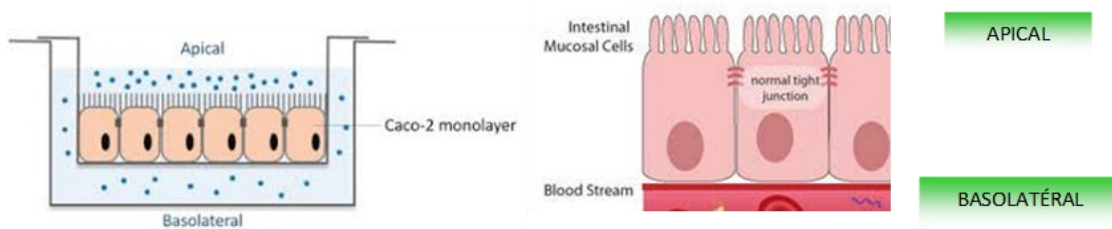


Figure 19. – Modèle cellulaire et expérimental. Schéma illustrant la monocouche formée par les cellules Caco 2 lorsqu'elles sont différenciées avec le milieu apical et celui basolatéral (Illustration inspirée de Tor Lea et al., 2015 et réalisée avec le logiciel powerpoint) [670].

Les cellules intestinales Caco-2/15 ont donc été incubées avec le cocktail fer-sulfate et acide ascorbique (Fe/Asc; 0.2mM/2mM) durant 6 heures, avec ou sans PACs en traitement préventif. Les taux de malondialdéhyde (MDA), un marqueur de la peroxydation lipidique, ont été quantifiés par HPLC pour apprécier le SOx. La force antioxydante a été estimée en dosant l'expression protéique du facteur de transcription NRF2 et celles du superoxyde dismutase 2 (SOD2) et du glutathion peroxydase (GPx), deux enzymes antioxydantes. Le processus inflammatoire a été sondé en dosant par immunobuvardage l'expression protéique du facteur nécrotique tumorale (TNF α) et celle de la cyclooxygénase-2 (COX-2), ainsi que l'expression du facteur nucléaire kappa-light-chain-activateur de cellules B activées (NF- κ B) dont le rôle est de transcrire plusieurs gènes pro-inflammatoires. L'inflammation et le SOx étant des mécanismes majeurs dans le développement et dans la progression de divers désordres métaboliques, nous avons voulu déterminer l'expression de divers marqueurs impliqués dans plusieurs grandes fonctions cellulaires métaboliques. La sensibilité à l'insuline a donc été estimée en dosant l'expression protéique de marqueurs spécifiques dont le P38/pP38, celles de la sérine/thréonine protéine kinase spécifique (AKT/pAKT) et de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K/pPi3k) suite au

traitement des cellules avec l'insuline. La lipogenèse et la β -oxydation ont été également sondées en dosant par immunobuvardage les marqueurs tels que la carnitine palmitoyl transférase 1 alpha (CPT1 α), le coactivateur 1 du récepteur au facteur activé de prolifération des peroxysomes (PGC1 α), le récepteur alpha au facteur activé de prolifération des peroxysomes (PPAR α), l'acide gras synthase (FAS), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC/pACC), la protéine-1 de liaison à l'élément de régulation des stérols (SREBP1C) et le récepteur gamma au facteur activé de prolifération des peroxysomes (PPAR γ). Sachant qu'une perte d'homéostasie lipidique et altération de la sensibilité à l'insuline peuvent affecter plusieurs fonctions métaboliques dont l'homéostasie du glucose, nous avons mesuré la néoglucogenèse en dosant l'expression protéique du glucose-6-phosphatase (G6P) et de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK).

Les données de cette première partie se retrouvent dans le premier article présenté dans la section Résultats.

Étude dans un modèle murin

Le deuxième volet expérimental de mon programme scientifique a évalué dans un modèle murin les aspects préventifs et thérapeutiques des PACs en spécifiant leurs bénéfices cliniques et voies mécanistiques dans des organes métaboliques clés surtout dans l'axe intestin-foie. Étant donné que l'équilibre homéostatique dépend également de l'interaction entre les différents organes, nous avons utilisé le modèle murin pour approfondir les connaissances quant aux mécanismes d'actions des PACs. Avec ce modèle nous avons pu définir l'impact des PACs sur les dérèglements métaboliques au niveau hépatique.

Le modèle dysmétabolique de souris C57BL6 soumises à une diète HFHS, bien établi dans notre laboratoire [671], a servi à produire le SM chez ces animaux et des complications cardiométaboliques afin d'examiner l'action des PACs. La diète HFHS qui est très obésogène, est très enrichie en sucres simples et en gras saturé et ne contient pas de fibres. L'interaction entre une diète obésogène riche en gras, en sucre et faible en fibres hydrosolubles (*i.e.* diète occidentale) et le microbiote intestinal contribue au développement du SOx et de l'inflammation chronique, des mécanisme sous-jacents à la RI, qui se trouve au cœur du SM. Les souris ont été maintenues sur la diète normale (Chow) ou sur la diète HFHS avec ou sans PACs (200 mg/kg/j),

administré par gavage durant 12 semaines. Les animaux ont été séparés en 3 groupes dont le Chow, le HFHS et le HFHS + PACs.

Il est souvent très pertinent de renforcer les conditions expérimentales d'un projet de recherche dans le but d'obtenir une compréhension nuancée des observations et de minimiser les difficultés d'interprétation des résultats. Voici les points qui ont été prises en considération pour omettre le 4^e groupe de souris sous Chow + PACs: (i) des études pilotes ont été effectuées aussi bien dans notre laboratoire que chez nos collaborateurs de l'INAF ou dans d'autres laboratoires, et qui ont documenté que les PP n'ont pas d'effets significatifs sur les des animaux exposés à la diète Chow [672]; (ii) pour des raisons logistiques rejoignant les recommandations de déployer tous les efforts afin de ne pas augmenter, de manière peu justifiée, le nombre de souris étant donné le manque d'espace de l'animalerie au centre de recherche du CHU Sainte-Justine; (iii) également pour des raisons d'éthique, étant donné que des études précédentes n'ont pas démontré d'impact évident sur les animaux sous diète Chow gavés avec les PP; (vi) aussi, notre objectif principal dans cette étude est d'explorer les effets des PACs sur les dérèglements métaboliques induits par la diète HFHS et d'en étudier les mécanismes d'action. Ainsi, notre groupe idéal de comparaison pour étudier l'action bénéfique des PACs demeure le groupe de souris sur la diète HFHS uniquement, le groupe sur la diète normale Chow servant de référence par rapport aux dérèglements causés par la diète HFHS.

Les paramètres anthropométriques ont été évalués et le plasma et les tissus ont été aussi prélevés après les sacrifices pour des analyses supplémentaires. Les taux de MDA (HPLC) et d'isoprostanes (UPLC-MS/MS Q-Tof) ont été quantifiés au niveau plasmatique pour apprécier le SOx. Les expressions protéiques des antioxydants endogènes SOD2 et GPx ont été déterminées, pour jauger la défense antioxydante. L'inflammation est sondée en dosant (par qRT-PCR et Immunobuvardage) les marqueurs NF- κ B, IL-6 et TNF- α , ainsi que la cyclooxygénase-2 (COX2). L'endotoxémie métabolique a également été évaluée en dosant le taux de LPS au niveau circulant. La sensibilité à l'insuline a été examinée par le calcul de l'index IR-HOMA au niveau circulant et par les marqueurs de signalisation (Akt, PI3K, p38 MAPK) dans le foie. La synthèse du glucose de novo a également été vérifiée en mesurant l'expression de marqueurs spécifiques (G6P, PEPCK, chREBP) au niveau hépatique. Les expressions protéiques des marqueurs de β -oxydation (CPT1 α ,

PGC1 α , PPAR α) et de la lipogenèse (ACC/pACC, FAS, PPAR γ , SREBP) ainsi que les transporteurs de cholestérol (SREBP, NPC1L1) ont également été déterminés. La synthèse et la sécrétion des lipides et des apolipoprotéines, ainsi que la biogenèse de leurs lipoprotéines ont aussi été déterminées selon nos techniques de laboratoire bien établies.

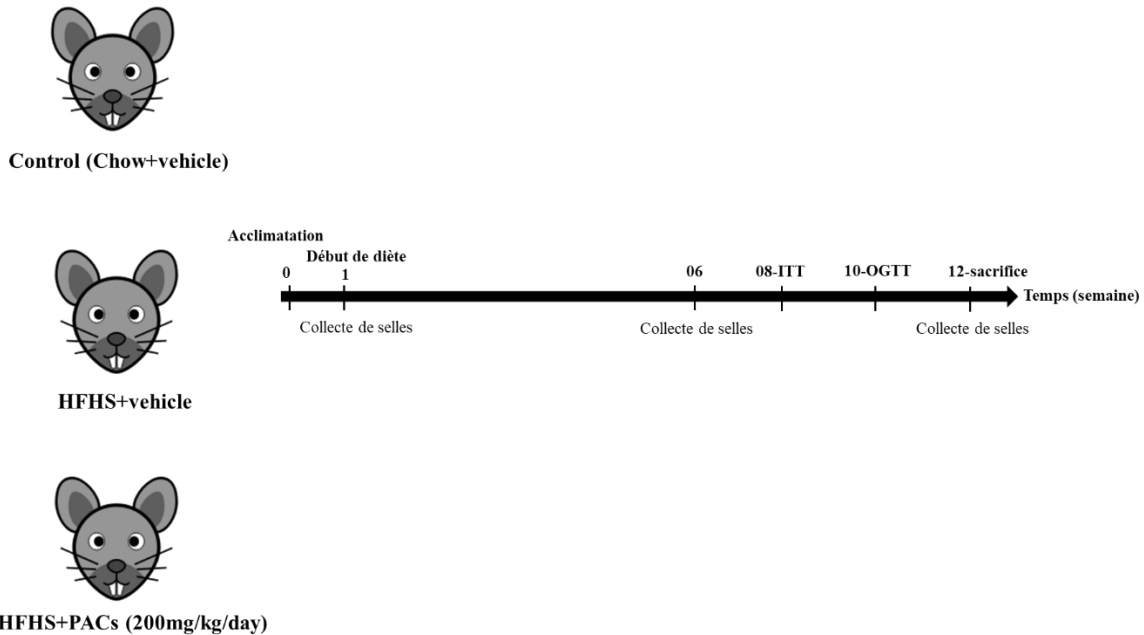


Figure 20. – Design de l'étude avec le modèle murin (figure réalisée à l'aide du logiciel powerpoint pour expliquer le protocole expérimental)

Les données de cette deuxième partie sont retrouvées dans le second article présenté dans la section Résultats.

Étude cellulaire

Dans ce troisième volet expérimental, nous avons étudié le métabolisme intestinal des PACs et les mécanismes d'actions et les effets bénéfiques métaboliques du DHPVL, l'un des métabolites majeurs des PACs. Comme décrit tout le long de cette thèse, les PAC, en tant que flavan-3-ols oligomères ou polymères, sont des composés bioactifs abondants dérivés d'aliments. Compte tenu de leur faible absorption dans l'intestin grêle, ils peuvent atteindre le côlon sous forme intacte. Sur ce même site, ils interagissent avec le microbiote intestinal et sont métabolisés en divers métabolites. Au cours de la dernière décennie, les données scientifiques accumulées ont suggéré que les actions biologiques et médicinales des flavan-3-ols, y compris les PACs, sont

principalement effectuées par leurs produits cataboliques entériques correspondants, et en particulier, ceux dérivés de leur métabolisme microbien colique. Par ailleurs, dans notre revue de la littérature, nous montrons de façon exhaustive plusieurs mécanismes d'action sous-jacents aux effets bénéfiques des PP et nous proposons qu'il est fort probable que les PP, surtout ceux de grande taille moléculaire, exercent leurs fonctions physiologiques par le biais de métabolites issus de leur métabolisme par le microbiote intestinal.

Les effets du métabolite DHPVL dans le maintien de l'homéostasie intestinale ont été déterminés en utilisant la lignée cellulaire Caco-2/15 d'origine intestinale (**Figure 19. –**). Le montage de cette étude est identique à notre première étude au niveau cellulaire sauf que les PACs ont été remplacés par le métabolite DHPVL. En effet, cette partie consiste également à une étude *in vitro* mais cette fois-ci l'objectif est de déterminer les effets bénéfiques métaboliques des métabolites de PACs sur le modèle cellulaire intestinal Caco2/15 dans les conditions de SOx et inflammation. Les résultats nous permettront de comparer les effets des PACs (PP parents) aux effets du métabolite DHPVL.

Chapitre 5 – Résultats

Article 1

Intestinal protection by proanthocyanidins involves anti-oxidative and anti-inflammatory actions in association with an improvement of insulin sensitivity, lipid and glucose homeostasis

Mireille Koudoufio, Francis Feldman, Lena Ahmarani, Edgard Delvin, Schohraya Spahis, Yves Desjardins and Emile Levy

Article publié dans la revue Scientific Reports en février 2021

Cet article répond à notre 1^{er} objectif

L'étudiante a contribué à la planification des expériences, à leurs réalisations, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article.

Correction apportée à l'article

Après vérification et comparaison avec les documents supplémentaires, nous tenons à informer que des erreurs ont été introduites par inadvertance lors de l'assemblage finale des figures avant l'envoi au journal. Cependant, un corrigendum a été demandé au journal et présenté en annexe de cet article. En effet, les erreurs ont été rectifiées dans les figures de représentation et dans nos documents supplémentaires. Le tout (figures corrigées et documents supplémentaires avec les gels des expériences) a été envoyé au journal pour effectuer les corrections.

Intestinal protection by proanthocyanidins involves anti-oxidative and anti-inflammatory actions in association with an improvement of insulin sensitivity, lipid and glucose homeostasis

Mireille Koudoufio^{1,2,3}, Francis Feldman^{1,2,3}, Lena Ahmarani¹, Edgard Delvin¹, Schohraya Spahis^{1,2,3}, Yves Desjardins⁴ and Emile Levy^{1,2,3}*

¹Research Centre, CHU Ste-Justine, ²Department of Nutrition, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada

³Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Université Laval, Quebec, Quebec, G1V 0A6, Canada

Running Title: PACs restore intestinal homeostasis

Address for correspondence:

Pr. Emile Levy

Research Centre

CHU Sainte-Justine

3175 Côte Ste-Catherine

Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5

Tel.: (514) 345-7783

E-mail: emile.levy@recherche-ste-justine.qc.ca

ABSTRACT

Recent advances have added another dimension to the complexity of cardiometabolic disorders (CMD) by directly implicating the gastrointestinal (GI) tract as a key player. In fact, multiple factors could interfere with intestinal homeostasis and elicit GI and extra-intestinal CMD. As oxidative stress (OxS), inflammation, insulin resistance and lipid abnormalities are among the most disruptive events, the aim of the present study is to explore whether proanthocyanidins (PACs) exert protective effects against these disorders. To this end, fully differentiated intestinal Caco-2/15 cells were pre-incubated with PACs with and without the pro-oxidant and pro-inflammatory iron-ascorbate (Fe/Asc). PACs significantly reduce malondialdehyde, a biomarker of lipid peroxidation, and raises antioxidant SOD2 and GPx via increase of NRF2/Keap1 ratio. Likewise, PACs decrease the inflammatory agents TNF α and COX2 via abrogation of NF- κ B. Moreover, according to crucial biomarkers, PACs result in lipid homeostasis improvement as reflected by enhanced fatty acid β -oxidation, diminished lipogenesis, and lowered gluconeogenesis through modulation of PPAR α , γ and SREBP1c. Since these metabolic routes are mainly regulated by insulin sensitivity (IS), we have examined insulin signaling and found upregulation of phosphoPI3K/Akt and downregulation of p38 MAPK pathways, indicating beneficial effects in response to PACs. Taken together, PACs display the potential to counterbalance OxS and inflammation in Fe/Asc-exposed intestinal cells, in association with an improvement of IS, which ameliorates lipid and glucose homeostasis.

Keywords: Polyphenols, oxidative stress, inflammation, insulin sensitivity, lipogenesis, β -oxidation, gluconeogenesis, transcription factors and cardiometabolic disorders.

INTRODUCTION

The gastrointestinal (GI) tract is a complex system that fulfills essential functions in the human body¹⁻³. It ensures digestion and absorption of nutrients, contributes to overall immunology competence by providing protection against pathogens, produces multiple peptidic hormones acting on several tissues and pathways, and harbors microbial communities interacting with the host and influencing metabolic health^{4,5}. In addition, the intestinal epithelium protects from foreign pathogen invasion and serves as the first line of defense, which is crucial for the prevention of multiple disorders⁶.

The GI tract is continuously exposed to harmful stimuli that may cause oxidative stress (OxS), inflammation and injury. Intraluminal pro-oxidants from ingested nutrients contain varying concentrations of lipid oxidation products, such as cholesterol oxides^{7,8}. The intestinal epithelium is also subject to multiple oxidant assaults from catalase-negative bacteria, oxidase-producing desquamated cells (e.g. xanthine oxidase), and hypothiocyanous acid-containing saliva, which may increase reactive oxygen species (ROS) in intestinal lumen⁹. Importantly, exaggerated ROS production are able to damage cell membranes, disturb barrier integrity, and lead to enhanced intestinal permeability, inflammation and endotoxemia¹⁰. The combination of OxS and inflammation in the gut compromises immune, digestive, endocrine and nervous functions¹¹. In particular, it elicits a decline in insulin sensitivity (IS), which triggers metabolic disorders^{12,13}.

Recently, growing evidence suggests that polyphenols and derivatives have the potential to prevent and treat chronic diseases¹⁴. These plant secondary metabolites exhibit various biological features and are gaining a growing interest among scientists. They are capable to reduce ROS

generation, neutralize OxS development, and fight inflammation^{15,16}. However, the mechanisms of action resulting in beneficial outcomes remain elusive. Furthermore, given their limited absorption and bioavailability, investigations into their physiological functions were limited to polyphenol transport and catabolism in the gut.

The main objective of the study is to determine the modulation of OxS and inflammation by proanthocyanidins (PACs), which are abundant flavan-3-ols in dietary fruits, vegetables, nuts and grains. As OxS and inflammation are two crucial processes promoting insulin resistance, insulin signaling is evaluated in response to cyanidins. The impact of these polyphenols is also assessed on fatty acids (FA) β -oxidation and lipogenesis, which will allow to estimate lipid homeostasis. The mechanisms behind PACs influence are appraised by focusing on central transcription factors. To this end, we have used the well-established human-derived immortalized Caco-2/15 cell line. These intestinal cells are known to undergo a spontaneous cell differentiation leading to the formation of a monolayer of cells expressing several morphological and functional characteristics of mature human enterocytes¹⁷⁻¹⁹.

RESULTS

Caco 2/15 cells integrity following different treatments

Before evaluating the impact of polyphenols on various processes, we wanted to ensure that Caco-2/15 cells maintained their integrity in response to iron (II) sulphate heptahydrate/2 mM ascorbate (Fe/Asc) and PACs treatments. Cell viability was not affected as observed from the invariable 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) assay (**Figure 1A**). Confirmation of integrity preservation was obtained following analysis by trypan blue exclusion (data not shown). Furthermore, measurement of transepithelial electrical resistance did not disclose any significant modification of the barrier integrity of Caco-2/15 cells (**Figure 1B**). Finally, cell differentiation was not disturbed according to villin, occludin and claudin protein expression (**Figure 1C-1E**). Therefore, the incubation of Caco-2/15 cells with Fe/Asc (200 μ M/2 mM) +/- 250 μ g/mL PACs did not affect cell viability, integrity and differentiation.

Effects of PACs on Fe/Asc-induced oxidative stress and lipid peroxidation

We then estimated the induction of OxS following Fe/Asc administration. Assessment by HPLC of the malondialdehyde (MDA), as a biomarker of lipid peroxidation, showed an elevated MDA content compared with control Caco-2/15 cells (**Figure 2A**). Consistently, the protein expression of the antioxidant superoxide dismutase 2 (SOD2) and glutathione peroxidase (GPx) enzymes was reduced by Fe/Asc compared with untreated cells (**Figure 2B-2C**). Nonetheless, the presence of PACs counteracted Fe/Asc-mediated lipid peroxidation as evidenced by MDA lessening and SOD2 and GPx elevation. As the transcription factor nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF2) is critical for the regulation of endogenous antioxidants, we evaluated its protein expression

(**Figure 2D**). No changes in NRF2 were detected in Caco-2/15 cells treated with Fe/Asc and PACs, but the protein expression of its negative regulator Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), a biosensor for oxidative and electrophilic stresses, was upregulated by Fe/Asc and downregulated by PACs (**Figure 2E**). In particular, the important ratio of NRF2/Keap1, which is an indicator of a transcriptional activation of NRF2, followed the same trend (**Figures 2F**). Overall, PACs are effective in counteracting Fe/Asc-mediated OxS.

Effects and mechanisms for actions of PACs on inflammation process

Pro-inflammatory cytokines are triggered in intestinal epithelial cells in OxS conditions. Our experiments confirmed this observation by demonstrating a Fe/Asc-mediated tumor necrosis factor-alpha (TNF α) induction (**Figure 3**). In line with these data, the protein expression of cyclooxygenase-2 (COX2), an enzyme exerting multifaceted role in inflammation promotion and perpetuation, was increased by the pro-oxidant Fe/Asc. However, PACs administration offset TNF α and COX2 protein levels elicited by Fe/Asc (**Figure 3A-3B**). Since nuclear factor kappa-B (NF- κ B) represents a powerful mediator of inflammatory responses, we tested its implication in the transcription of the aforementioned inflammatory components (**Figure 3C**). Whereas Caco-2/15 cells challenged by Fe/Asc exhibited a high NF- κ B signal likely through activating NF- κ B/I κ B ratio (**Figure 3E**) and phosphorylation of its inhibitor kappa B (I κ B) (**Figure 3F**), PACs were able to interfere with the NF- κ B pathway as reflected by their inhibition of NF- κ B and curtailment of I κ B phosphorylation/I κ B ratio raised by Fe/Asc (**Figure 3G**). Therefore, PACs work as potently repressing agent of inflammation.

Effects and mechanisms for actions of PACs on lipid homeostasis in Fe/Asc-induced stress in Caco 2/15 cells

The next step was to appraise the effects of PACs on lipid homeostasis by focusing on key proteins, which regulate FA β -oxidation and lipogenesis. We first examined the expression of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1 α) because this protein is the rate-controlling enzyme of the FA β -oxidation pathway. A lower level of protein expression characterized CPT-1 α in response to Fe/Asc, while the pre-incubation with PACs prevented its decline compared to untreated cells (**Figure 4A**). These findings prompted us to determine the potential mechanisms of action by scrutinizing the protein mass of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) because they represent two transcription factors necessary for the high-level expression of mitochondrial FA β -oxidation. Western blot analysis showed a slight downregulation of PPAR α without changes in PGC-1 α (**Figures 4B-4C**). Nevertheless, the presence of PACs prevented the Fe/Asc-mediated PGC-1 α and PPAR- α decline. Thereafter, we turned towards the regulatory enzymes controlling the lipogenesis process. As shown in **Figure 4**, an important drop of phosphorylated acetyl CoA-carboxylase (pACC) and a marked rise of fatty acid synthase (FAS) were noticed following Fe/Asc administration, indicating an activation of lipogenesis (**Figure 4D-4E**). These changes were probably due to the induction of the transcription factors PPAR γ and sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c) in Caco-2/15 cells (**Figure 4F-4G**). The presence of PACs was beneficial as it reversed the pro-lipogenesis effects of Fe/Asc. Since AMP-activated protein kinase alpha (AMPK α) represents a central regulator of FA β -oxidation and lipogenesis, we investigated its protein expression, which was found higher in response to Fe/Asc and normalized in the

presence of PACs. On the whole, most of these findings sustain a protective role of PACs in lipid homeostasis (**Figure 5**).

Effects and mechanisms for actions of PACs on glucose homeostasis and insulin sensitivity in Fe/Asc-induced stress in Caco 2/15 cells

Gluconeogenesis is strictly controlled by the activities of rate-limiting enzymes such as phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G6Pase). We explored the status of these enzymes by analyzing their protein expression by Western blot. **Figure 6** shows that the addition of Fe/Asc to Caco-2/15 cells raised the level of the two important enzymes, but PACs counterbalanced their Fe/Asc-induced upregulation.

Since insulin signaling modulates the processes of lipogenesis, FA β -oxidation and gluconeogenesis, it was important to investigate the influence of Fe/Asc and PACs on MAPKs and PI3K/Akt, the two main insulin signaling pathways. To this end, Caco-2/15 cells were pre-incubated with insulin before the other Caco-2/15 cell treatments in order to activate the signaling pathways. While Fe/Asc raised the p38-MAPK protein expression and phospho p38-MAPK / p38-MAPK ratio, PACs prevented their increase (**Figure 7A-7C**). On the other hand, whereas Fe/Asc lowered the protein mass of pAkt and pAkt/Akt ratio, PACs showed an ability to maintain their normal level. A similar trend was noted for PI3K (**Figure 7D-7I**). Therefore, these observations are supportive of the favorable role of PACs in the protection of IS.

DISCUSSION

Polyphenols are well known for their pleiotropic biological and medicinal effects, which explains the attraction of many scientists and food industries for these fascinating plant-derived natural products. PACs stand out from the variety and high number of polyphenols because of their pharmacological and therapeutic impacts on chronic disorders^{20,21}. Despite their praiseworthy features, there is still much that remains unknown about their influence on the GI tract, which deploys extended digestive, immunologic, neuronal and metagenomics networks²². For this reason, efforts have been dedicated in the present investigation to clarify the role of PACs in intestinal OxS, antioxidant defense, inflammation, FA β -oxidation, lipogenesis and gluconeogenesis, while at the same time attempting to elucidate underlying mechanisms such as insulin signaling and transcription factors status.

To probe PACs effects, we used the Caco-2/15 cell line, a popular intestinal model predominantly appreciated by the scientific community²³, and recognized by the Food and Drug Administration for uptake and transport processes²⁴. Not only do Caco-2/15 cells spontaneously differentiate into functionally and morphologically resembling human enterocytes^{23,25}, but they also serve for efficient exploration of gut absorption and interactions, nutrition, toxicology, food microbiology, bioavailability tests, and screening of drug permeability in discovery programs^{26,27}. As in our previous reports regarding various topics²⁸⁻³¹, the Caco-2/15 cell line has been instrumental in the current study to unravel the potential of PACs to regulate diverse metabolic pathways. Importantly, in this study, cells were seed on porous filters, allowing access to both sides of the bipolar intestinal epithelium: apical and basolateral compartments corresponding to the intestinal lumen or serosal circulation, respectively. Additionally, we pre-incubated Caco-2/15

cells with Fe/Asc, which has entirely been suitable in our hands to induce strong OxS and inflammation, which have subsequently been challenged by a large spectrum of effectors^{17,19,32-34}. Noteworthy, Fe/Asc as a strong oxygen-radical generating system causes oxidative damage to biological macromolecules, alters intracellular redox environment and is involved in numerous pathological states^{32,35,36}. Our findings show a significant elevation of lipid peroxidation (high MDA levels) along with vulnerable antioxidant defense (low GPx and SOD2 protein expressions). Furthermore, by virtue of their ability to generate lipid peroxides, Fe/Asc promotes inflammation as evidenced by increased expression of TNF α , COX2 and NF- κ B. Collectively, the present results validate the radical and inflammatory generation in response to Fe/Asc.

The presence of PACs counteracted Fe/Asc-mediated lipid peroxidation. As failure of antioxidant defense could explain the induction of OxS, we examined its action on endogenous antioxidant enzymes. In fact, PACs were able to restore Fe/Asc-mediated SOD2 and GPx decline. To delineate the mechanism for the exacerbation of OxS by Fe/Asc and alleviation by PACs, we assessed the Keap1-NRF2-antioxidant response element (ARE) signalling pathway, which is considered the most important endogenous antioxidant regulator³⁷. NRF2 is a cellular OxS sensor whose function is to maintain redox homeostasis. In normal conditions, NRF2 is continuously ubiquitinated and targeted for proteasomal degradation by its negative bound regulator Keap1³⁸. In presence of endogenous and exogenous effectors, Keap1 is inactivated and downregulated, thereby disrupting the Keap1-NRF2 interaction and releasing NRF2, which translocates to the cell nucleus, binds to the promoters containing ARE, and accelerates transcription of antioxidant enzymes³⁹. According to our data, the treatment of Caco-2/15 cells with PACs repressed Keap1 and likely allowed NRF2 to translocate to the nucleus allowing binding to ARE (core sequence:

5 'TGACnnnGC3') in the promoter region of antioxidant genes (SOD2 and GPx), resulting in stimulation of their transcription and coordinated up-regulation. In line with these data, the phenolic resveratrol compound prevented OxS in H₂O₂-treated rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by promoting expression of NRF2 and decreasing expression of Keap1⁴⁰. Additionally, according to Kanzaki et al., the activation of antioxidant and cytoprotective enzymes can be associated to NRF2/Keap1 ratio⁴¹.

As expected from the amelioration of OxS, PACs significantly lowered inflammation as evidenced by the downregulation of TNF α and COX2. Because NF- κ B is a key regulator of proinflammatory cytokines, we examined its response to PACs. In line with the trend of inflammatory agents, PACs abrogated Fe/Asc-mediated NF- κ B induction and reduced NF- κ B/I κ B ratio. Thus, we may reasonably assume that PACs help guard against inflammation that endangers intestinal cell functions via the control of NF- κ B, the master regulator of inflammatory response. It is worth mentioning that PACs may protect from inflammation by stimulating cellular antioxidant defensive mechanisms as a close relationship exists between biomarkers of redox imbalance and inflammation⁴².

The present study aimed to investigate PACs effects on intestinal lipid homeostasis. Our interesting findings showed that PACs upregulated CPT1 α on the one hand, and downregulated FAS, which represent the biomarkers of FA β -oxidation and lipogenesis, respectively. Therefore, these enzymes are potential targets of PACs, which indicate the polyphenolic potential to prevent lipid accumulation, considered as a pathological manifestation of OxS and inflammation in many tissues⁴³. The molecular mechanisms are probably related to the upregulation of PPAR α and downregulation of SREBP1c, two transcription factors that regulate lipid metabolism⁴⁴. FAS is the

central enzyme in lipogenesis, responsible for catalyzing the conversion of malonyl-CoA to fatty acids ⁴⁵. ACC catalyzes the formation of malonyl-CoA, an essential substrate for FAS. In line with our findings, *solanum nigrum* polyphenols were also found to decrease FAS and SREBPs, while increasing CPT1 α and PPAR α in oleic acid-treated hepatocytes ⁴⁶.

The mechanisms of actions of polyphenols are generally associated with activation of AMPK α phosphorylation ⁴⁷. Importantly, phosphorylated AMPK α in our study was lowered by Fe/Asc, but stimulated by PACs, which explains the downregulation of ACC by phosphorylation, resulting in inhibited lipogenesis and increased energy metabolism. However, the protein expression of AMPK α was increased by Fe/Asc-induced OxS in Caco2/15 cells. Accordingly, ROS and OxS may induce AMPK α via different upstream kinases ⁴⁸.

OxS and inflammation strongly induce insulin resistance and additional metabolic disorders ^{49,50}, which prompted us to appraise PACs capacity to regulate some key proteins relative to the insulin signaling pathway. We first focused on p38 MAPK whose expression was found upregulated by OxS and interferes with the insulin receptor signaling cascade ⁵¹. Analysis of p38-MAPK phosphorylation and the calculated phospho-p38-MAPK/p38-MAPK ratio revealed a significant increase in response to Fe/Asc, which is compatible with impaired IS in Caco-2/15 cells. Validation was obtained by the decline of P-Akt and PI3K. In contrast, PACs reversed the trend as they displayed the ability to lessen p38 MAPK phosphorylation and the phospho-p38 MAPK/p38 MAPK ratio, while enhancing the PI3K/Akt signaling pathway, which is known to mediate the major biological actions of insulin by regulating glucose transport, protein synthesis, cellular proliferation, cell survival and gluconeogenesis ⁵². The impairment in IS due to OxS and chronic inflammation can also affect the gluconeogenesis process ^{53,54}. Analysis of the two principal

enzymes involved in *de novo* synthesis of glucose (PEPCK, G6Pase) revealed a significant increase in response to Fe/Asc whereas PACs administration brought them back to normal levels in Caco2/15 cells.

In conclusion, numerous studies in the scientific literature demonstrate significant health effects of phenolic compounds either as a specific phenolic molecule or a mixture of several polyphenols by indirect evidence. The present work points out the crucial effect of PACs (complex flavanols) in intestinal homeostasis by preventing OxS, inflammation and related metabolic disorders. Since PACs may not totally be absorbed by the small intestine, further studies are needed to investigate the mechanisms involved in their beneficial health effects in the small intestine.

MATERIAL AND METHODS

Intestinal Caco-2/15 cell culture and treatment

For all the experiments, we used the human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2/15 cell line, a stable clone of the parent Caco-2 cells (American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA), that was obtained from Dr. J.F. Beaulieu (Department of Cellular Biology, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada). The Caco-2/15 cell line has the unique property to differentiate *in vitro* into polarized mature enterocytes and to form an impermeable monolayer. Caco-2/15 cells were cultured as described previously^{32,34,55} and used for the study of cell integrity^{17,19}, OxS and inflammation^{17,19}, and insulin sensitivity⁵⁶.

Protein expression analysis by immunoblotting

Following incubation with various treatments, Caco-2/15 cells were lysed in ice-cold buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na₂VO₄, 1 µg/mL leupeptin, and 1 mM PMSF. Protein concentration of each sample was determined using the Bradford method (Bio-Rad). Proteins were then denatured for 5 min in sample buffer containing SDS and β-mercaptoethanol. Homogenates containing 15 µg total proteins were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel according to protein molecular weights and were electroblotted onto nitrocellulose membranes. Fat-free milk was used to block nonspecific sites of the membranes before adding primary antibodies overnight at 4 °C. The dilution of antibodies is reported in **Supplementary information** and as our recent publication⁵⁷. Reactive bands were captured using

a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). All data are expressed as the ratio of target protein to β -actin in the same sample.

Statistical Analysis

All values are expressed as the mean \pm SEM of at least three different experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey's multiple comparisons test using PRISM 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

REFERENCES

- 1 Wells, J. M. *et al.* Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **312**, G171-G193, doi:10.1152/ajpgi.00048.2015 (2017).
- 2 Kleme, M. L. & Levy, E. Cystic fibrosis-related oxidative stress and intestinal lipid disorders. *Antioxid Redox Signal* **22**, 614-631, doi:10.1089/ars.2014.6012 (2015).
- 3 Levy, E. Insights from human congenital disorders of intestinal lipid metabolism. *J Lipid Res* **56**, 945-962, doi:10.1194/jlr.R052415 (2015).
- 4 Okumura, R. & Takeda, K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp Mol Med* **49**, e338, doi:10.1038/emm.2017.20 (2017).
- 5 Cani, P. D. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* **67**, 1716-1725, doi:10.1136/gutjnl-2018-316723 (2018).
- 6 Turner, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 799-809, doi:10.1038/nri2653 (2009).
- 7 Chijiwa, K. & Linscheer, W. G. Mechanism of pH effect on oleic acid and cholesterol absorption in the rat. *Am J Physiol* **252**, G506-510, doi:10.1152/ajpgi.1987.252.4.G506 (1987).
- 8 Nourooz-Zadeh, J. & Appelqvist, L.-A. Cholesterol Oxides in Swedish Foods and Food Ingredients: Milk Powder Products. *Journal of Food Science* **53**, 74-79, doi:10.1111/j.1365-2621.1988.tb10181.x (1988).
- 9 Green, B. T. *et al.* Adrenergic modulation of Escherichia coli O157:H7 adherence to the colonic mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G1238-1246, doi:10.1152/ajpgi.00471.2003 (2004).
- 10 Lian, P. *et al.* Beyond Heat Stress: Intestinal Integrity Disruption and Mechanism-Based Intervention Strategies. *Nutrients* **12**, 734, doi:10.3390/nu12030734 (2020).
- 11 Vargas-Robles, H., Castro-Ochoa, K. F., Citalan-Madrid, A. F. & Schnoor, M. Beneficial effects of nutritional supplements on intestinal epithelial barrier functions in experimental colitis models in vivo. *World J Gastroenterol* **25**, 4181-4198, doi:10.3748/wjg.v25.i30.4181 (2019).

- 12 Slyepchenko, A. *et al.* Intestinal Dysbiosis, Gut Hyperpermeability and Bacterial Translocation: Missing Links Between Depression, Obesity and Type 2 Diabetes. *Curr Pharm Des* **22**, 6087-6106, doi:10.2174/1381612822666160922165706 (2016).
- 13 Cani, P. D., Delzenne, N. M., Amar, J. & Burcelin, R. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol (Paris)* **56**, 305-309, doi:10.1016/j.patbio.2007.09.008 (2008).
- 14 Del Rio, D. *et al.* Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* **18**, 1818-1892, doi:10.1089/ars.2012.4581 (2013).
- 15 Denis, M. C. *et al.* Apple peel polyphenols: a key player in the prevention and treatment of experimental inflammatory bowel disease. *Clin Sci (Lond)* **130**, 2217-2237, doi:10.1042/CS20160524 (2016).
- 16 Rodriguez-Daza, M. C. *et al.* Wild blueberry proanthocyanidins shape distinct gut microbiota profile and influence glucose homeostasis and intestinal phenotypes in high-fat high-sucrose fed mice. *Sci Rep* **10**, 2217, doi:10.1038/s41598-020-58863-1 (2020).
- 17 Denis, M. C. *et al.* Prevention of oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction in the intestine by different cranberry phenolic fractions. *Clin Sci (Lond)* **128**, 197-212, doi:10.1042/CS20140210 (2015).
- 18 Yara, S. *et al.* Iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation causes epigenetic changes in the antioxidant defense in intestinal epithelial cells: impact on inflammation. *PLoS One* **8**, e63456, doi:10.1371/journal.pone.0063456 (2013).
- 19 Denis, M. C. *et al.* Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. *PLoS One* **8**, e53725, doi:10.1371/journal.pone.0053725 (2013).
- 20 Akaberi, M. & Hosseinzadeh, H. Grapes (*Vitis vinifera*) as a Potential Candidate for the Therapy of the Metabolic Syndrome. *Phytother Res* **30**, 540-556, doi:10.1002/ptr.5570 (2016).
- 21 Rauf, A. *et al.* Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother* **116**, 108999, doi:10.1016/j.biopha.2019.108999 (2019).

- 22 Garcia-Conesa, M. T. Dietary polyphenols against metabolic disorders: How far have we progressed in the understanding of the molecular mechanisms of action of these compounds? *Crit Rev Food Sci Nutr* **57**, 1769-1786, doi:10.1080/10408398.2014.980499 (2017).
- 23 Levy, E., Mehran, M. & Seidman, E. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J* **9**, 626-635, doi:10.1096/fasebj.9.8.7768354 (1995).
- 24 Corti, G., Maestrelli, F., Cirri, M., Zerrouk, N. & Mura, P. Development and evaluation of an *in vitro* method for prediction of human drug absorption II. Demonstration of the method suitability. *Eur J Pharm Sci* **27**, 354-362, doi:10.1016/j.ejps.2005.11.005 (2006).
- 25 Artursson, P., Palm, K. & Luthman, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**, 280-289, doi:10.1016/j.addr.2012.09.005 (2012).
- 26 Shimizu, M. Interaction between food substances and the intestinal epithelium. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 232-241, doi:10.1271/bbb.90730 (2010).
- 27 Sun, H., Chow, E. C., Liu, S., Du, Y. & Pang, K. S. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**, 395-411, doi:10.1517/17425255.4.4.395 (2008).
- 28 Grenier, E. *et al.* Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion, and apolipoprotein biogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G1178-1189, doi:10.1152/ajpgi.00295.2007 (2007).
- 29 Sane, A. T. *et al.* Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res* **47**, 2112-2120, doi:10.1194/jlr.M600174-JLR200 (2006).
- 30 Ravid, Z. *et al.* Modulation of intestinal cholesterol absorption by high glucose levels: impact on cholesterol transporters, regulatory enzymes, and transcription factors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**, G873-885, doi:10.1152/ajpgi.90376.2008 (2008).
- 31 Mailhot, G. *et al.* CFTR knockdown stimulates lipid synthesis and transport in intestinal Caco-2/15 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **297**, G1239-1249, doi:10.1152/ajpgi.00206.2009 (2009).

- 32 Bernotti, S. *et al.* Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G898-906, doi:10.1152/ajpgi.00042.2003 (2003).
- 33 Taha, R. *et al.* Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line. *PLoS One* **5**, e11817, doi:10.1371/journal.pone.0011817 (2010).
- 34 Courtois, F. *et al.* Membrane peroxidation by lipopolysaccharide and iron-ascorbate adversely affects Caco-2 cell function: beneficial role of butyric acid. *Am J Clin Nutr* **77**, 744-750, doi:10.1093/ajcn/77.3.744 (2003).
- 35 Welch, K. D., Davis, T. Z., Van Eden, M. E. & Aust, S. D. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med* **32**, 577-583, doi:10.1016/s0891-5849(02)00760-8 (2002).
- 36 Marcil, V. *et al.* Modification in oxidative stress, inflammation, and lipoprotein assembly in response to hepatocyte nuclear factor 4alpha knockdown in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **285**, 40448-40460, doi:10.1074/jbc.M110.155358 (2010).
- 37 Anzovino, A. *et al.* Molecular Alterations in a Mouse Cardiac Model of Friedreich Ataxia: An Impaired Nrf2 Response Mediated via Upregulation of Keap1 and Activation of the Gsk3beta Axis. *Am J Pathol* **187**, 2858-2875, doi:10.1016/j.ajpath.2017.08.021 (2017).
- 38 Calkins, M. J. *et al.* The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. *Antioxid Redox Signal* **11**, 497-508, doi:10.1089/ARS.2008.2242 (2009).
- 39 Itoh, K. *et al.* An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 313-322, doi:10.1006/bbrc.1997.6943 (1997).
- 40 Zhang, Y. *et al.* Nrf2-Keap1 pathway-mediated effects of resveratrol on oxidative stress and apoptosis in hydrogen peroxide-treated rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Ann N Y Acad Sci* **1457**, 166-178, doi:10.1111/nyas.14196 (2019).
- 41 Kanzaki, H., Shinohara, F., Kajiya, M. & Kodama, T. The Keap1/Nrf2 protein axis plays a role in osteoclast differentiation by regulating intracellular reactive oxygen species signaling. *J Biol Chem* **288**, 23009-23020, doi:10.1074/jbc.M113.478545 (2013).

- 42 Blaser, H., Dostert, C., Mak, T. W. & Brenner, D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends Cell Biol* **26**, 249-261, doi:10.1016/j.tcb.2015.12.002 (2016).
- 43 Dai, Y. L., Zou, Y. X., Liu, F. & Li, H. Z. [Review: plant polyphenols modulate lipid metabolism and related molecular mechanism]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **40**, 4136-4141 (2015).
- 44 Kim, H. J., Miyazaki, M., Man, W. C. & Ntambi, J. M. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) as regulators of lipid metabolism: polyunsaturated fatty acids oppose cholesterol-mediated induction of SREBP-1 maturation. *Ann N Y Acad Sci* **967**, 34-42, doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04261.x (2002).
- 45 AlQattan, H. T., Mundra, L. S., Rubio, G. A. & Thaller, S. R. Abdominal Contouring Outcomes in Class III Obesity: Analysis of the ACS-NSQIP Database. *Aesthetic Plast Surg* **42**, 13-20, doi:10.1007/s00266-017-0976-y (2018).
- 46 Chang, J. J. *et al.* Solanum nigrum Polyphenol Extracts Inhibit Hepatic Inflammation, Oxidative Stress, and Lipogenesis in High-Fat-Diet-Treated Mice. *J Agric Food Chem* **65**, 9255-9265, doi:10.1021/acs.jafc.7b03578 (2017).
- 47 Park, S. H. *et al.* Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. *J Appl Physiol (1985)* **92**, 2475-2482, doi:10.1152/jappphysiol.00071.2002 (2002).
- 48 Wang, S., Song, P. & Zou, M. H. AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)* **122**, 555-573, doi:10.1042/CS20110625 (2012).
- 49 Li, G., Barrett, E. J., Barrett, M. O., Cao, W. & Liu, Z. Tumor necrosis factor- α induces insulin resistance in endothelial cells via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Endocrinology* **148**, 3356-3363, doi:10.1210/en.2006-1441 (2007).
- 50 Samuel, V. T. & Shulman, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* **148**, 852-871, doi:10.1016/j.cell.2012.02.017 (2012).
- 51 Hotamisligil, G. S. & Davis, R. J. Cell Signaling and Stress Responses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a006072, doi:10.1101/cshperspect.a006072 (2016).
- 52 Mackenzie, R. W. & Elliott, B. T. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes* **7**, 55-64, doi:10.2147/DMSO.S48260 (2014).

- 53 Hatting, M., Tavares, C. D. J., Sharabi, K., Rines, A. K. & Puigserver, P. Insulin regulation of gluconeogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **1411**, 21-35, doi:10.1111/nyas.13435 (2018).
- 54 Noguchi, R. *et al.* The selective control of glycolysis, gluconeogenesis and glycogenesis by temporal insulin patterns. *Mol Syst Biol* **9**, 664, doi:10.1038/msb.2013.19 (2013).
- 55 Courtois, F. *et al.* The antioxidant BHT normalizes some oxidative effects of iron + ascorbate on lipid metabolism in Caco-2 cells. *J Nutr* **132**, 1289-1292, doi:10.1093/jn/132.6.1289 (2002).
- 56 Sane, A. *et al.* SAR1B GTPase is necessary to protect intestinal cells from disorders of lipid homeostasis, oxidative stress, and inflammation. *J Lipid Res* **60**, 1755-1764, doi:10.1194/jlr.RA119000119 (2019).
- 57 Foisy-Sauve, M. *et al.* Glycomacropeptide Prevents Iron/Ascorbate-Induced Oxidative Stress, Inflammation and Insulin Sensitivity with an Impact on Lipoprotein Production in Intestinal Caco-2/15 Cells. *Nutrients* **12**, 1175, doi:10.3390/nu12041175 (2020).

ACKNOWLEDGMENTS/GRANT SUPPORT

This work was supported by a grant from the JA deSève Research Chair in nutrition (E.L.) and the NSERC-Diana Food Industrial Chair on prebiotic effects of polyphenols (401240871) (E.L. & Y.D.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.L. conceived the experiments, M.K., L.A. conducted the experiments, M.K., F.F., L.A. analyzed the results, M.K., S.S., E.D., Y.D. and E.L., revised the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effects of PACs on cell integrity and viability in Caco2/15 cells. Integrity of Caco 2/15 monolayer was determined by cell viability, differentiation and tight junction assays on fully differentiated cells. Cranberry purified extract, rich in proanthocyanidins (PACs, 250 µg/mL), was added to the apical compartment for 24h prior to the treatment with Fe/Asc (200 µM/2 mM) for 6h at 37°C. (A) MTT was used to assay cell viability, and (B) transepithelial resistance was also determined. (C) Villin, (D) Occludin and (E) Claudin protein expressions were assessed by Western blot. (E) MTT was used to assay cell viability. Results represent the means ± SEM of 3 independent experiments each in triplicate. Results are illustrated as % of control cells after the data were calculated as densitometric of target protein to β-actin in the same sample. A representative Western blot is shown, illustrating an experiment in triplicate on the same gel and at the same exposure.

Figure 2. Effects of PACs on lipid peroxidation, regulatory endogenous antioxidant, and oxidative stress key transcription factors in the Caco-2/15 cell line. Cranberry purified extract, rich in proanthocyanidins (PACs, 250 µg/mL), was added to the apical compartment for 24h prior to the treatment with Fe/Asc (200 µM/2 mM) for 6h at 37°C. Lipid peroxidation was determined by measuring (A) MDA levels by HPLC. The protein expression of (B) SOD2, (C) GPx, (D) NRF2 and (E) Keap 1 was determined by Western blot. (E) The ratio NRF2/Keap1 was calculated. Results represent the means ± SEM of 3 independent experiments each in triplicate. Results are illustrated as % of control cells after the data were calculated as densitometric of target protein to β-actin in the same sample. A representative Western blot is shown, illustrating an experiment in triplicate on the same gel and at the same exposure.

*P<0.05; ****P<0.001 vs untreated cells (ctrl). #P<0.05; ##P<0.01; ####P<0.001 vs Fe/Asc-treated cells.

MDA: malondialdehyde, SOD2: superoxide dismutase 2; GPx: Glutathione peroxidase; NRF2: Nuclear factor erythroid 2–related factor 2; Keap1: Kelch-like ECH-associated protein

Figure 3. Effects of cranberry PACs on inflammatory markers and key transcription factor NF-κB in Fe/Asc induced inflammation in Caco-2/15 cells. Cranberry purified extract rich, in proanthocyanidins (PACs, 250 µg/mL), was added to the apical compartment for 24h prior to the treatment with Fe/Asc (200 µM/2 mM) for 6h at 37°C. Protein expression of (A) COX2 and (B) TNFα, (C) NF-κB, (D) IκB and its (F) phosphorylated form (pIκB) was determined by Western blot. The ratios (E) NF-κB/IκB and (G) phospho IκB/IκB were calculated. Results represent the means ± SEM of 3 independent experiments each in triplicate. Results are illustrated as % of control cells after the data were calculated as densitometric of target protein to β-actin in the same sample. A representative Western blot is

shown, illustrating an experiment in triplicate on the same gel and at the same exposure.

*P<0.05; **P<0.01 vs untreated cells (ctrl). #P<0.05; ##P<0.01 vs Fe/Asc treated cells.

COX2: Cyclooxygenase-2; TNF α : Tumor necrosis factor alpha; NF- κ B: Nuclear transcription factor-kappa B; I κ B: Inhibitor of kappa B

Figure 4. Effects of PACs on fatty acid β -oxidation and lipogenesis in the Caco-2/15 cell line.

Cranberry purified extract, rich in proanthocyanidins (PACs, 250 μ g/mL), was added to the apical compartment for 24h prior to the treatment with Fe/Asc (200 μ M/2 mM) for 6h at 37°C. The protein expression of specific markers of fatty acid β -oxidation [(A) CPT1 α , (B) PPAR α and (C) PGC-1 α] and lipogenesis [(D) ACC phosphorylation, (E) FAS, (F) PPAR γ and (G) SREBP1c] was assessed by Western-blot. Results represent the means \pm SEM of 3 independent experiments each in triplicate. Results are illustrated as % of control cells after the data were calculated as densitometric of target protein to β -actin in the same sample. A representative Western blot is shown, illustrating an experiment in triplicate on the same gel and at the same exposure.

*P<0.05; **P<0.01 vs untreated cells (ctrl). #P<0.05; ##P<0.01 vs Fe/Asc treated cells.

CPT1 α : Carnitine palmitoyl transferase I alpha; PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor; PGC1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; ACC: Acetyl-CoA carboxylase; FAS: Fatty acid synthase; SREBP1-c: Sterol regulatory element-binding protein

Figure 5 **Effects of PACs on AMP-activated protein kinase alpha (AMPK α) regulating fatty acid β -oxidation and lipogenesis in the Caco-2/15 cells.** Cranberry purified extract, rich in proanthocyanidins (PACs, 250 μ g/mL), was added to the apical compartment for 24h prior to the treatment with Fe/Asc (200 μ M/2 mM) for 6h at 37°C. The protein expression of AMPK α was assessed by Western Blot. Results represent the means \pm SEM of 3 independent experiments each in triplicate. Results are illustrated as % of control cells after the data were calculated as densitometric of target protein to β -actin in the same sample. A representative Western blot is shown, illustrating an experiment in triplicate on the same gel and at the same exposure.

*P<0.05 vs untreated cells (ctrl). #P<0.05, ##P<0.01 vs Fe/Asc treated cells.

Figure 6 **Effects of PACs on neoglucogenesis in Caco-2/15 cells.** Cranberry purified extract, rich in proanthocyanidins (PACs, 250 μ g/mL), was added to the apical compartment for 24h prior to the treatment with Fe/Asc (200 μ M/2 mM) for 6h at 37°C. The protein expression of (A) G6Pase and (B) PEPCK was assessed by Western blot. Results represent the means \pm SEM of 3 independent experiments each in triplicate. Results are illustrated as % of control cells after the data were calculated as densitometric of target protein to β -actin in the same sample. A representative Western blot is shown, illustrating an experiment in triplicate on the same gel and at the same exposure.

*P<0.05 vs untreated cells (ctrl). #P<0.05 vs Fe/Asc treated cells.

G6Pase: Glucose-6-phosphatase; PEPCK: phosphoenol pyruvate carboxykinase

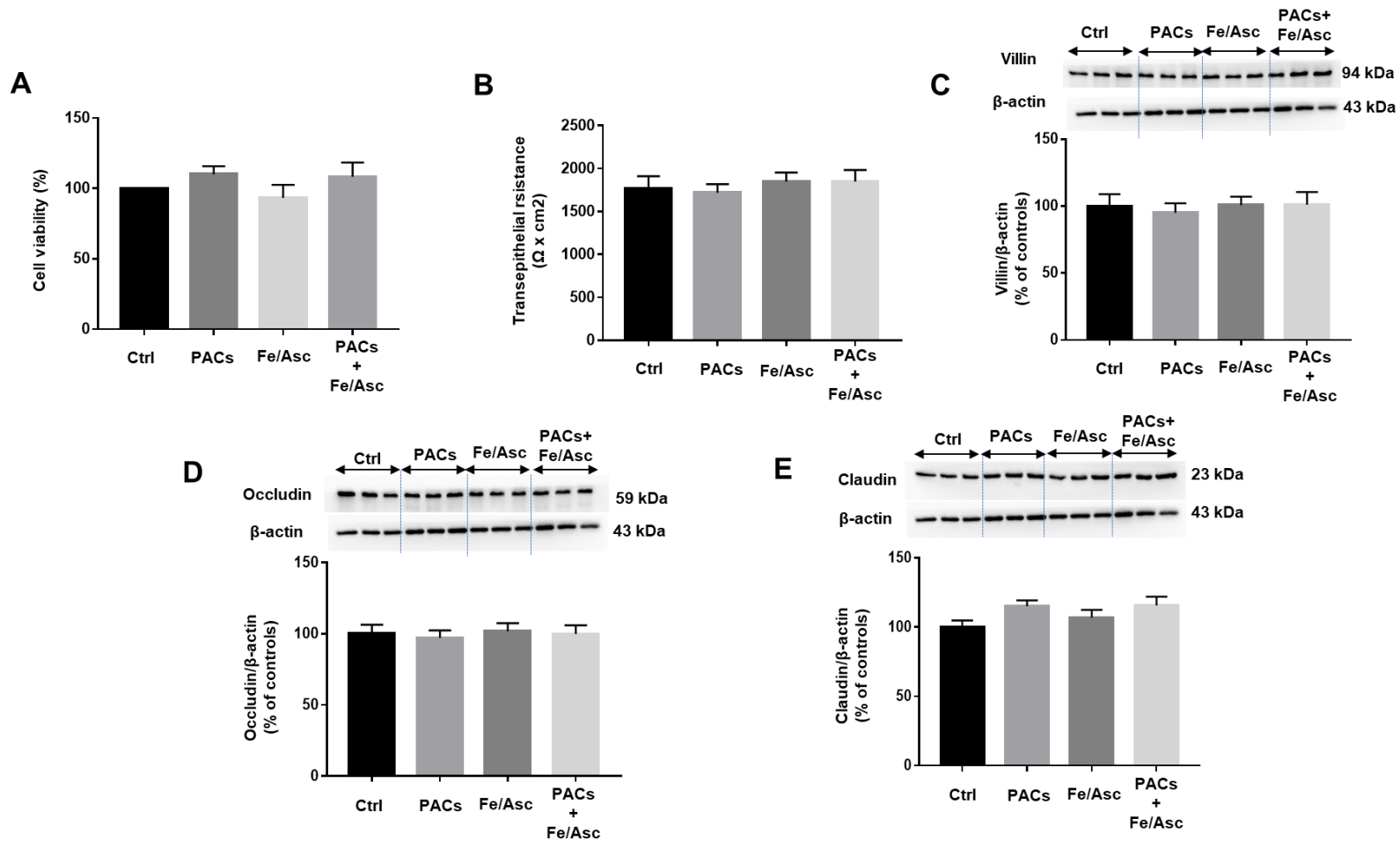
Figure 7 **Effects of PACs on insulin sensitivity in Caco-2/15 cell line.** Cranberry purified extract, rich in proanthocyanidins (PACs, 250 μ g/mL), was added to the apical compartment for 24h prior to the treatment with Fe/Asc (200 μ M/2 mM) for 6h at

37°C. Two hours before the end of the six hour-incubation with Fe/Asc mixture, insulin (100 nM) was added to evaluate insulin sensitivity. The protein expression of (A) p38-MAPK, (B) phospho p38-MAPK, (D) Akt, (E) phospho Akt, (G) PI3k and (H) phospho PI3k was evaluated by Western blot. The ratios (C) phospho p38-MAPK/p38-MAPK, (F) phospho Akt/Akt and (I) phospho PI3k/PI3k were then calculated. Results represent the means \pm SEM of 3 independent experiments each in duplicate. Results are illustrated as % of control cells after the data were calculated as densitometric of target protein to β -actin in the same sample. A representative Western blot is shown, illustrating an experiment in triplicate on the same gel and at the same exposure.

*P<0.05; **P<0.01 vs +/- insulin untreated cells (ctrl). #P<0.05 vs Fe/Asc +/- insulin treated cells.

p38-MAPK: p38 mitogen activated protein kinase; PI3k: phosphoinositide 3-kinase;
Akt: protein kinase B

Figure 1



UPDATED AND COMPLETE Figure 2 WITH THE CORRECTED Figure 2E

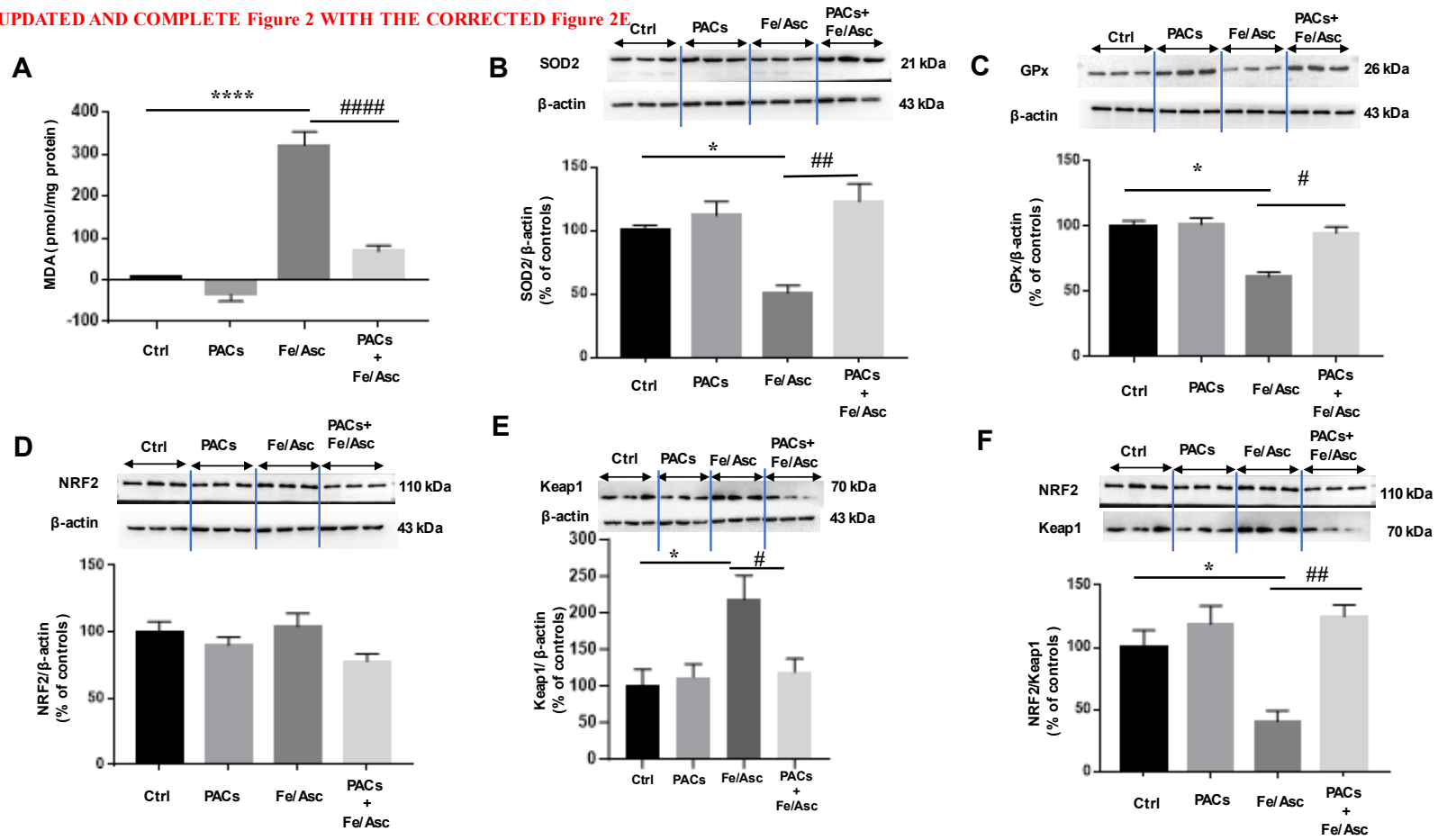


Figure 3

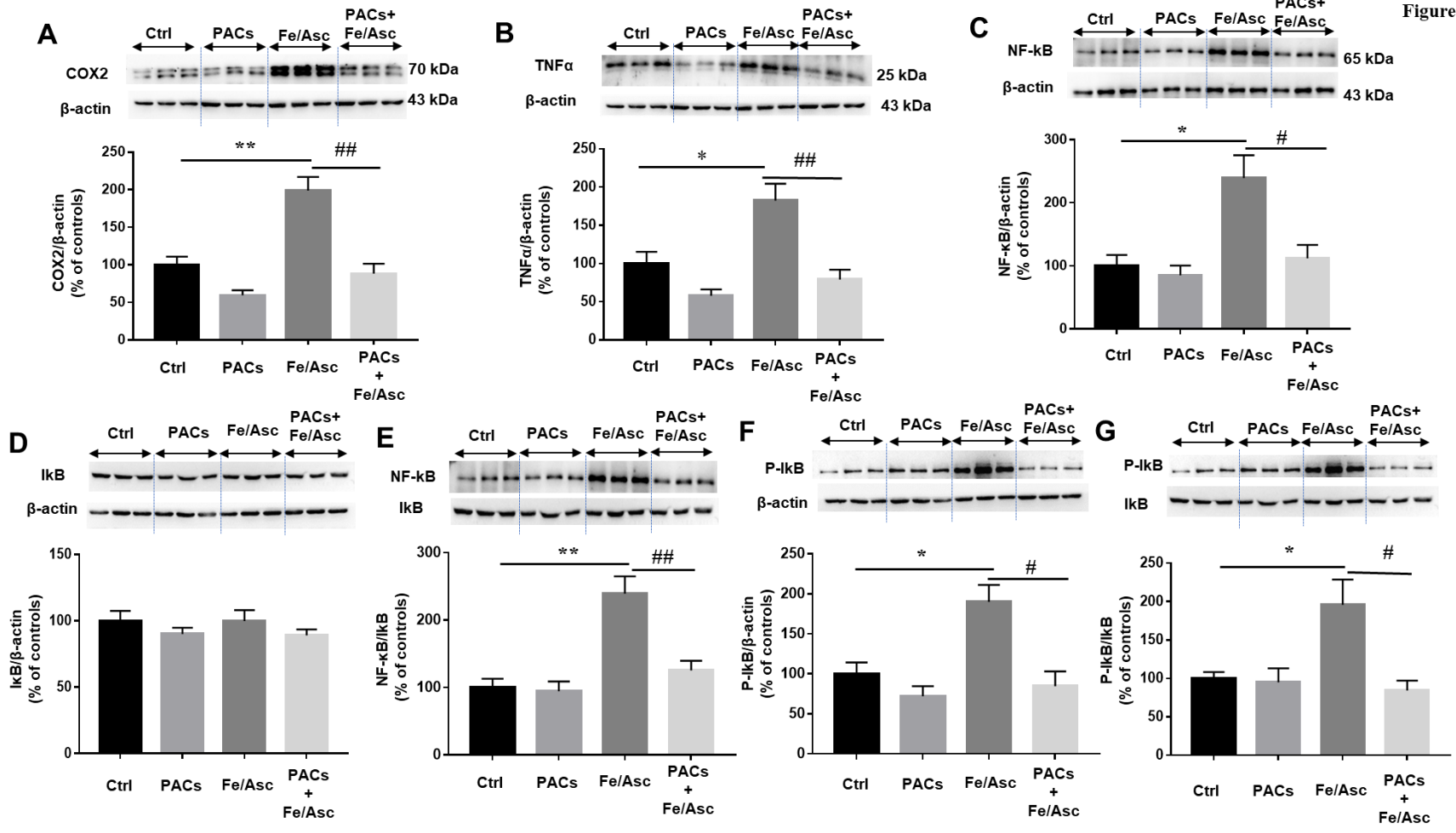


Figure 4

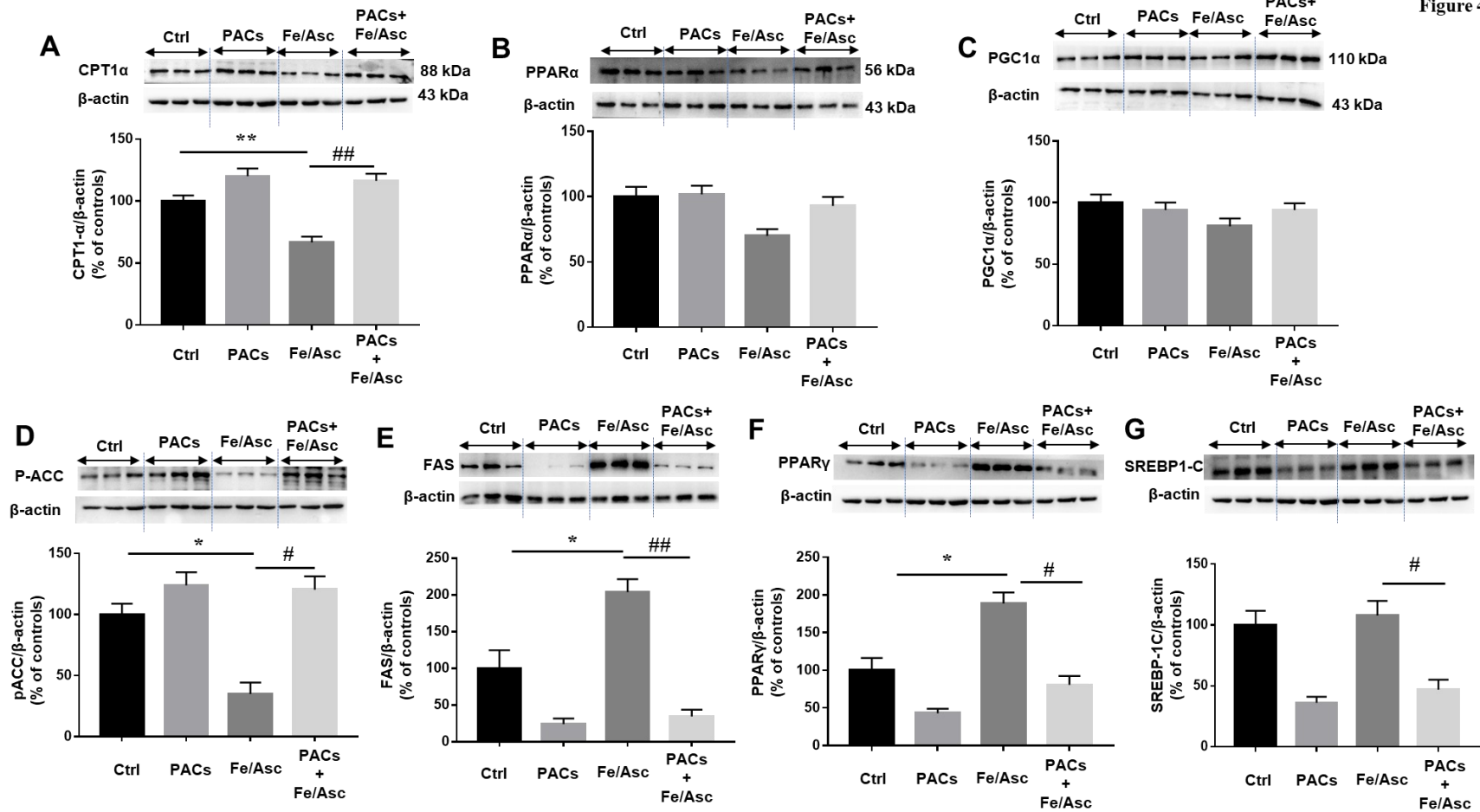


Figure 5

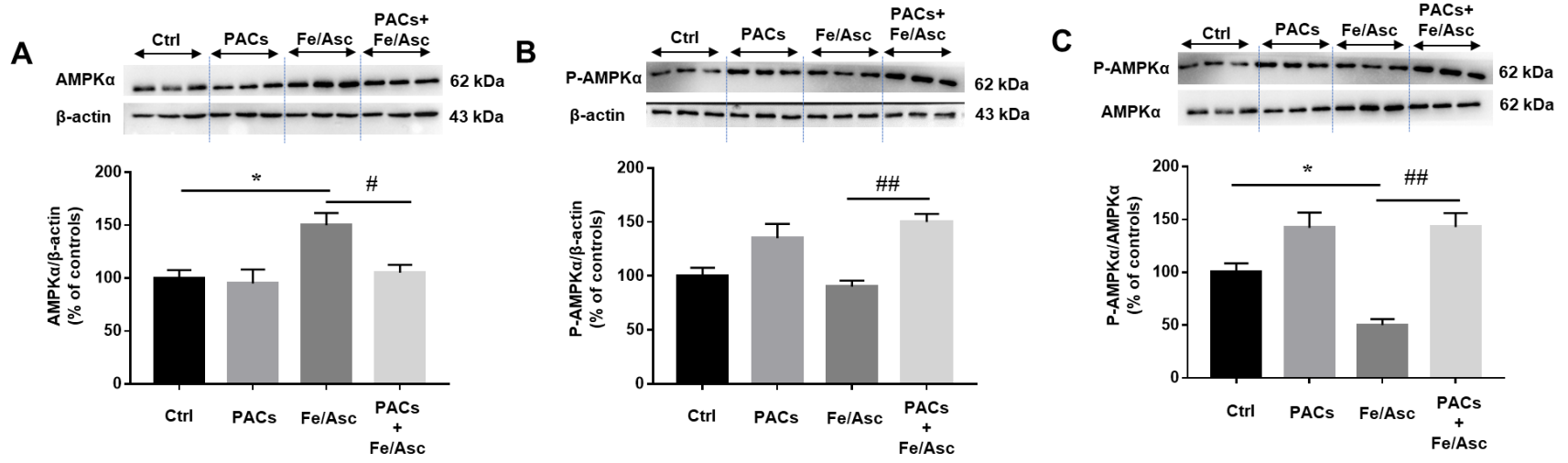


Figure 6

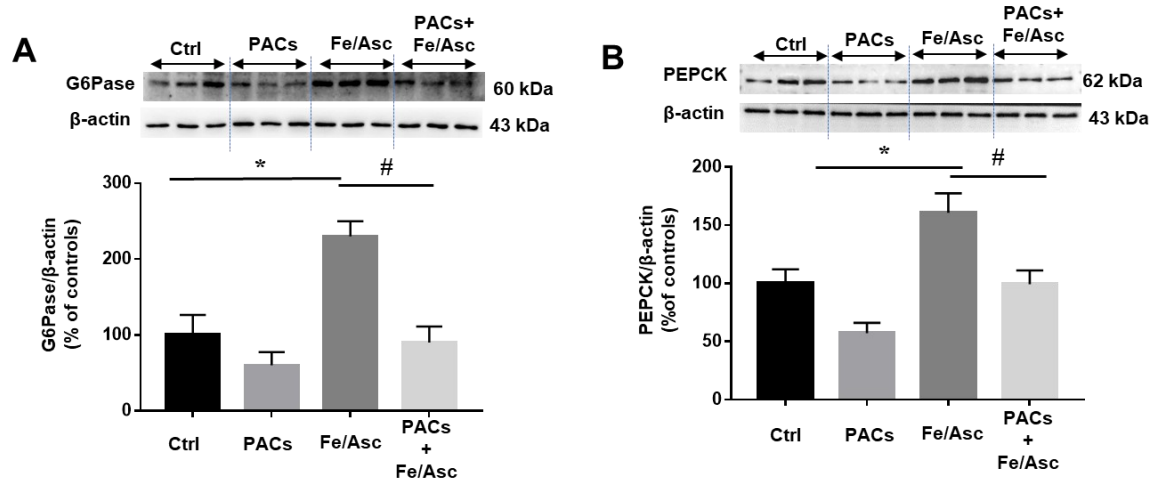
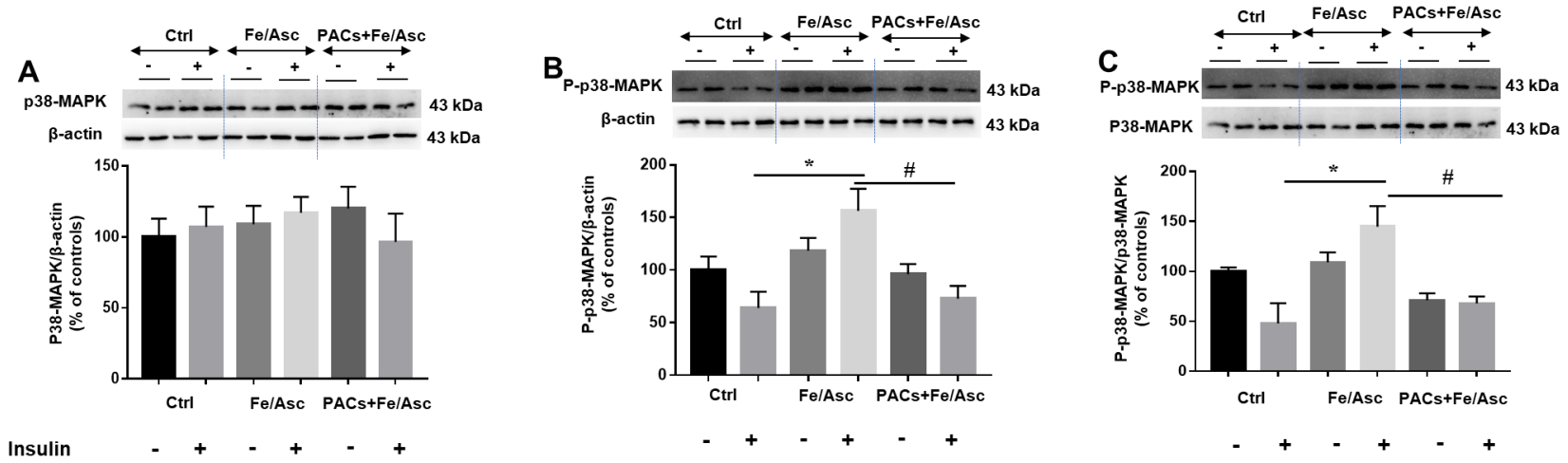


Figure 7



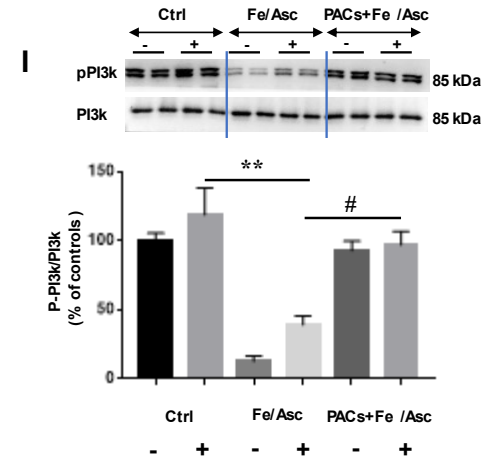
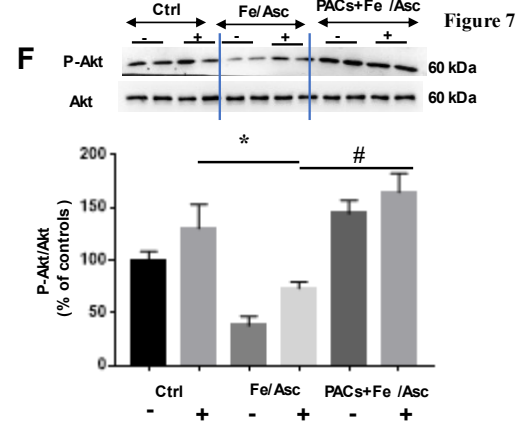
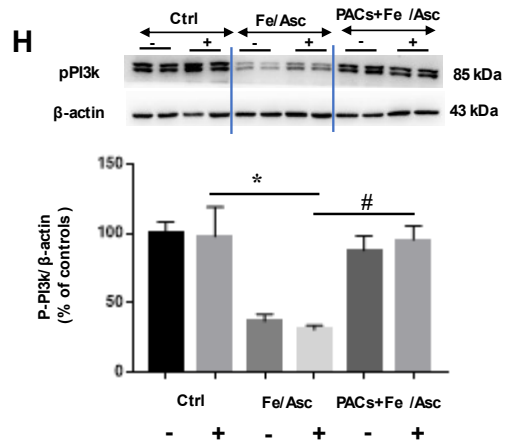
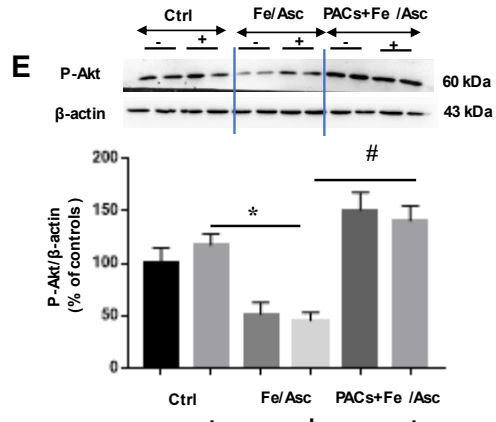
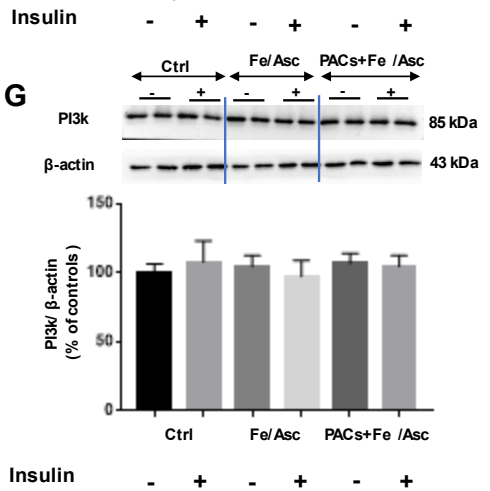
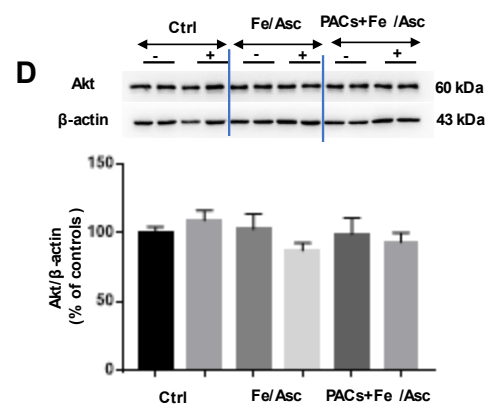


Figure 7

Annexe à l'article 1

Dans cette annexe, je joins les documents envoyés à l'éditeur pour la demande de corrections de l'article 1 publié dans la revue Scientific reports. Sur les pages suivantes, les documents envoyés sont présentés comme suit: (i) une copie de l'email adressé à l'éditeur, (ii) une copie de la lettre adressée à l'éditeur, (iii) les corrections à effectuer dans l'article, (iv) une copie des calculs pour obtenir le graphe corrigé.

Request for correction

Alain Théophile SANÉ <sanealaintheo@gmail.com>

Jeu 30/11/2023 19:44

À :rafal.marszalek@nature.com <rafal.marszalek@nature.com>

Cc :Mireille Koudoufio <mireille.koudoufio@umontreal.ca>

 5 pièces jointes (3 Mo)

Keap 1_2experiments blots 2023 11 28.pdf; Keap1_Mean of 2 exp (2023 11 28).pdf; Letter to the Editor-30-11-2023.pdf; figures (correction 2) scientific reports. 2023 11 28.pdf; Scan of gels - Koudoufio (sc. report)30-11-2023.pdf;

Dear Dr Marszalek,

I am a research associate in Dr. Levy's laboratory.

I am sending you a request for correction regarding our article published in Scientific Reports in 2021.

Attached files are as follows:

- Letter to the editor
- Correction of Figure 2E
- Updated raw gels for Keap1 (Figure 2E)
- Excel recalculation tables for Keap1 (Figure 2E)
- Overall updated raw gels on the article

Yours sincerely

On behalf of Dr Emile Levy

--

Alain Théophile Sané

Professor Rafal Marszalek,
Chief Editor,
Scientific Reports

Dear Rafal,

I trust this message finds you in good health. I am writing to address a matter related to our published article entitled "Intestinal protection by proanthocyanidins involves anti-oxidative and anti-inflammatory actions in association with an improvement of insulin sensitivity, lipid and glucose homeostasis" with the DOI 10.1038/s41598-020-80587-5.

Some time ago, we submitted a correction to address an error in Figure 7. As part of the thorough review for the finalization of her doctoral thesis, PhD student Mireille Koudoufio has recently identified a discrepancy that needs rectification to ensure the precision and transparency of our findings. The specific details of the correction are outlined below:

During the assembly of figures, a critical error was detected at the Keap1 level in Panel E of Figure 2. Regrettably, the genuine Keap1 blot in Panel E of Figure 2 was inadvertently replaced with the PPAR γ blot from Figure 4, Panel F. We have diligently corrected this mistake by reinstating the accurate Keap1 blot in Panel E of Figure 2. It is essential to emphasize that there was no confusion with corresponding beta-actin. Similarly, the representation of PPAR γ was perfectly correct and did not necessitate any modifications.

Attached, you will find the Keap1 figure as originally published in Scientific Reports, the revised version following the correction, along with the corresponding blot, scan, and recalculations. Importantly, upon reevaluation and subsequent recalculations, we can affirm that the essence and interpretation of the data in the Panel E remain unaltered. The corrigendum has also been written and attached to the revised blot version. Kindly be informed that we are providing you with all the protein blots featured in the article, which represent the raw results.

We sincerely apologize for any inconvenience caused and appreciate your understanding regarding this oversight. Please be assured that we have taken every conceivable measure to ensure the precision and integrity of our findings.

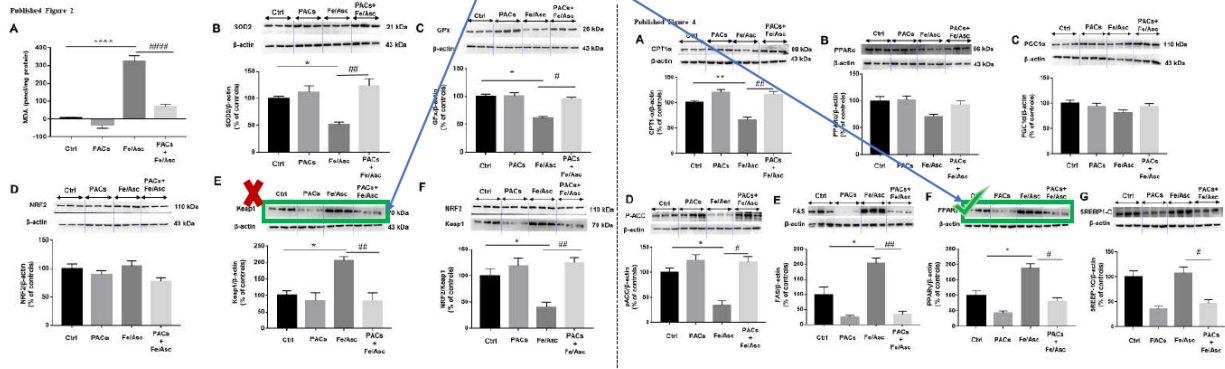
Thank you for your attention to this matter.

Sincerely,

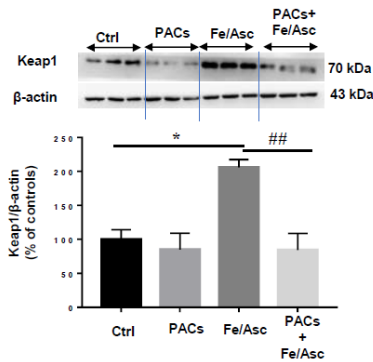
Emile

Professor Emile Levy
J.A.deSève Research Chair in nutrition.
Faculty of medicine,
Medical School, Université de Montréal.
Scientific Director,
Division of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, CHU Sainte-Justine.
Tel : 514-345-7783
Email : emile.levy.hsj@sss.gouv.qc.ca

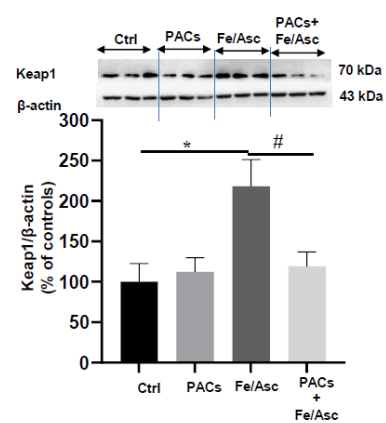
**PUBLISHED FIGURES 2 AND 4
KEAP1 (PANEL 2E), WHICH IS WRONG, AND PPAR γ (PANEL 4F) ARE SIMILAR**



**PUBLISHED VERSION OF
KEAP1 (Figure 2E)**

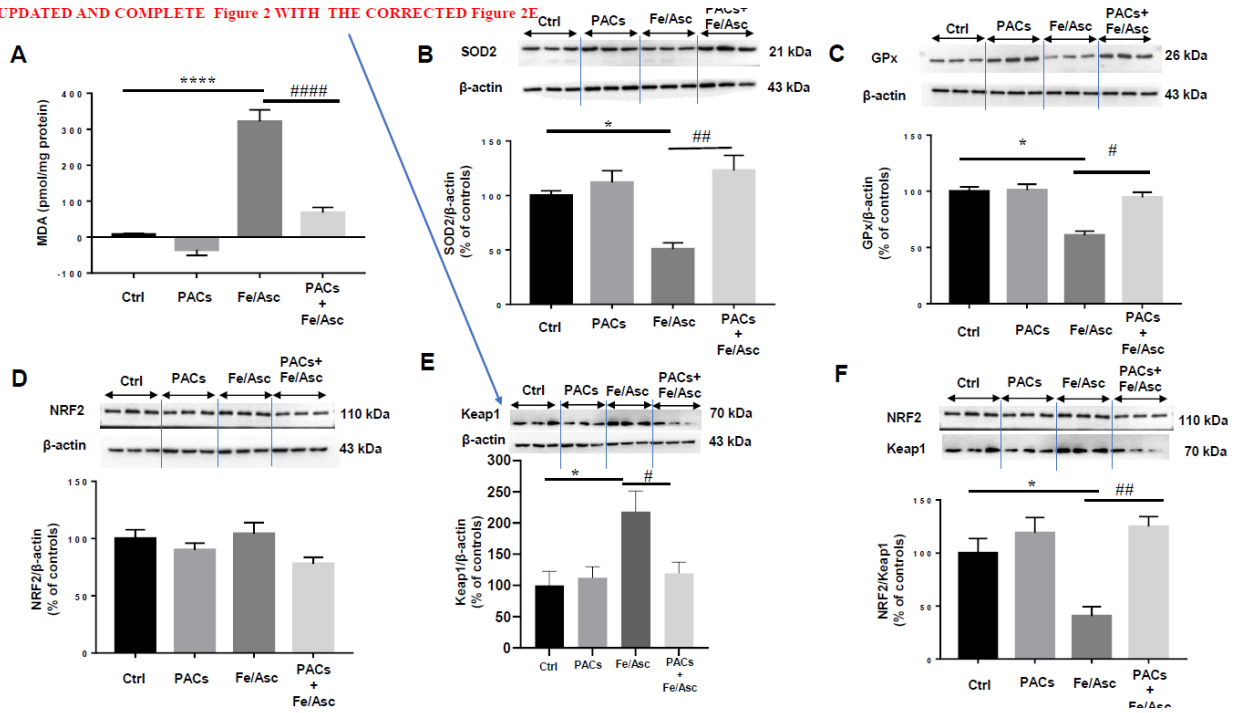


**CORRECTED AND UPDATED
VERSION OF KEAP1 (Figure 2E)**



Corrigendum to 'Intestinal protection by proanthocyanidins involves anti-oxidative and anti-inflammatory actions in association with an improvement of insulin sensitivity, lipid and glucose homeostasis,' *Sci Rep* 2021 Feb 16;11(1):3878 An error occurred during the assembly of figures, specifically at the Keap1 level in Panel F of Figure 2. Unfortunately, the authentic blot of Keap1 in Panel F of Figure 2 was mistakenly substituted with the PPAR γ blot from Figure 4, Panel F. We have diligently rectified this error by incorporating the accurate Keap1 blot in Panel F of Figure 2. It is crucial to note that there was no confusion with beta-actin. Importantly, upon reevaluation and subsequent recalculations, we can affirm that the essence and interpretation of the data in the Panel 4F remain unaltered.

UPDATED AND COMPLETE Figure 2 WITH THE CORRECTED Figure 2E



Experiment1		actin		Ratio
Keap1 (1)				
Lane No.	Adj. Total Band Vol. (Int)	Adj. Total Band Vol. (Int)	Keap1/actin	
ctrl1	1	1652136	6154960	0,268423515
ctrl2	2	2631616	6149026	0,42797282
ctrl3	3	3114693	5418024	0,574876191
PACs1	4	1202760	5885560	0,204357784
PACs2	5	648175	3613896	0,179356296
PACs3	6	986362	5376670	0,183452211
FeAsc1	7	4355991	6268941	0,694852767
FeAsc2	8	4648336	6898932	0,673776173
FeAsc3	9	4224836	6016650	0,702190754
PACs+FeAsc1	10	2460874	7528144	0,326889868
PACs+FeAsc2	11	1943625	7352829	0,264337033
PACs+FeAsc3	12	2340184	7853748	0,297970345

The values are pixels generated from a scan analysis using image lab program from BioRad

The experiments are carried out in triplicate as shown in line A. Lane F represents the ratio of Keap1 (L

Experiment2		actin		Ratio
Keap1 (2)				
Lane No.	Adj. Total Band Vol. (Int)	Adj. Total Band Vol. (Int)	Keap1/actin	
ctrl1	1	1044775	2290548	0,456124473
ctrl2	2	800745	2347548	0,341098457
ctrl3	3	710684	2186242	0,325071058
PACs1	4	1516504	1955874	0,77535874
PACs2	5	1472460	2101294	0,700739639
PACs3	6	1221000	2185600	0,558656662
FeAsc1	7	4186024	4339800	0,964566109
FeAsc2	8	4317232	4350537	0,992344623
FeAsc3	9	4703318	4233202	1,111054469
PACs+FeAsc1	10	3765875	5900275	0,638254149
PACs+FeAsc2	11	3241275	5708392	0,567808763
PACs+FeAsc3	12	4034888	5911232	0,682579875

The values are pixels generated from a scan analysis using image lab program from BioRad

The experiments are carried out in triplicate as shown in line A. Lane K represents the ratio of Keap1 (L

Mean calculation of the two different experiments				
	ctrl	PACs	Fe/Asc	PACs+Fe/Asc
Exp.1	0,268423515	0,204357784	0,694852767	0,326889868
	0,42797282	0,179356296	0,673776173	0,264337033
	0,574876191	0,183452211	0,702190754	0,297970345
Exp.2	0,456124473	0,77535874	0,964566109	0,638254149
	0,341098457	0,700739639	0,992344623	0,567808763
	0,325071058	0,558656662	1,111054469	0,682579875

	CTRL		PACs			Fe/Asc
	Mean	SEM		Mean	SEM	Mean
Exp1		100	29,53205015	44,61406006	9,49389699	162,8934505
Exp2		100	15,60269684	181,3032109	26,24439833	273,3655555
Means		100	22,56737349	112,9586355	17,86914766	218,129503

Article 2

Cranberry Proanthocyanidins as a Therapeutic Strategy to Curb Metabolic Syndrome and Fatty Liver-Associated Disorders

Francis Feldman, Mireille Koudoufio, Ramy El-Jalbout, Mathilde Foisy Sauvé, Lena Ahmarani, Alain Théophile Sané, Nour-El-Houda Ould-Chikh, Thierry N'Timbane, Natalie Patey, Yves Desjardins, Alain Stintzi, Schohraya Spahis and Emile Levy

Article publié dans la revue Antioxydants en décembre 2022

Cet article répond à nos objectifs 2 et 3

L'étudiante a contribué à la planification des expériences, à la collecte des données, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article.

Cranberry Proanthocyanidins as a Therapeutic Strategy to Curb Metabolic Syndrome and Fatty Liver-Associated Disorders

Francis Feldman ^{1,2,†}, Mireille Koudoufio ^{1,2,†}, Ramy El-Jalbout ^{1,3}, Mathilde Foisy Sauvé ^{1,2}, Lena Ahmarani ¹, Alain Théophile Sané ¹, Nour-El-Houda Ould-Chikh ¹, Thierry N'Timbane ¹, Natalie Patey ^{1,4}, Yves Desjardins ⁵, Alain Stintzi ⁶, Schohraya Spahis ^{1,7} and Emile Levy ^{1,2,*}

¹ Research Centre, Sainte-Justine University Health Center, Montreal, QC, H3T 1C5, Canada;

² Department of Nutrition, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada

³ Department of Radiology, Université de Montréal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

⁴ Department of Pathology, Université de Montréal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

⁵ Institute of Nutrition and Functional Foods, Laval University, Quebec, QC, G1V 4L3, Canada

⁶ Department of Biochemistry, Microbiology, and Immunology, Faculty of Medicine, Ottawa Institute of Systems Biology, University of Ottawa, Ottawa, ON, K1H 8M5, Canada

⁷ Department of Biochemistry & Molecular Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada

* Correspondence: emile.levy.hsj@ssss.gouv.qc.ca; Tel.: +1-(514)-345-7783

† Both authors have contributed equally.

Abstract: While the prevalence of metabolic syndrome (MetS) is steadily increasing worldwide, no optimal pharmacotherapy is readily available to address its multifaceted risk factors and halt its complications. This growing challenge mandates the development of other future curative directions. The purpose of the present study is to investigate the efficacy of cranberry proanthocyanidins (PACs) in improving MetS pathological conditions and liver complications; C57BL/6J mice were fed either a standard chow or a high fat/high sucrose (HFHS) diet with and without PACs (200 mg/kg), delivered by daily gavage for 12 weeks. Our results show that PACs lowered HFHS-induced obesity, insulin resistance, and hyperlipidemia. In conjunction, PACs lessened circulatory markers of oxidative stress (OxS) and inflammation. Similarly, the anti-oxidative and anti-inflammatory capacities of PACs were noted in the liver in association with improved hepatic steatosis. Inhibition of lipogenesis and stimulation of beta-oxidation could account for PACs-mediated decline of fatty liver as evidenced not only by the expression of rate-limiting enzymes but also by the status of AMPK α (the key sensor of cellular energy) and the powerful transcription factors (PPAR α , PGC1 α , SREBP1c, ChREBP). Likewise, treatment with PACs resulted in the downregulation of critical enzymes of liver gluconeogenesis, a process contributing to increased rates of glucose production in type 2 diabetes. Our findings demonstrate that PACs prevented obesity and improved insulin resistance likely via suppression of OxS and inflammation while diminishing hyperlipidemia and fatty liver disease, as clear evidence for their strength of fighting the cluster of MetS abnormalities.

Keywords: proanthocyanidins; metabolic syndrome; insulin resistance; hyperlipidemia; oxidative stress; inflammation

1. Introduction

The metabolic syndrome (MetS) reflects a constellation of cardiometabolic risk factors that increase cardiovascular diseases (CVD) [1]. This growing scourge is partly attributed to poor nutritional habits and a sedentary lifestyle, which may lead to obesity, dyslipidemia, insulin resistance (IR) and cardiovascular disorders, such as metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) and type 2 diabetes [2–4]. The mismanagement of MetS or failure to blunt its progression represents a compelling challenge for any modern society and healthcare system, with a worldwide prevalence estimated at 30% in 2021 [5]. Not only is knowledge of the putative mechanisms necessary to curb the MetS, but it is also mandatory to uncover optimal therapeutic agents capable of targeting the set of symptoms. Since nutrition represents the first-line treatment in most cardiometabolic disorders [1], it is plausible that the inclusion of functional foods and bioactive phytonutrients (i.e., polyphenols) in the day-to-day regimen could prove a promising strategy. It should be noted that several studies have already emphasized the prophylactic effects of polyphenol-enriched fruit extracts on human metabolic disorders [6–11].

As bioactive molecules, polyphenols play a significant role in many physiological and metabolic processes, partly due to their antioxidant, anti-inflammatory, and lipid-lowering properties [12,13]. Their preventive and curative actions were outlined in various chronic illnesses, including oncologic, neurodegenerative, infectious, metabolic, and CVD [14–17]. Despite the wide popularity of their phenolic components, the mechanisms of action are not well understood. In recent years, berries have piqued interest due to their high content in polyphenolic compounds in association with health benefits [15,18–21]. These small, pulpy fruits, namely Aronia, grape, sea, buckthorn, blue-, red- and cranberries, are rich in anthocyanins, proanthocyanidins (PACs), phenolic acids and flavonols [22]. Among the flavonoids, PACs, representing complex and colourless polymers of flavan-3-ol monomer units (e.g., catechin and epicatechin), are endowed with broad health promoting activities while conferring flavor and displaying nutritional values [23–25]. Additionally, health-relevant attributes described for berries were ascribed to polyphenols despite their content enriched in other nutritive compounds such as polysaccharides, vitamins, fatty acids, amino acids, nucleosides, essential minerals, and dietary fibers [20,26].

Moreover, differences in the beneficial influence of diverse berry species depend on the composition of their PACs content due to their distribution areas and climate.

Cranberries are unique among fruits as they have high content of polyphenolic compounds with a wide range of biological effects [27,28]. Our ability in isolating small, medium, and high molecular mass polyphenols from cranberries allowed us to freshly compare their anti-oxidative and anti-inflammatory properties, and their potential to regulate mitochondria dysfunction and oxidative stress (OxS) in intestinal Caco-2/15 cells [29]. Recently, we succeeded in purifying the cranberry-PAC fraction to highlight the mechanisms modulating insulin sensitivity and metabolic pathways in intestinal Caco-2/15 cells [30]. Despite the relative simplicity and experimental control of *in vitro* models, the importance of evaluating the physiological role of PACs *in vivo* is essential for capturing the inherent complexity of organ systems and ultimately facilitating translatability to humans. Therefore, the present study explores the potential amelioration of cardiometabolic risk factors by PACs in C57BL/6 mice, maintained on an obesogenic high fat/high sucrose (HFHS) diet.

2. Materials and Methods

2.1. Purification and Characterization of PAC Polymeric Fraction

Cranberry powdered extract was obtained from Diana Food Canada (Champlain, Quebec, Canada) [18]. The composition of the extract is described in Supplementary Table S1.

2.2. Animals

All studies and experimental procedures were conducted according to the guidelines of the animal care committee of CHU Sainte-Justine (Montreal, Quebec, Canada). Eight-week-old C57BL/6J male mice (Charles River; Montreal, QC, Canada) were housed in a controlled environment (23 °C; 12/12 h light-dark) with free access to food and drinking water. Following one week of acclimation on a standard diet, mice were fed either a chow (Teklad, 2018, Envigo) or HFHS (D17032403, Research Diets). Three groups were formed: Chow, HFHS and HFHS + PACs (daily doses: 200 mg/kg body weight). Of note, Chow and HFHS-nourished mice received the vehicle (water) by gavage to comply with HFHS-fed mice treated with PACs. Body weight gain and

food intake were assessed twice a week. After 12 weeks on dietary regimens, animals were fasted overnight, anesthetised with isoflurane and euthanized by cardiac puncture. Blood was drawn in EDTA-treated tubes and immediately centrifuged (3000× g for 20 min at 4 °C) to separate plasma from cells. Adipose tissues (from perirenal, epididymal, inguinal and mesenteric regions), intestine and liver were carefully collected and weighted, then immediately flash-frozen in liquid nitrogen and finally stored at –80 °C until further analysis. Importantly, there is a real distinction between measurements of adipose tissue and other organs such as the liver and intestine. Each adipose tissue region was separately collected and weighed, allowing the distribution of the overall adipose tissue to be established. Subsequently, all the weights of the individual fat tissues were added together to determine the total amount of adipose tissue. Importantly, the liver and gut were treated separately.

2.3. Glucose Homoeostasis

At week 8, animals were fasted for 6 h and then an insulin tolerance test (ITT) was performed after an intraperitoneal injection of insulin (0.75 UI/kg body weight). Blood glucose concentrations were measured with an Accu-Check glucometer (Bayer) before (0 min) and after (5, 10, 15, 20, 25, 30 and 60 min) insulin injection. At the end of week 10, following an overnight fast, an oral glucose tolerance test (OGTT) was performed after gavage with glucose (1 g/kg body weight). Blood was collected before (0 min) and after (15, 30, 60, 90 and 120 min) glucose challenge for glycaemia determination. Additionally, blood samples (~60 µL) were collected at each time point during OGTT for measurement of insulinemia using an ultrasensitive ELISA kit (Merckodia Ultrasensitive insulin ELISA, Sweden). The homeostatic model assessment for IR (HOMA-IR) index was then calculated using the following formula: fasting insulinemia (µUI/mL) × fasting glycemia (mM)/22.5.

2.4. Biochemical Analysis

Concentrations of plasma triglycerides (TG) and total cholesterol (TC) were quantified using commercial kits (Randox Laboratories, Crumlin, UK; Fujifilm Wako, Lexington, KY, USA). For lipoprotein isolation, unfrozen whole plasma samples were initially pooled, then submitted to sequential gradient ultracentrifugation for lipoprotein separation using a TLA-110 rotor in an

Optima™ MAX Ultracentrifuge (Beckman Coulter Life Sciences Headquarters, Indianapolis, Indiana 46268, United States). Briefly, centrifugations were operated at 4 °C for isolation of Very low-density lipoprotein (VLDL:1.006 g/mL, 90,000 RPM, 3 h) and High-density lipoprotein (HDL: 1.21 g/mL, 40,000 rpm 48 h). Following separation, lipoprotein fractions were frozen at –80 °C for further analysis. Plasma lipopolysaccharide (LPS, MyBioSource, San Diego, CA, USA), F2-isoprostane levels and malondialdehyde (MDA) concentration were assessed as described previously [31].

2.5. Hepatic Lipid Analysis and Histology

Liver specimens were homogenized and lipids were isolated following Folch chloroform-methanol extraction [32]. Liver triglycerides and cholesterol were measured and assessed using commercial kits (Randox laboratories). For tissue histology, the liver specimens were fixed in 10% formalin overnight and then embedded in paraffin. Sections were obtained with a microtome and immediately stained with hematoxylin-eosin, and examined by light microscopy. Images of the stained tissues were captured with a Zeiss Imager A1. For the tissue histology, the liver specimens were fixed in 10% formalin overnight and then embedded in paraffin. Sections (3 µm) were obtained with a microtome and immediately stained with hematoxylin-eosin, and examined by light microscopy. Images of the stained tissues were captured with a Zeiss Imager A1 and measurements were evaluated with the Axiovision software [31].

2.6. Western Blot Analysis

Liver samples (0.1 g) were first homogenized in 1 mL of Ripa cell lysis buffer containing NP-40 (0.5%). Protein concentration was determined using the Bradford method (Bio-Rad) with bovine serum albumin as a standard. Following denaturation in SDS/β-mercaptoethanol sample buffer, 15 µg-proteins were run in 10% SDS-polyacrylamide gels and then electroblotted on nitrocellulose membranes. Fat-free milk was used for the initial blocking of non-specific sites, followed by overnight incubation at 4 °C with the following primary antibodies at 1/1000 dilution unless otherwise specified: Sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP1c), Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) from Cayman Chemical); Fatty acid synthase (FAS), Acetyl-CoA carboxylase (ACC), AMP-activated protein kinaseα (AMPKα) and its phosphorylated

form Phosphorylated AMPK α Thr172 (p-AMPK α), Carnitine palmitoyl transferase 1 isoform A (CPT1A), Inhibitor of kappa B (I κ B; 1/500) from Cell signalling; Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC1 α), Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF2) from Abcam; Superoxide dismutase 2 (SOD2), Carbohydrate response element binding protein (ChREBP), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from Invitrogen; Glutathione peroxidase 1 (GPx), Cyclooxygenase-2 (COX-2) from Novus Biologicals; Nuclear factor kappa B (NF- κ B; 1/250), Glucose 6-phosphatase (G6Pase), Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) from Santa Cruz Biotechnology; Phosphorylated acetyl-CoA carboxylase Ser79 (p-ACC; 1/500, Millipore); Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α ; ThermoFisher scientific) and β -actin (1/250,000; Sigma-Aldrich). Bands were captured and analyzed using a Chemidoc ImagingSystem coupled with an Image Lab software (Bio-Rad). For every protein of interest, β -actin or GAPDH was used for normalization of protein expression. Importantly, the results are most accurate when the forms of the protein of interest (total and phosphorylated) are applied to the same blot, and thus share the same β -actin. However, in order not to use stripping and reprobing procedure of the same membrane, which sometimes decreases the resolution, we loaded both forms of protein (total and phosphorylated for ACC and AMPK α) in different blots in some cases. Each of the forms was evaluated against its β -actin, before dividing the results of the phosphorylated form by the total form. Regarding the evaluation of NF- κ B and I κ B, the two proteins were developed using a same membrane with the housekeeping gene (GAPDH). The results thereby present each individual protein expression for comparison as well as the combined ratio.

2.7. Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. For three-group comparison, statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with a post hoc Bonferroni multiple comparison test; for two-group comparison, Student *t*-Test was used. All statistical analyses were performed on IBM SPSS version 26.0 (IBM, Armonk, New York, 2020). Results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. PACs and Obesity

To determine the effect of PACs on diet-induced obesity, male mice were fed with either a chow or a HFHS diet for 12 weeks. As noted in Figure 1A, from the beginning of feeding (week 1) to sacrifice (week 12), the HFHS-diet administration significantly increased body weight (152%) as compared to the chow group (121%). However, treatment with PACs lessened HFHS-mediated weight gain (140%, $p < 0.001$), independently of the total energy intake (Figure 1B). The same profile was observed in total adiposity and fat mass distribution (Figure 1C,D). However, no marked alterations were observed in gut (Figure 1F) and liver weight of HFHS-fed mice in response to PACs (Figure 1E). Thus, our results show that PACs exert an anti-obesity effect in a HFHS-treated murine model.

3.2. PACs and Glucose Dysmetabolism

We determined the influence of PACs on glucose homeostasis and insulin sensitivity at week 8 in fasted animals. At the outset, we proceeded with the ipITT, designed to appraise the sensitivity of insulin responsiveness over time via blood glucose measurement, and following a bolus of intraperitoneal insulin. The HFHS group exhibited higher glucose levels during ipITT starting 5 min after insulin injection, reflecting decreased insulin sensitivity, whereas PACs-fed HFHS mice expressed a lower glycemic profile, indicating an improvement in insulin sensitivity (Figure 2A,B). The OGTT, performed at week 10, disclosed a similar glycemic pattern (Figure 2C,D) with a significant effect of PACs on insulinemia (Figure 2E,F) as well as HOMA-IR index measurement (Figure 2G). In fact, PACs strongly prevented HFHS-mediated IR as reflected by the decline of plasma insulin levels and HOMA-IR index, two effective indicators of glucose homeostasis.

3.3. PACs and Lipid Metabolism

Mice fed a HFHS diet manifested dyslipidemia as reflected by higher lipid profile in plasma TG (Figure 3A) and TC (Figure 3B) as well as TG and TC in VLDL contents (Figure 3C,D) and non-HDL-cholesterol (Figure 3E). The administration of PACs alleviated HFHS-mediated dyslipidemia, with an elevated trend in levels of HDL-cholesterol (Figure 3F).

3.4. Impact of PACs on Circulatory Markers of Endotoxemia and Lipid Peroxidation

Since inflammation and OxS represent key factors in the induction of obesity and IR, we analyzed their basal systemic levels through their plasma biomarkers. As shown in Figure 4A, HFHS-diet contributed to raise the plasma LPS levels, a trigger of intestinal permeability and endotoxemia. While HFHS caused an accretion of LPS, PACs alleviated diet-induced LPS levels. We subsequently evaluated the status of F2-isoprostane and MDA (Figure 4B,C), two lipid peroxidation markers. Treatment with PACs normalized MDA and F2-isoprostane concentrations.

3.5. Effects of PACs on Lipid Accumulation in the Liver

A liver histologic examination of male mice under HFHS diet showed a vast number of fat droplets of different sizes, suggesting an increased lipid accumulation compared to chow group. However, PACs-treatment reduced lipid accumulation, thereby alleviating hepatic steatosis (Figure 5A,C). Lipid determinations confirmed these observations given that PACs reduced TG (Figure 5D) and TC (Figure 5E) in the liver of HFHS-treated mice.

3.6. PACs and Dysregulation of Hepatic Lipid Metabolism-Associated Proteins in HFHS-Treated Mice

Having established key physiological and metabolic consequences of a HFHS diet and in order to better reveal PACs-mediated alleviations, we directed our following investigations as a two-group comparison. As HFHS and PACs dynamically modified fat content in the liver, it appeared reasonable to assess hepatic lipid metabolism while focusing on the mechanisms of action. We first analyzed a key lipogenic enzyme involved in lipid synthesis, namely ACC which catalyzes the ATP-dependent carboxylation of acetyl coenzyme A to form malonyl-CoA. Although a decreased trend was observed, the results of ACC protein expression never yielded statistical significance. To give more strength to our results, we increased the number of animals from $n = 4$ to $n = 8$, and still the results did not show significant differences. Nevertheless, PACs promoted the phosphorylation level of ACC (p-ACC) protein, as reflected by the increased p-ACC/ACC ratio (Figure 6C), known to inhibit hepatic lipogenesis. Consistently, PACs reduced the protein expression of FAS (Figure 6D), the second central enzyme of lipogenesis by catalyzing the conversion of malonyl CoA to palmitate. As ACC and FAS are downstream target proteins of

SREBP1c and ChREBP, we evaluated the protein mass of these powerful transcription factors and noted their downregulation in response to PACs treatment (Figures 6E and 8C), respectively. Overall, these data emphasize the role of PACs in potentially modulating lipid metabolism by reverting lipid accumulation in the liver and associated complications.

A second way to decrease excessive lipid levels in the liver may originate from the increment of mitochondrial fatty acid (FA) β -oxidation. To test this hypothesis, we measured the expression of CPT1A, the rate-limiting enzyme of FA β -oxidation. Treatment with PACs significantly enhanced CPT1A protein mass (Figure 6F) as well as PPAR α and PGC-1 α , two transcription factors regulating mitochondria dysfunction and biogenesis (Figure 6F–H) in the liver of HFHS-fed mice. These findings support the beneficial effects of PACs in regulating mitochondrial biogenesis and function. Moreover, since AMPK α represents a key regulator of FA β -oxidation and lipogenesis, we investigated its phosphorylation level, which inactivates ACC and induces CPT1A. As illustrated in Figure 6I–K, the administration of PACs resulted in the increase of AMPK α phosphorylation (p-AMPK α) as shown with the p-AMPK α /AMPK α ratio, suggesting energy homeostasis with an impact on lipogenesis and FA β -oxidation.

3.7. Impact of PACs on Inflammation and OxS

As the pathogenesis of obesity, MetS and MAFLD implicate inflammation and OxS, it was imperative to assess their liver biomarkers. Our experiments documented the capacity of PACs to lower the protein expressions of COX-2 and TNF- α , as well as of NF- κ B, a potent mediator of inflammatory responses (Figure 7), as confirmed by the low NF- κ B/I κ B ratio (Figure 7E).

We then turned to probe the effects of PACs on OxS, which allowed us to observe an increase in the protein mass of the hepatic antioxidant enzymes GPx and SOD2 (Figure 7F,G). We also confirmed a PACs-mediated rise in the levels of NRF2, the robust endogenous antioxidant regulator implicated in cellular redox homeostasis (Figure 7H). Collectively, our data validate the potential of PACs to act as powerful repressors of inflammation and OxS.

3.8. PACs and Amplified Gluconeogenesis in the Liver of HFHS-Fed Mice

As impairment of hepatic glucose homeostasis plays a crucial role in the pathogenesis of CVD, we examined the gluconeogenic pathway through its rate-limiting enzyme expressions. Our data clearly showed the ability of PACs to downregulate G6Pase (Figure 8A) and PEPCK (Figure 8B) protein loads, thereby contributing to limiting hepatic gluconeogenesis.

4. Discussion

Fruits and vegetables contain large phytochemicals with health-promoting potential. Among them, cranberries constitute a great source of polyphenols, notably PACs which are considered as promising bioactive molecules against chronic ailments. Since PACs stand out from the variety and high number of polyphenols because of their therapeutic impacts on chronic disorders [15,33], efforts have been deployed in the present investigation to examine their potential role in improving metabolic health and liver steatosis using a MetS mouse model. Our findings emphasize the effectiveness of PACs to protect against diet-induced obesity (via marked reduction of adiposity), IR (as documented by alleviation of insulinemia, OGTT, ipITT and HOMA-IR), and hyperlipidemia/hyperlipoproteinemia (pending the homeostasis of cholesterolemia, hypertriglyceridemia, VLDL-TG, VLDL-TC, non-HDL-cholesterol), the increase of which is known as a MetS manifestation. In addition, our findings highlighted the capacity of PACs to lower plasma markers of OxS and inflammation, regarded as promoters of IR. Moreover, beneficial effects of PACs were observed in fighting liver pathogenesis when considering the histologic and biochemical reduction of lipid deposition in association with the diminution of hepatic OxS and inflammation, downregulation of lipogenic enzymes and upregulation of fatty acid (FA) β -oxidation through regulation of powerful transcription factors. Clearly, PACs attenuated MetS features and improved liver pathogenesis.

Our findings demonstrated that HFHS-PACs-fed mice disclosed a reduction of weight gain and a curtailment of body fat expansion. This anti-obesogenic effect was unrelated to total energy intake, thereby excluding the involvement of central appetite pathways. Plausible mechanisms triggered by PACs could include (i) the binding of carbohydrates and proteins, thereby affecting their intestinal absorption [34,35]; (ii) inhibition of carbohydrate digestion and glucose absorption

in the gut [36]; (iii) reduction in lipid emulsion and absorption in the gastrointestinal tract, consequently lowering calorie intake [37]; (iv) regulation of signalling pathways related to energy metabolism and adipogenesis [38,39]; (v) modifications of gut microbiota [40,41]; (vi) inhibition of the differentiation and proliferation of preadipocytes [42]; and (vii) induction of lipolysis and lipid metabolism [42]. Our results agree with an earlier report on the anti-obesogenic effects of cranberry PACs [28]. Further studies are obviously needed to reveal the precise mechanisms by which PACs produce adipose tissue remodeling and counteract obesity, thus providing further insight into the regulation of MetS development.

One of the purposes of our studies was to investigate the effects of PACs on IR, which represents a dominant trait of MetS [43] and a key process in the onset of type 2 diabetes [44,45]. Our observations pointed out that PACs attenuated intolerance to a glucose load via the prevention of IR as exhibited by our experiments. Probably, the mechanisms are represented by the protective effects of PACs-based treatment against OxS and inflammation, two interrelated factors impairing insulin action and mediating IR. As such, the beneficial impact of PACs on IR may originate from the downsizing of adipose tissue expansion that is able to disrupt the balance of its local by-products (i.e., adipokines) and consequently promote IR [46–48].

As revealed from our data, PACs display hypolipidemic effects as they relieved HFHS-mediated hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia, and lessened mouse VLDL vehicles. Given that mice display low concentrations of low-density lipoprotein (LDL), we calculated non-HDL-cholesterol value, a more accurate and reliable depiction of atherosclerotic risk, as it encompasses all apolipoprotein-B containing lipoproteins, while representing a steadier parameter and predictor of LDL-cholesterol for hardening of the arteries [49,50]. Our experiments showed the effective potential of PACs to normalize HFHS-mediated elevated non-HDL-cholesterol concentrations. Although validation of our observations should be obtained in genetically modified mice (with LDL receptor or apolipoprotein E knockout, known to develop atherosclerosis), our findings clearly highlighted hyperlipidemia repression by PACs.

Our experiments provide evidence of the direct action of PACs at least on three MetS risk factors such as obesity, IR and dyslipidemia, as well as OxS and inflammation, two well-defined entities

tied to MetS and CVD pathogenesis [51]. Since MAFLD has been redefined as a dysfunction associated with MetS [52,53], it was important to highlight the effects of PACs on MAFLD progression in our mouse model of dietary-induced MetS. Consistent with the improvement of ipITT (reflecting insulin sensitivity of the whole body, including liver), there were less HFHS-induced fat deposition and decreased TG and TC levels in response to PACs. Considering the relationship between liver steatosis and raised lipogenesis to the detriment of FA β -oxidation, we explored the role of PACs on these pathways by targeting their crucial regulating enzymes. Our observation was that PACs treatment led to lipogenic pathway alteration and β -oxidation activation. By which mechanisms were the expression of FA β -oxidation-related gene (CPT1A) enhanced, and the mass of lipogenic proteins (ACC and FAS) attenuated in the liver? According to our results, PACs downregulated the transcription factors, SREBP1c and ChREBP, necessary for the induction of the lipogenic genes and fatty liver development under hyperinsulinemia and a high-carbohydrate diet [54–56].

Interestingly, PACs were also able to activate AMPK α , a metabolic sensor of energy homeostasis, which exerts simultaneous influence on lipogenesis and FA β -oxidation checkpoints.

AMPK α activation by PACs likely resulted in ACC inhibition and CPT1A stimulation through their respective phosphorylation in the liver. The phosphorylated form of AMPK α (p-AMPK α) appears unchanged as described in the Results section. However, total form (AMPK α) is decreased following PAC supplementation, which leads to an increase in the p-AMPK α /AMPK α ratio in response to PACs. This significant increase shows that p-AMPK α is in advantageous quantity compared to total AMPK α molecules, which allows a higher stimulatory activity of AMPK α . It is usually the p-AMPK α /AMPK α ratio that is appreciated in the scientific literature.

To complete the protective mechanisms elicited by PACs for the prevention of liver fat deposition, we analyzed the protein masses of PPAR α and PGC1 α , two powerful proteins regulating mitochondrial biogenesis and function [57]. In fact, PACs enhanced PPAR α , which is intrinsically involved in the uptake and oxidation of fatty acids via upregulation of CPT1A (critical for mitochondrial fatty acyl import). PACs also raised the PGC1 α nuclear protein known as a transcriptional coactivator of PPAR α and as a regulator for the stimulation of mitochondrial

biogenesis and oxidative capacity. Therefore, it is reasonable to propose that PACs decrease the abundance of intrahepatic lipids by orchestrating the decline of de novo lipogenesis and increment of FA β -oxidation through the modulation of AMPK α /SREBP1c, ChREBP/ACC/FAS/CPT1A and PGC1 α /PPAR α /CPT1A signalling pathways.

Further investigations in the liver revealed that PACs thwarted PEPCCK and G6Pase protein expression, thus limiting gluconeogenesis and glucose release. This effect may result from the modulation by ChREBP, a metabolic regulator that controls both lipid and glucose metabolism [58–60], mainly expressed in active sites of de novo lipogenesis such as liver and white and brown adipose tissues [61].

PACs treatment resulted in reduced protein expression of pro-inflammatory TNF- α , known as a modulator of the immune system as it facilitates intercellular communication, proliferation, survival, differentiation, and apoptosis of leucocytes. Validation was obtained by decreased expression of COX-2, considered a crucial determinant of downstream mediators, which are detrimental to tissue integrity and contribute to liver damage [62]. The downregulation of these inflammatory agents by PACs is likely due to their action on the activation/suppression of NF- κ B, the most prominent transcription factor of liver inflammation [63].

In response to PACs administration, there was a rise in endogenous GPx and SOD2, reflecting an improved antioxidant defense. PACs consistently upregulated NRF2, the central transcription factor that initiates the transcription of cytoprotective genes following binding to specific DNA sites termed antioxidant response elements [64]. In line with this finding, treatment with PACs led to enhanced protein expression of the transcriptional co-activator PGC-1 α that favors NRF2 induction, which could better promote endogenic hepatic defenses through antioxidative protection and mitochondrial biogenesis [65,66]. These data provide evidence of the protective effect of PACs via regulation of PGC-1 α –NRF2.

The daily dose of 200 mg/kg in mice would translate to 16 mg/kg/day in humans [67], corresponding to 1120 mg/day of PACs for a person weighing 70 kg. To achieve this intake, one would have to consume roughly 350 g of cranberries [68]. However, it must be stressed that the consumption of whole cranberries implies an amalgam of several polyphenols, while the aim of

this paper focuses on examining the impact of a purified PAC supplementation. In this context, the present work represents a very good contribution to the advancement of knowledge on the action of the PAC class.

Collectively, the findings of this research exhibit promising efficiency of PACs in alleviating diet-induced MetS conditions, which have become highly severe health problems. PACs reversed weight gain by curtailing adipose tissues in different sites, ameliorated inflammation- and oxidative stress-induced insulin resistance while maintaining glucose homeostasis and relieving hyperlipidemia, a fundamental risk factor for cardiovascular diseases. Furthermore, modulation by PACs of transcription factors governing metabolic pathways related to lipid metabolism, notably lipogenesis and β -oxidation, significantly suppressed hepatic lipid deposition and attenuated HFHS-mediated MAFLD. Therefore, our data provide support for the role of PACs as functional food in the battle against MetS and MAFLD. These results should be approached with caution, however, as the mechanisms highlighted in our experimental model represent probably just a segment of the metabolic disruptions associated with both MetS and MAFLD. Furthermore, whether PACs can display the same metabolic impact in humans clearly requires thorough clinical investigations.

5. Conclusions

Prevention and management of both MetS and MAFLD are currently costly and ineffective as the prevalence of these clusters continue to soar. Functional foods such as PACs could confer many advantages as multi-targeted agents in these disorders. In mice, PACs supplementation favors hepatic homeostasis and attenuation of metabolic disturbances defining the MetS and CVD.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: Cranberry PAC polymeric fraction characterization as well as the blots/gels for each independent biological replicate used in the quantitative analysis.

Author Contributions: E.L. conceived the experiments, F.F., M.K., R.E.J., M.F.S., L.A., A.T.S., N.-E.-H.O.-C., T.N. and N.P. conducted the experiments, F.F. analyzed the results, F.F., M.K., Y.D., A.T.S., A.S., S.S. and E.L. revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the J.A. DeSève Research Chair in Nutrition (E.L.), the Ontario Genomics Institute/Genome Canada/E8377 (E.L. & A.S) and NSERC-Diana Food Industrial Chair on prebiotic effects of polyphenols (401240871) (E.L. & Y.D.)

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of Research Centre/CHU Ste-Justine (protocol 2020–2750) for studies involving animals.

Informed Consent Statement: Not applicable

Data Availability Statement: All of the data is contained within the article and the supplementary materials.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of PAC on body weight gain, food intake and organs weight. Mice were fed either a standard chow diet or a high-fat, high-sucrose diet (HFHS) \pm 250 mg/kg polyphenol proanthocyanidin-rich fraction (PAC) body weight/day by gavage (HFHS + PAC) for 12 weeks. Chow diet and HFHS-fed mice were gavaged with a water vehicle. **(A)** body weight gain, **(B)** energy intake, **(C)** whole adipose tissue weight (as a total of collected fat pads) and **(D)** its tissue distribution, **(E)** liver and **(F)** gut weights were measured as described in Material & Method section. Results are presented as mean \pm SEM for $n = 12\text{--}16$ mice/group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. chows; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. HFHS mice.

Figure 2. Effect of PAC on glucose homeostasis and insulin resistance. After 8-week diet, mice were submitted to an intra-peritoneal **(A, B)** insulin tolerance test (ipITT) following a 6 h fast. At week 10, mice were then submitted to an **(C, D)** oral glucose tolerance test (OGTT) following an overnight fast to evaluate **(E, F)** insulinemia. **(G)** The Homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated as described in Material & Method section. Results are presented as mean \pm SEM for $n = 12\text{--}16$ mice/group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. chows; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. HFHS mice.

Figure 3. Effect of PAC on dyslipidemia and lipoprotein composition. After 12 weeks diet and before sacrifice, plasma was collected for lipid profile determination. (A) triglycerides (TG), (B) total cholesterol (TC) as well as (C) TG, (D) TC in triglyceride-rich lipoprotein fractions (TRL) content, (E) HDL-cholesterol and (F) non-HDL-cholesterol were analyzed as described in Material & Method section. Results are presented as mean \pm SEM for n = 4–6 pooled plasma/group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. chows; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. HFHS mice.

Figure 4. Impact of PAC in inflammatory and OxS markers in HFHS-fed mice. At sacrifice, plasma (A) lipopolysaccharide (LPS), (B) F2-isoprostanes and (C) malondialdehyde (MDA) concentrations were determined as described in Material & Method section. Results are presented as mean \pm SEM for n = 12–16 mice/group. ** $p < 0.01$ vs. chows; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. HFHS mice.

Figure 5. Effect of PAC on hepatic lipid accumulation. Representative images of hematoxylin phloxine saffron stained liver sections of (A) chow-, (B) high-fat, high-sucrose (HFHS) and (C) HFHS + PAC-fed mice for n = 4 mice/group; (D) Triglycerides and (E) total cholesterol content was quantified in liver tissue for n = 8 mice/group. Results are presented as mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. chows; ### $p < 0.001$ vs. HFHS mice.

Figure 6. PAC modulates hepatic lipid metabolism. Protein expression of pivotal biomarkers influencing lipid metabolism and biogenesis was determined in liver by Western blot as described in Material and Method section. (A) ACC, (B) p-ACC, (D) FAS, (E) SREBP1c, (F) CPT1A, (G) PPAR α , (H) PGC1 α , (I) AMPK α and (J) p-AMPK α protein mass was determined. (A) ACC and (B) p-ACC as well as (I) AMPK α and (J) p-AMPK α were blotted on separate gels and normalized using their respective β -actins; the (C) p-ACC/ACC and (K) p-AMPK α /AMPK α ratios were then calculated. Data are expressed as the mean \pm SEM for n = 4–8 mice/group/experiment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. HFHS mice. Each set of experiments, including the proteins of interest and their β -actin (as a reference protein and a loading housekeeping control) was run on the same gel. ACC: acetyl-CoA carboxylase; p-ACC: Phosphorylated-acetyl-CoA carboxylase; FAS: Fatty acid synthase; SREBP1c: Sterol regulatory element binding protein-1c; CPT1A: Carnitine palmitoyl transferase 1 isoform A; PPAR α : Peroxisome proliferator activated receptor alpha; PGC1 α :

Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha; AMPK α : AMP-activated protein kinase α ; p-AMPK α : Phosphorylated-AMP-activated protein kinase α .

Figure 7. Effect of PAC on inflammatory and OxS processes in liver HFHS-fed mice. The protein mass of **(A)** COX-2, **(B)** TNF- α , **(C)** NF- κ B and **(D)** I κ B was determined by Western blot as described in Material & Methods. Both **(C)** NF- κ B and **(D)** I κ B were blotted on the same gel and normalized using the same GAPDH; the **(E)** NF- κ B/I κ B ratio was then calculated. Moreover, the protein expression of the antioxidant defense biomarkers, namely **(F)** GPx, **(G)** SOD2 and the transcription factor nuclear factor **(H)** NRF2 were evaluated by Western blot as described in Material and Method section. Results are presented as mean \pm SEM for n = 4–8 mice/group/experiment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. HFHS mice. Each set of experiments, including the proteins of interest and their β -actin or GAPDH (as a reference protein and a loading housekeeping control) was run on the same gel.

Figure 8. PAC modulates glucose metabolism in liver HFHS-fed mice. Protein mass of **(A)** G6Pase, **(B)** PEPCK as well as the transcriptional factor **(C)** ChREBP was assessed by Western blot as described in Material & Methods. Data are expressed as the mean \pm SEM for n = 4–7 mice/group/experiment. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. HFHS mice. Each set of experiments, including the proteins of interest and their β -actin (as a reference protein and a loading housekeeping control) was run on the same gel. G6Pase: Glucose 6-phosphatase; PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxykinase; ChREBP: Carbohydrate response element binding protein.

References

1. Arnett, D.K.; Blumenthal, R.S.; Albert, M.A.; Buroker, A.B.; Goldberger, Z.D.; Hahn, E.J.; Himmelfarb, C.D.; Khera, A.; Lloyd-Jones, D.; McEvoy, J.W.; et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* **2019**, *140*, e596–e646. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000678>.
2. Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J.E.; Charlton, M.; Cusi, K.; Rinella, M.; Harrison, S.A.; Brunt, E.M.; Sanyal, A.J. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **2018**, *67*, 328–357. <https://doi.org/10.1002/hep.29367>.
3. Henry, L.; Paik, J.; Younossi, Z.M. Review article: The epidemiologic burden of non-alcoholic fatty liver disease across the world. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2022**, *56*, 942–956. <https://doi.org/10.1111/apt.17158>.
4. Byrne, C.D.; Targher, G. NAFLD: A multisystem disease. *J. Hepatol.* **2015**, *62*, S47–S64. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.012>.
5. Virani, S.S.; Alonso, A.; Aparicio, H.J.; Benjamin, E.J.; Bittencourt, M.S.; Callaway, C.W.; Carson, A.P.; Chamberlain, A.M.; Cheng, S.; Delling, F.N.; et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **2021**, *143*, e254–e743. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000950>.
6. Cires, M.J.; Wong, X.; Carrasco-Pozo, C.; Gotteland, M. The Gastrointestinal Tract as a Key Target Organ for the Health-Promoting Effects of Dietary Proanthocyanidins. *Front. Nutr.* **2016**, *3*, 57. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00057>.
7. Markoski, M.M.; Garavaglia, J.; Oliveira, A.; Olivaes, J.; Marcadenti, A. Molecular Properties of Red Wine Compounds and Cardiometabolic Benefits. *Nutr. Metab. Insights* **2016**, *9*, 51–57. <https://doi.org/10.4137/NMI.S32909>.

8. Fernandes, I.; Perez-Gregorio, R.; Soares, S.; Mateus, N.; de Freitas, V. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Molecules* **2017**, *22*, 292. <https://doi.org/10.3390/molecules22020292>.
9. Shimizu, M. Multifunctions of dietary polyphenols in the regulation of intestinal inflammation. *J. Food Drug Anal.* **2017**, *25*, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.003>.
10. Vetrani, C.; Vitale, M.; Bozzetto, L.; Della Pepa, G.; Cocozza, S.; Costabile, G.; Mangione, A.; Cipriano, P.; Annuzzi, G.; Rivellese, A.A. Association between different dietary polyphenol subclasses and the improvement in cardiometabolic risk factors: Evidence from a randomized controlled clinical trial. *Acta Diabetol.* **2018**, *55*, 149–153. <https://doi.org/10.1007/s00592-017-1075-x>.
11. Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>.
12. Koudoufio, M.; Desjardins, Y.; Feldman, F.; Spahis, S.; Delvin, E.; Levy, E. Insight into Polyphenol and Gut Microbiota Crosstalk: Are Their Metabolites the Key to Understand Protective Effects against Metabolic Disorders? *Antioxidants* **2020**, *9*, 982. <https://doi.org/10.3390/antiox9100982>.
13. Feldman, F.; Koudoufio, M.; Desjardins, Y.; Spahis, S.; Delvin, E.; Levy, E. Efficacy of Polyphenols in the Management of Dyslipidemia: A Focus on Clinical Studies. *Nutrients* **2021**, *13*, 672. <https://doi.org/10.3390/nu13020672>.
14. Levy, E.; Delvin, E.; Marcil, V.; Spahis, S. Can phytotherapy with polyphenols serve as a powerful approach for the prevention and therapy tool of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19)? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2020**, *319*, E689–E708. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00298.2020>.

15. Morissette, A.; Kropp, C.; Songpadith, J.P.; Junges Moreira, R.; Costa, J.; Marine-Casado, R.; Pilon, G.; Varin, T.V.; Dudonne, S.; Boutekrabort, L.; et al. Blueberry proanthocyanidins and anthocyanins improve metabolic health through a gut microbiota-dependent mechanism in diet-induced obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2020**, *318*, E965–E980. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00560.2019>.
16. Yeganeh, P.R.; Leahy, J.; Spahis, S.; Patey, N.; Desjardins, Y.; Roy, D.; Delvin, E.; Garofalo, C.; Leduc-Gaudet, J.P.; St-Pierre, D.; et al. Apple peel polyphenols reduce mitochondrial dysfunction in mice with DSS-induced ulcerative colitis. *J. Nutr. Biochem.* **2018**, *57*, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.03.008>.
17. Denis, M.C.; Roy, D.; Yeganeh, P.R.; Desjardins, Y.; Varin, T.; Haddad, N.; Amre, D.; Sane, A.T.; Garofalo, C.; Furtos, A.; et al. Apple peel polyphenols: A key player in the prevention and treatment of experimental inflammatory bowel disease. *Clin. Sci.* **2016**, *130*, 2217–2237. <https://doi.org/10.1042/CS20160524>.
18. Rodriguez-Daza, M.C.; Daoust, L.; Boutkrabort, L.; Pilon, G.; Varin, T.; Dudonne, S.; Levy, E.; Marette, A.; Roy, D.; Desjardins, Y. Wild blueberry proanthocyanidins shape distinct gut microbiota profile and influence glucose homeostasis and intestinal phenotypes in high-fat high-sucrose fed mice. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2217. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58863-1>.
19. Novotny, J.A.; Baer, D.J.; Khoo, C.; Gebauer, S.K.; Charron, C.S. Cranberry juice consumption lowers markers of cardiometabolic risk, including blood pressure and circulating C-reactive protein, triglyceride, and glucose concentrations in adults. *J. Nutr.* **2015**, *145*, 1185–1193. <https://doi.org/10.3945/jn.114.203190>.
20. Rodriguez-Mateos, A.; Heiss, C.; Borges, G.; Crozier, A. Berry (poly)phenols and cardiovascular health. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 3842–3851. <https://doi.org/10.1021/jf403757g>.
21. Basu, A.; Betts, N.M.; Ortiz, J.; Simmons, B.; Wu, M.; Lyons, T.J. Low-energy cranberry juice decreases lipid oxidation and increases plasma antioxidant capacity in women with

- metabolic syndrome. *Nutr. Res.* **2011**, *31*, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.02.003>.
22. Gavrilova, V.; Kajdzanoska, M.; Gjamovski, V.; Stefova, M. Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 4009–4018. <https://doi.org/10.1021/jf104565y>.
23. Dixon, R.A.; Xie, D.Y.; Sharma, S.B. Proanthocyanidins—A final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* **2005**, *165*, 9–28. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01217.x>.
24. Aron, P.M.; Kennedy, J.A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 79–104. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700137>.
25. Bagchi, D.; Bagchi, M.; Stohs, S.J.; Das, D.K.; Ray, S.D.; Kuszynski, C.A.; Joshi, S.S.; Pruess, H.G. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology* **2000**, *148*, 187–197. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00210-9](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00210-9).
26. Cassidy, A. Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Mol. Aspects Med.* **2018**, *61*, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.05.002>.
27. Anhe, F.F.; Nachbar, R.T.; Varin, T.V.; Vilela, V.; Dudonne, S.; Pilon, G.; Fournier, M.; Lecours, M.A.; Desjardins, Y.; Roy, D.; et al. A polyphenol-rich cranberry extract reverses insulin resistance and hepatic steatosis independently of body weight loss. *Mol. Metab.* **2017**, *6*, 1563–1573. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.10.003>.
28. Anhe, F.F.; Roy, D.; Pilon, G.; Dudonne, S.; Matamoros, S.; Varin, T.V.; Garofalo, C.; Moine, Q.; Desjardins, Y.; Levy, E.; et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* **2015**, *64*, 872–883. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307142>.

29. Denis, M.C.; Desjardins, Y.; Furtos, A.; Marcil, V.; Dudonne, S.; Montoudis, A.; Garofalo, C.; Delvin, E.; Marette, A.; Levy, E. Prevention of oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction in the intestine by different cranberry phenolic fractions. *Clin. Sci.* **2015**, *128*, 197–212. <https://doi.org/10.1042/CS20140210>.
30. Koudoufio, M.; Feldman, F.; Ahmarani, L.; Delvin, E.; Spahis, S.; Desjardins, Y.; Levy, E. Intestinal protection by proanthocyanidins involves anti-oxidative and anti-inflammatory actions in association with an improvement of insulin sensitivity, lipid and glucose homeostasis. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 3878. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80587-5>.
31. Sauve, M.F.; Feldman, F.; Koudoufio, M.; Ould-Chikh, N.E.; Ahmarani, L.; Sane, A.; N'Timbane, T.; El-Jalbout, R.; Patey, N.; Spahis, S.; et al. Glycomacropeptide for Management of Insulin Resistance and Liver Metabolic Perturbations. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1140. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091140>.
32. Auclair, N.; Sane, A.T.; Ahmarani, L.; Patey, N.; Beaulieu, J.F.; Peretti, N.; Spahis, S.; Levy, E. Sar1b mutant mice recapitulate gastrointestinal abnormalities associated with chylomicron retention disease. *J. Lipid Res.* **2021**, *62*, 100085. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100085>.
33. Wang, T.K.; Xu, S.; Li, S.; Zhang, Y. Proanthocyanidins Should Be a Candidate in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases and Lipid Metabolic Disorder. *Molecules* **2020**, *25*, 5971. <https://doi.org/10.3390/molecules25245971>.
34. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>.
35. Rasmussen, S.E.; Frederiksen, H.; Struntze Krogholm, K.; Poulsen, L. Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 159–174. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400082>.

36. Franco, E.P.D.; Contesini, F.J.; Lima da Silva, B.; Alves de Piloto Fernandes, A.M.; Wielewski Leme, C.; Gonçalves Cirino, J.P.; Bueno Campos, P.R.; de Oliveira Carvalho, P. Enzyme-assisted modification of flavonoids from *Matricaria chamomilla*: Antioxidant activity and inhibitory effect on digestive enzymes. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35*, 42–49. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1681989>.
37. Huang, J.; Wang, Y.; Xie, Z.; Zhou, Y.; Zhang, Y.; Wan, X. The anti-obesity effects of green tea in human intervention and basic molecular studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2014**, *68*, 1075–1087. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.143>.
38. Moseti, D.; Regassa, A.; Kim, W.K. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 124. <https://doi.org/10.3390/ijms17010124>.
39. Tamura, Y.; Tomiya, S.; Takegaki, J.; Kouzaki, K.; Tsutaki, A.; Nakazato, K. Apple polyphenols induce browning of white adipose tissue. *J. Nutr. Biochem.* **2020**, *77*, 108299. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108299>.
40. Anhê, F.F.; Nachbar, R.T.; Varin, T.V.; Trottier, J.; Dudonné, S.; Le Barz, M.; Feutry, P.; Pilon, G.; Barbier, O.; Desjardins, Y.; et al. Treatment with camu camu (*Myrciaria dubia*) prevents obesity by altering the gut microbiota and increasing energy expenditure in diet-induced obese mice. *Gut* **2019**, *68*, 453–464. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315565>.
41. Anhê, F.F.; Choi, B.S.Y.; Dyck, J.R.B.; Schertzer, J.D.; Marette, A. Host-Microbe Interplay in the Cardiometabolic Benefits of Dietary Polyphenols. *Trends Endocrinol. Metab.* **2019**, *30*, 384–395. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.04.002>.
42. Yang, C.S.; Zhang, J.; Zhang, L.; Huang, J.; Wang, Y. Mechanisms of body weight reduction and metabolic syndrome alleviation by tea. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 160–174. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500428>.
43. Reaven, G.M. Why Syndrome X? From Harold Himsworth to the insulin resistance syndrome. *Cell Metab.* **2005**, *1*, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.001>.

44. Brüning, J.C.; Winnay, J.; Bonner-Weir, S.; Taylor, S.I.; Accili, D.; Kahn, C.R. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* **1997**, *88*, 561–572. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81896-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81896-6).
45. Muoio, D.M.; Newgard, C.B. Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2008**, *9*, 193–205. <https://doi.org/10.1038/nrm2327>.
46. Guo, S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: Insights from mouse models into disease mechanisms. *J. Endocrinol.* **2014**, *220*, T1–T23. <https://doi.org/10.1530/joe-13-0327>.
47. Qatanani, M.; Lazar, M.A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: Many choices on the menu. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 1443–1455. <https://doi.org/10.1101/gad.1550907>.
48. Guilherme, A.; Virbasius, J.V.; Puri, V.; Czech, M.P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2008**, *9*, 367–377. <https://doi.org/10.1038/nrm2391>.
49. Blaha, M.J.; Blumenthal, R.S.; Brinton, E.A.; Jacobson, T.A. The importance of non-HDL cholesterol reporting in lipid management. *J. Clin. Lipidol.* **2008**, *2*, 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2008.06.013>.
50. Jacobson, T.A.; Ito, M.K.; Maki, K.C.; Orringer, C.E.; Bays, H.E.; Jones, P.H.; McKenney, J.M.; Grundy, S.M.; Gill, E.A.; Wild, R.A.; et al. National lipid association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia: Part 1—Full report. *J. Clin. Lipidol.* **2015**, *9*, 129–169. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2015.02.003>.
51. Spahis, S.; Borys, J.M.; Levy, E. Metabolic Syndrome as a Multifaceted Risk Factor for Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* **2017**, *26*, 445–461. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6756>.
52. Jiang, J.; Torok, N. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2008**, *6*, 1–7. <https://doi.org/10.1089/met.2007.0026>.

53. Machado, M.; Cortez-Pinto, H. Non-alcoholic steatohepatitis and metabolic syndrome. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2006**, *9*, 637–642. <https://doi.org/10.1097/01.mco.0000241677.40170.17>.
54. Browning, J.D.; Horton, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Investig.* **2004**, *114*, 147–152. <https://doi.org/10.1172/jci22422>.
55. Postic, C.; Dentin, R.; Denechaud, P.D.; Girard, J. ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **2007**, *27*, 179–192. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093618>.
56. Foufelle, F.; Ferré, P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: A role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem. J.* **2002**, *366*, 377–391. <https://doi.org/10.1042/bj20020430>.
57. Alaynick, W.A. Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism. *Mitochondrion* **2008**, *8*, 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2008.02.001>.
58. Luo, L.; Liu, M. Adipose tissue in control of metabolism. *J. Endocrinol.* **2016**, *231*, R77–R99. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0211>.
59. Herman, M.A.; Peroni, O.D.; Villoria, J.; Schon, M.R.; Abumrad, N.A.; Bluher, M.; Klein, S.; Kahn, B.B. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* **2012**, *484*, 333–338. <https://doi.org/10.1038/nature10986>.
60. Eissing, L.; Scherer, T.; Todter, K.; Knippschild, U.; Greve, J.W.; Buurman, W.A.; Pinnschmidt, H.O.; Rensen, S.S.; Wolf, A.M.; Bartelt, A.; et al. De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-beta and metabolic health. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1528. <https://doi.org/10.1038/ncomms2537>.
61. Ortega-Prieto, P.; Postic, C. Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 472. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00472>.
62. Yu, J.; Ip, E.; Dela Pena, A.; Hou, J.Y.; Sessa, J.; Pera, N.; Hall, P.; Kirsch, R.; Leclercq, I.; Farrell, G.C. COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: Role

- as pro-inflammatory mediator. *Hepatology* **2006**, *43*, 826–836. <https://doi.org/10.1002/hep.21108>.
63. Cai, D.; Yuan, M.; Frantz, D.F.; Melendez, P.A.; Hansen, L.; Lee, J.; Shoelson, S.E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 183–190. <https://doi.org/10.1038/nm1166>.
64. Moi, P.; Chan, K.; Asunis, I.; Cao, A.; Kan, Y.W. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9926–9930. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9926>.
65. Wang, Y.; Zhang, T.; Zhao, H.; Qi, C.; Ji, X.; Yan, H.; Cui, R.; Zhang, G.; Kang, Y.; Shi, G. Pentoxifylline Enhances Antioxidative Capability and Promotes Mitochondrial Biogenesis in D-Galactose-Induced Aging Mice by Increasing Nrf2 and PGC-1alpha through the cAMP-CREB Pathway. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, *2021*, 6695613. <https://doi.org/10.1155/2021/6695613>.
66. Liu, H.; Han, W.; Zhu, S.; Li, Z.; Liu, C. Effect of DEHP and DnOP on mitochondrial damage and related pathways of Nrf2 and SIRT1/PGC-1alpha in HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* **2021**, *158*, 112696. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112696>.
67. Nair, A.B.; Jacob, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.* **2016**, *7*, 27–31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>.
68. Haytowitz, D.B.; Wu, X.; Bhagwat, S. *USDA Database for the Proanthocyanidin Content of Selected Foods*; US Department of Agriculture: 2018.

Figure 1

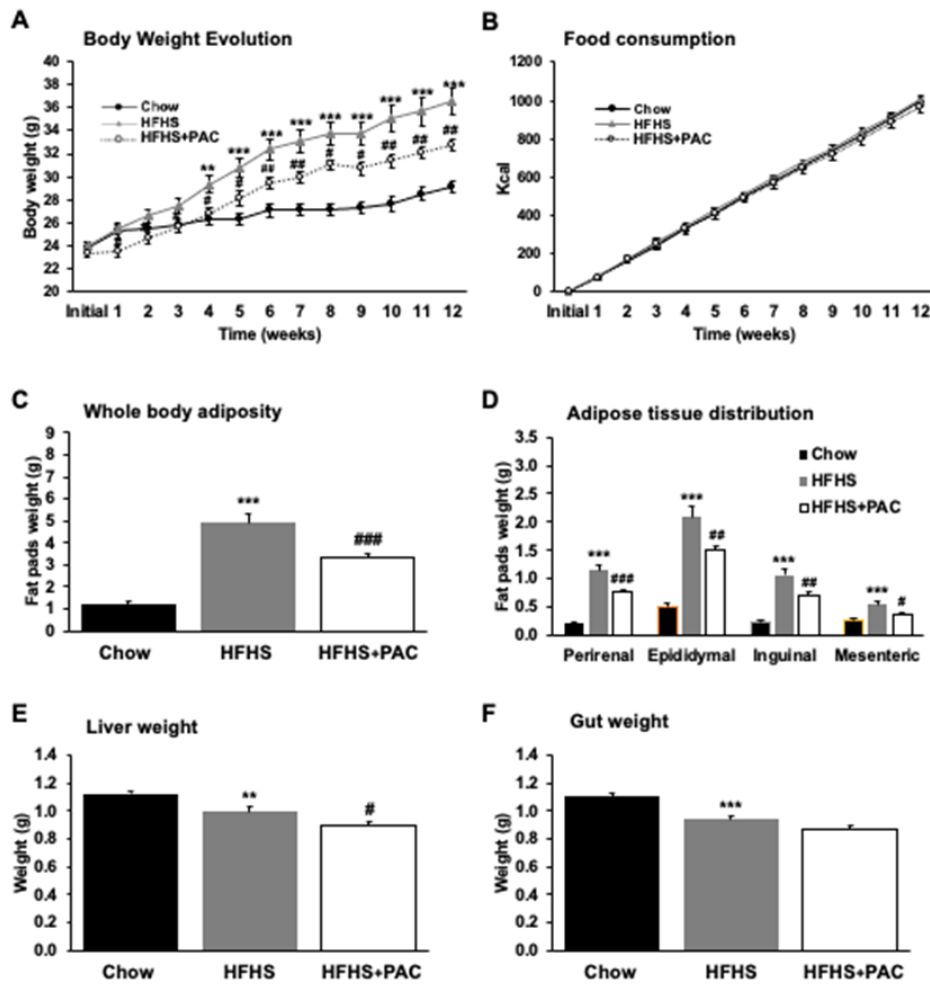


Figure 2

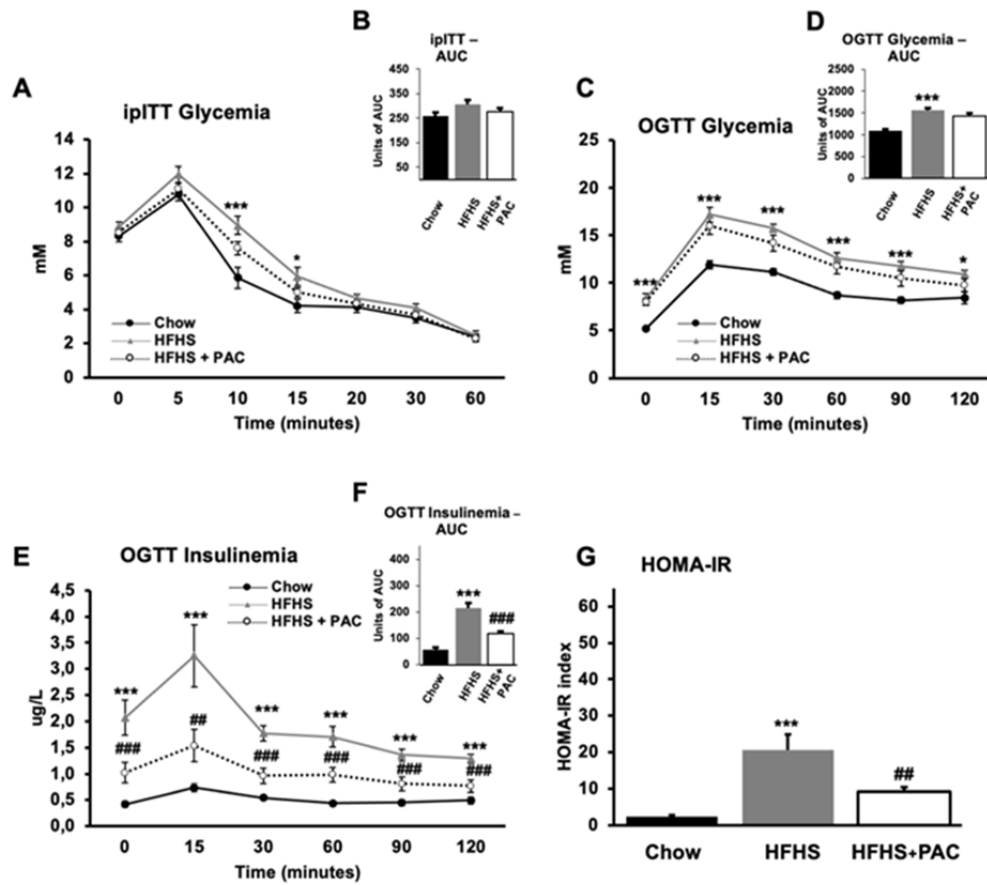


Figure 3

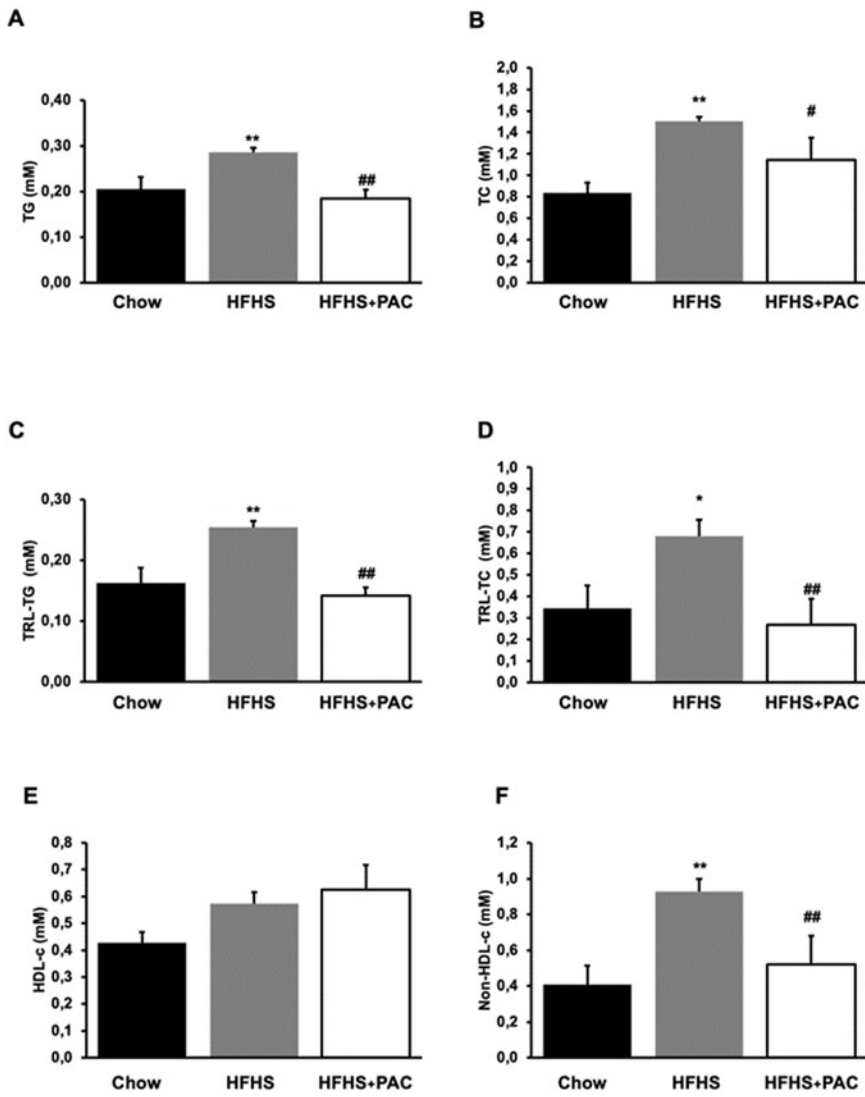


Figure 4

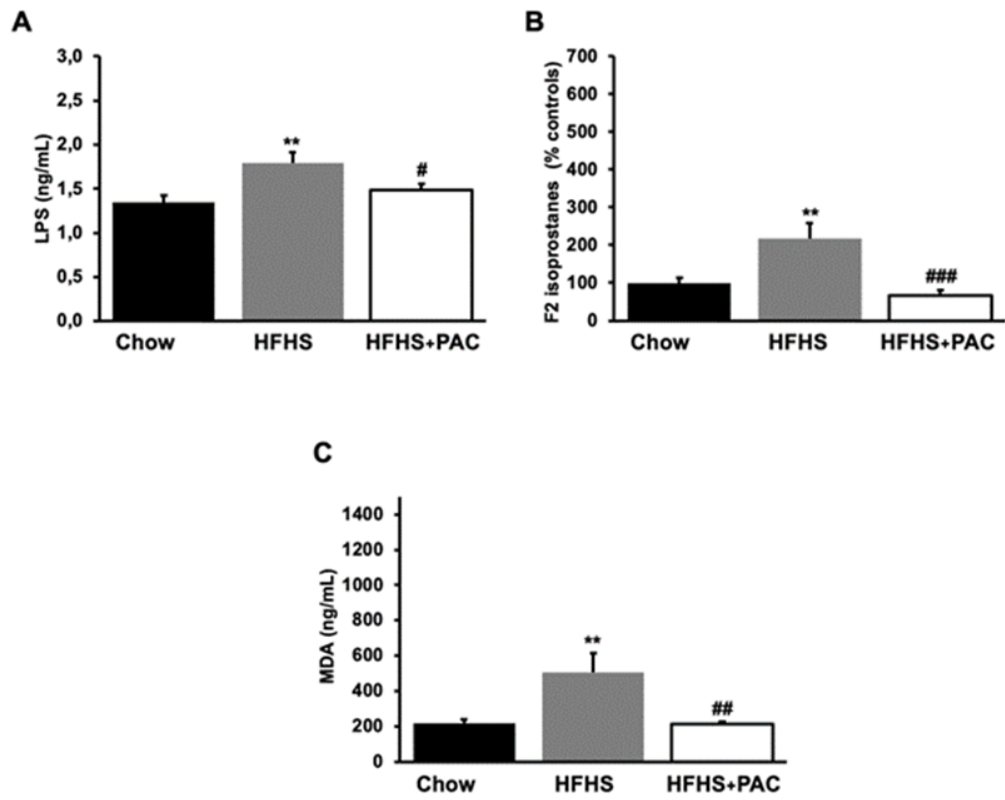


Figure 5

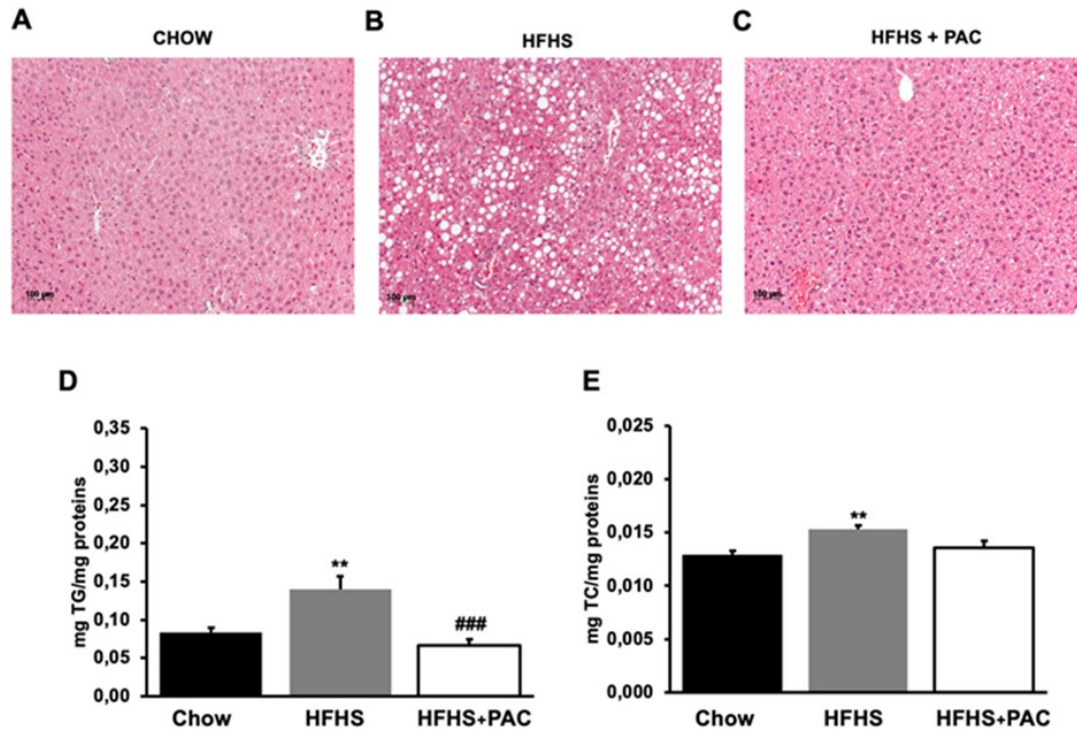


Figure 6

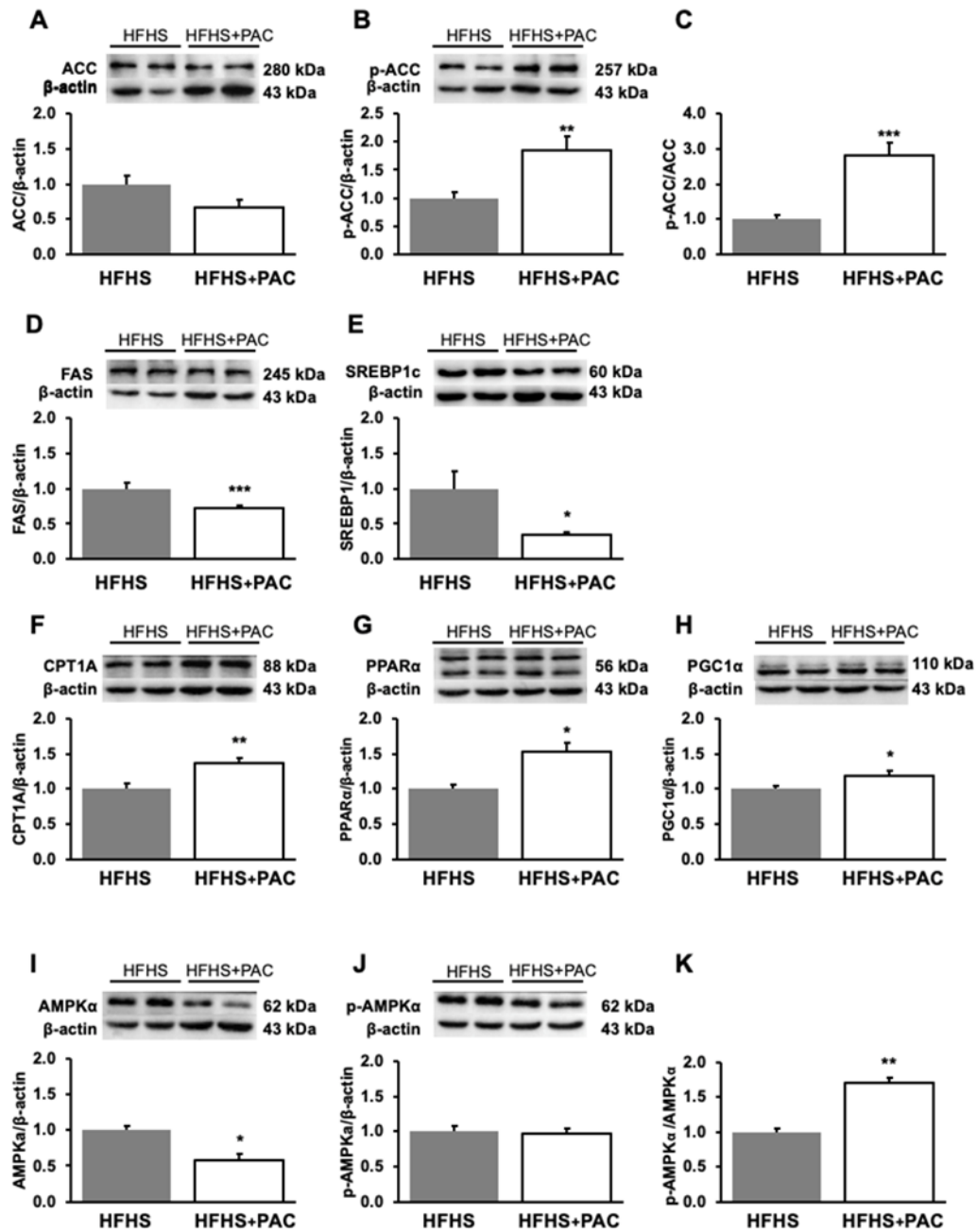


Figure 7

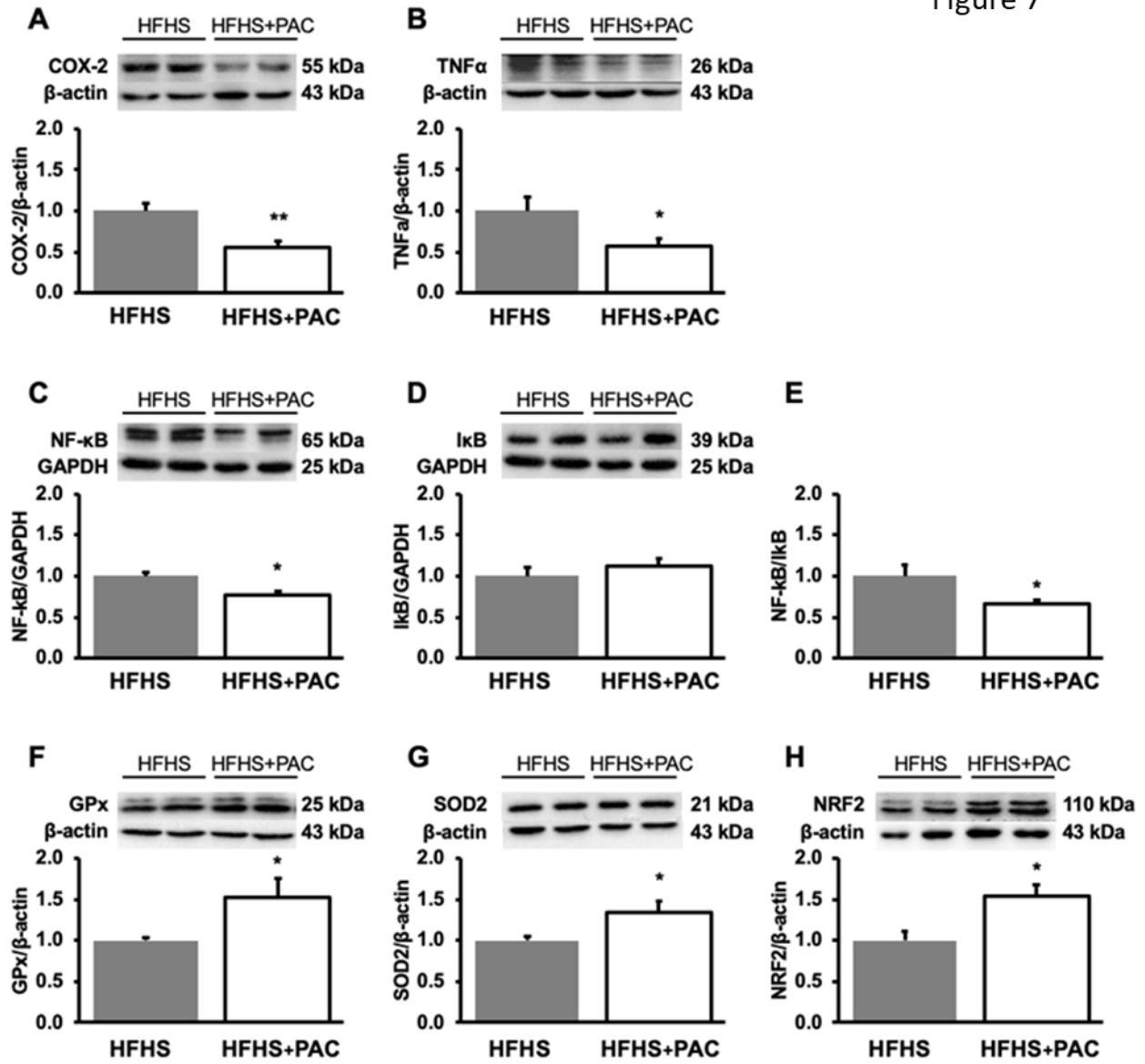


Figure 8

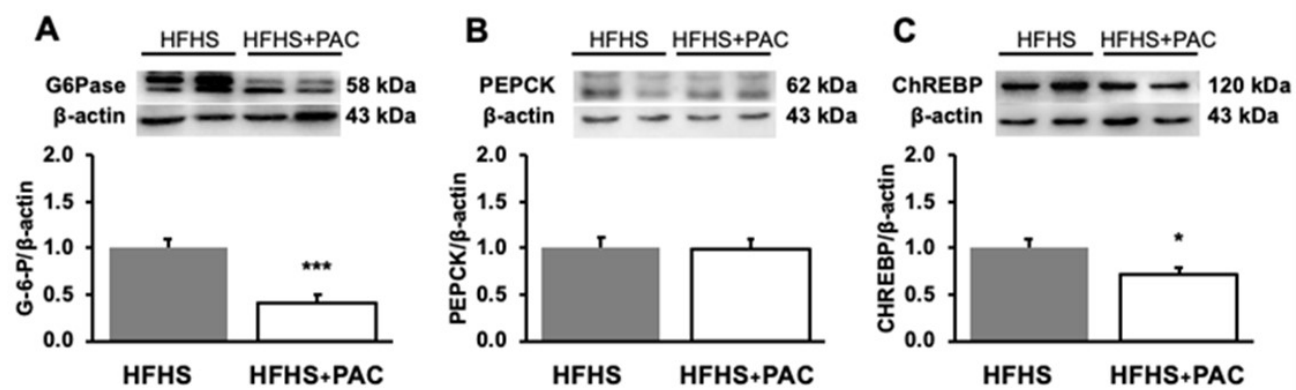


Table S1. Cranberry PAC polymeric fraction characterization

Analyte	Concentration (mg/g)
Total proanthocyanidins *	505 ± 12
Mean DP *	6.82 ± 0.03
Procyanidins A2	2.08 ± 0.006
Trimeric PAC (1 and 2 A-type bounds)	4.93 ± 0.12
Procyanidins B	0.81 ± 0.02
Flavan-3-ols total	1.29 ± 0.03
Flavonols total	0,13 ± 0.01
Total anthocyanins	0.21 ± 0,01

*Determined by phloroglucinolysis; DP, Degree of polymerization

Article 3

Insight into Polyphenol and Gut Microbiota Crosstalk: Are Their Metabolites the Key to Understand Protective Effects against Metabolic Disorders?

Mireille Koudoufio, Yves Desjardins, Francis Feldman, Schohraya Spahis, Edgard Delvin, Emile Levy

Article publié dans la revue Antioxydants en octobre 2020

Cet article répond à notre 4^{ème} objectif

L'étudiante a contribué à la collecte des informations dans la littérature, au montage du manuscrit et à la rédaction de l'article

Forum Review Article

**INSIGHT INTO POLYPHENOL AND GUT MICROBIOTA CROSSTALK: ARE THEIR METABOLITES THE
KEY TO UNDERSTAND PROTECTIVE EFFECTS AGAINST METABOLIC DISORDERS?**

Mireille Koudoufio^{1,2,3}, Yves Desjardins³, Francis Feldman^{1,2,3}, Schohraya Spahis^{1,3}, Edgard Delvin¹ and Emile Levy^{1,2,3,4*}

¹Research Centre, Sainte-Justine University Health Center, Departments of ²Nutrition, and ⁴Pediatrics, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada

³Institute of Nutrition and Functional Foods, Laval University, Quebec City, Quebec, G1V 0A6, Canada

*Dr. Emile Levy, Research Centre, CHU Sainte-Justine, 3175 Ste-Catherine Road #4.17.005, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5, Tel.: (514) 345-7783, E-mail: emile.levy@recherche-ste-justine.qc.ca

Abstract: Lifestyle factors, especially diet and nutrition, are currently regarded as essential avenues to decrease modern-day cardiometabolic disorders (CMD), including obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and atherosclerosis. Many groups around the world attribute these trends, at least partially, to bioactive plant polyphenols given their anti-oxidant and anti-inflammatory actions. In fact, polyphenols can prevent or reverse the progression of disease processes through many distinct mechanisms. In particular, the crosstalk between polyphenols and gut microbiota, recently unveiled thanks to DNA-based tools and next generation sequencing, unravelled the central regulatory role of dietary polyphenols and their intestinal micro-ecology metabolites on the host energy metabolism and related illnesses. The objectives of this review are to: (1) provide an understanding of classification, structure, and bioavailability of dietary polyphenols; (2) underline their metabolism by gut microbiota; (3) highlight their prebiotic effects on microflora; (4) discuss the multifaceted roles of their metabolites in CMD while shedding light on the mechanisms of action; and (5) underscore their ability to initiate host epigenetic regulation. In sum, the review clearly documents whether dietary polyphenols and micro-ecology favorably interact to promote multiple physiological functions on human organism.

Keywords: dietary polyphenols; metabolites; oxidative stress; inflammation; epigenetics; microflora; cardiometabolic complications

1. Introduction

Polyphenols, synthesized in a wide variety of fruits, legumes, and herbs, interestingly serve to protect against biotic and abiotic stresses caused by insects and parasites [1–3]. However, much attention is presently given to dietary polyphenols in view of their evident health benefits. These phenolic compounds are intrinsically strong free radical scavengers [4] and exhibit obvious potential in alleviating oxidative stress (OxS)-related illnesses. In this context, epidemiological and animal food intervention studies have established a solid association between the consumption of polyphenol-rich foods or beverages and their preventive influence on complex diseases, including insulin resistance (IR) [5–8], type 2 diabetes (T2D) [9–12], obesity [5,9,13–16], cardiovascular diseases (CVD) [17–22], neurodegenerative disorders [23–26], and cancer [22,27–29]. Recently, polyphenols have also been suggested as plausible adjunctive therapeutic agents

for the COVID-19-induced inflammatory storm [30–32]. The growing evidence as to the prevention and management of different disorders by dietary polyphenols has led to multiple studies focusing on their dietary sources [33], efficacy [20], and bioavailability [34–36]. However, much remains to be learned about their potential mechanisms of action. In particular, their dynamic interaction with intestinal microbiota is of utmost importance as ~90% of the amount ingested reach the colon to directly influence microbial ecology and, at the same time, undergo microflora-induced metabolic modifications [37,38]. These interactions represent the specific topic of the present critical review. First, we will discuss the prebiotic action of polyphenols. Second, we will focus on their transformation and physiological impact on the gastrointestinal (GI) tract. Third, we will emphasize the role of their metabolites resulting from their catabolism by colonic bacteria. Fourth, we will analyze their cardiometabolic effects while highlighting their mechanisms of action and underscoring epigenetic regulation. Clearly, the ultimate goal of this review is to show that the health benefits of dietary polyphenols are through the action of their bioactive metabolites. Nonetheless, for the reader's understanding, it is essential to provide a brief introduction, which describes the structure, classification, and bioavailability of polyphenols.

2. Polyphenols: Classification, Structure, and Bioavailability

2.1. Classification and Structure of Polyphenols

Concisely, polyphenols are characterized by at least one aromatic ring and one hydroxyl functional group with evolving structure from a simple molecule to a complex polymer. They are classified into flavonoids and non-flavonoids, according to the intricacy of their structure, number of phenol rings, and carbon skeleton [32,39–41]. Flavonoids present a benzo- γ -pyrone structure containing two aromatic rings (A and B) bound by a 3-carbon bridge (C6–C3–C6). Based on the differences in the C ring, flavonoids can be subdivided into six sub-classes, namely: (1) flavonols (e.g., quercetin, kaempferol); (2) flavones (e.g., luteolin, apigenin); (3) isoflavones (e.g., daidzein, genistein); (4) flavanones (e.g., naringenin, hesperetin); (5) flavanols (e.g., catechins, epigallocatechins); and (6) anthocyanidins (e.g., malvidin, cyanidin). Although polyphenols may be encountered in plants as aglycones, they are generally found as glycoside derivatives, glucoside, galactoside, rhamnoside, xyloside, rutinoside, arabinopyranoside, and finally

arabinofuranoside, being the most common [39]. Interestingly, the various tannin functional groups (e.g., hydroxyls) allow them to create non-covalent (hydrophobic and hydrogen) bonds and covalent bonds with proteins and carbohydrates [42–44]. Moreover, tannins are polyphenols that are most involved in binding to proline-rich proteins [45].

2.2. Bioavailability of Polyphenols

2.2.1. Factors Affecting Polyphenol Absorption

Polyphenol bioavailability (e.g., alimentary proportion delivered to blood circulation) is dependent on diverse conditions such as their stability, transport, and metabolic behavior. Several intrinsic and extrinsic factors influence the content of plant polyphenols [35]. It is worth mentioning that their relative composition and levels vary extensively among species and between varieties of the same species in association with their genetic background and state of ripeness, which is related to the time of harvest. For example, the content of olive secoiridoid phenolic derivatives decreased when irrigation and ripening increased [35,46–48]. Furthermore, the concentration and variety of phenolic derivatives depend on storage conditions as illustrated by the variability of the phenolic content and total antioxidant capacity of 14 apple and 6 pear cultivars harvested at different periods [46]. The chemical structure is another important intrinsic factor when considering bioavailability. Polyphenols vary widely in molecular weight, secondary and tertiary structures, as well as glycosylation level [49–51]. For instance, resveratrol and quercetin glycosides are absorbed to a lesser extent than the respective aglycones, which influences their metabolic fate through the digestive tract, their absorption and release in the portal circulation, and excretion in urine or feces [52]. With regards to extrinsic aspects, short time storage at low temperature also affects polyphenol content as exemplified by the broccoli loss of its caffeoyl-quinic and sinapic acid contents [53]. Food processing is yet another external factor when considering polyphenol bioavailability. Thermal processing causes diverging effects on polyphenol content and absorption. For instance, Xu et al. [54] reported that thermal processing significantly decreased bean total phenolic content and antioxidant properties, while Khatun et al. [55] reported the opposite by documenting an increase in the same properties when heating spices. These dissimilarities may be explained both by the difference in polyphenol

moieties, matrix, and cooking process. The role of the food matrix on the disposition of polyphenols should not be under-evaluated given the interaction between food components ingested simultaneously (fat, proteins, complex carbohydrates) and different polyphenolic compounds likely influencing their interaction with the microbiota and ultimately their absorption. In a rat model, the combination of lecithin and soya bean oil or emulsifiers (sucrose, fatty ester, polyglycerol fatty acid ester, and sodium taurocholate) increased intestinal absorption efficiency of water-dissolved quercetin when these constituents had no effect given separately [56]. Similarly, the administration of hydroxytyrosol as a sole natural product to humans or rats provides a better bioavailability than when combined with refined oil or yogurt, although its handling differed between the two species [57]. Differing digestive tract possesses such as luminal machinery, bile acid secretion, and enterohepatic cycle may explain the differences. The above examples suffice to warrant precautions when interpreting results obtained from different protocols. The several factors mentioned, and others have to be carefully taken into account when conducting studies using cellular models, animals, or clinical investigations, as they could explain variability in outcomes results from numerous reports. In general, polyphenols exhibit a low bioavailability with maximal plasma concentrations reached within 2 to 4 h post ingestion, and an apparent short elimination time with a return to baseline levels within 8 to 12 h [58]. Hence, 24 h-urine collections generally provide a more accurate evaluation of total polyphenol absorption, metabolism, and excretion [59]. These pharmacokinetic properties suggest that only long-term consumption of a variety of polyphenols will affect the health trajectory and support the role of the “Mediterranean diet” in improving population health perspectives.

2.2.2. Absorption of Polyphenols and Derivatives

Polyphenol intestinal absorption was indirectly estimated by raised antioxidant defense in the circulation in response to their consumption. The basic principles for their transport and local metabolism are partway established. Figure 1 schematizes the digestion and absorption processes as generally accepted today for polyphenols. Distinction must be made between the digestive and absorption processes of low and high molecular weight polyphenols along the digestive tract as the sites and the efficacy may differ. In decreasing order of absorption kinetics, isoflavones, caffeic and gallic acids lead, followed by catechins, flavanones, and quercetin

glucosides. High molecular weight polyphenols such as proanthocyanidins, galloylated catechins, and anthocyanins come last [60]. For instance, the degree of polymerization of procyanidins (dimer B3, trimer C2, and polymers), isolated from willow tree catkins, decreased their absorption through the rat gut barrier and can limit their metabolism by the intestinal microbiota when compared to catechins [61].

2.2.3. Gastric Uptake

It is well established that plant polyphenols predominantly present as glycosides undergo deglycosylation to their respective lipophilic aglycones, thereby enhancing their absorption through the GI [62,63]. Whether the stomach plays a significant role remains uncertain until today. To our knowledge, there is little direct *in vivo* evidence on the contribution of the human stomach to the assimilation of phenolic compounds. It needs to be underlined that *in vitro* simulation or animal models are the most common sources of information. Table 1 summarizes the results obtained in *in vitro* and *in vivo* models as well as in humans.

Purified cocoa procyanidin oligomers, incubated in simulated gastric juice, led to the appearance of dimers and monomers in a time-dependent fashion [64,65]. Similarly, olive oil polyphenol glycosides, including oleuropein (glycoside of elenolic acid linked to hydroxytyrosol) underwent rapid and time-dependent hydrolysis, yielding appreciable amounts of free hydroxytyrosol and tyrosol, probably through nucleophilic attack [66]. On the contrary, other studies, using the same *in vitro* model, along with oral administration of polyphenols to humans, showed stability of a variety of polyphenols in the acidic milieu [67–73]. Interestingly, the incubation of apple phloretin and quercetin for 5 min with native saliva resulted in the production of the respective aglycones, likely by oral bacterial flora as the process was blocked by antibiotics [68]. In the same study, hydroxycinnamic acid derivatives, flavonols, dihydrochalcones, and monomeric flavan-3-ols were stable when incubated with simulated gastric juice at pH 1.8, but procyanidin B2 was degraded. Obviously, the *in vitro* models suffer from being an inadequate reflection of the gastric fluid, which lacks mucus normally secreted by parietal cells. This is supported by the notable stability of cocoa procyanidin polymers *in vivo* in the human stomach environment [73]. In terms of *in vivo* studies, the *in-situ* digestion rat pylorus ligated model shows that polyphenol aglycones are absorbed by the stomach, and suggests the limited role of the stomach in flavonoid glycosides

metabolism [74–77]. These results reveal inequality in the behavior of polyphenols in different experimental models and warrant careful analysis to obtain a complete representation.

2.2.4. Small Intestine Uptake

Duodenum

Using the *in vitro* three-step model simulating the digestive process from the mouth to the small intestine [78], it was shown that the duodenal digestion phase either with static or continuous-flow cellulose membrane-based dialysis containing bile salts and pancreatin resulted in dialyzable (chyme-available for passive absorption into the systemic circulation) and non-dialyzable (digested fraction available for colon) fractions [79]. Profiling the chyme and the non-dialyzable procyanidin content of cocoa liquor post gastric digestion revealed that the high-molecular weight procyanidins (pentamers to nonamers) were hydrolyzed essentially into monomers and dimers. Similar profiles were observed for the duodenal digest. Interestingly, the cocoa liquor duodenal digest contained much higher procyanidin concentrations than the cocoa powder counterpart that the authors attributed to the protective effect of fat micellar structures present in the liquor. More recently, using the same dynamic duodenal model, most of the intact procyanidins isolated from chocolate nibs were retained in the non-dialyzable fraction, which would likely be available for colonic digestion by the microbiota, while smaller molecular weight dimers and trimers were quantified in the dialyzable fraction [67]. On the other hand, the addition of carbohydrate-enriched food resulted in lower duodenal digestibility of procyanidin. Last, with the *ex vivo* reverted duodenal sac model, the bioavailability of curcumin was found to be significantly enhanced when encapsulated in low- and high-molecular weight polylactic-co-glycolic acid nanoparticles, possibly attributable to faster dissolution following the administration [80]. Overall, these results underpin the effect of the food matrix on the metabolism of polyphenols.

Jejunum and Ileum

It is well known that under physiological conditions, the small intestine, particularly the jejunum and ileum segments, represents the principal location for the digestion and absorption of dietary lipids. This holds for polyphenols, although with differing efficiency according to their molecular

weight and type of glycosylation. Upon reaching the jejunum and ileum, glycosylated polyphenols are either hydrolyzed into their respective aglycones by the membrane-bound brush-border lactase phlorizin hydrolase [81] or transported intact by the enterocyte sodium-glucose co-transporter and hydrolyzed by the cytosolic β -glucosidase [82–84]. The nature of carbohydrate moieties affects the absorption of polyphenols through the small intestine. For instance, whereas glucoside conjugates and their aglycones are absorbed in the small intestine, those containing rhamnose molecules, [e.g., the flavonols hesperidin (hesperidin-7-O-glucosyl-rhamnose) and rutin (quercetin-3-O-glucosyl-rhamnose)], must proceed to the colon where rhamnose will be removed by bacterial rhamnosidase [85]. On the other hand, catechin and epicatechin, monomers of the flavonol family, which are often acylated by gallic acid, are readily absorbed by enterocytes without any deconjugation or hydrolysis [86,87]. Caco-2 cells, a human colon carcinoma derived cell line, which upon confluence develops enterocyte-like characteristics, have extensively been used as a model for studying lipid and drug metabolism [88] and transport [89]. They also have served as a model for studying the absorption, transport, and metabolism of polyphenols as detailed in Table 2. Caco-2 cells have been shown to absorb major dietary hydroxycinnamates and diferulates after de-esterification (phase 1 transformation) and conversion into glucuronate, methyl, and sulfate conjugates (Phase 2 transformation) [90]. In 2006, Corona et al. [66] reported that Caco-2 cells transported hydroxytyrosol from the apical to the basolateral compartment, with the appearance of 3-O-methyl-hydroxytyrosol and glutathionyl-hydroxytyrosol in both compartments. They observed a similar transport for tyrosol, without any evidence of further metabolism or transport for oleuropein. The same year, trans-epithelial transport of trans-piceid (3- β trans-resveratrol glucoside) and deglycosylation in trans-resveratrol were reported using human intestinal Caco-2 cell monolayers [82]. The important question in the context of nutrition is whether polyphenols behave similarly when evaluated as single compounds as when assessed in complex mixtures [93,94]. Su et al. [92] partially answered this question by showing that, in Caco-2 cells, (+)-catechin significantly enhanced the cellular uptake and transport of the isoflavone daidzein-8-C-glucoside, whereas this compound significantly abated that of (+)-catechin, and that inhibition of efflux pumps increased their uptake. Although valuable for screening polyphenol bioavailability, caution should be used when

interpreting the data obtained from the Caco-2 cellular model in terms of predictability. Indeed, even if *in vitro* smaller phenolic derivatives of hesperidin 2S were absorbed, hesperidin conjugates were the main bioavailable moieties in a randomized human controlled study [69]. The intestinal porcine enterocyte cell line (IPEC), a non-transformed non-tumorigenic permanent intestinal cell line derived from the jejunum is another model that merits attention for two main reasons. First, it maintains its differentiated characteristics, and second, there is a close analogy in results obtained *in vivo* with the porcine model, the closest to the human GI system [95,96]. To our knowledge, it has seldom been used to study polyphenol absorption. However, a good correlation for the uptake of grape pomace polyphenols was observed between IPEC cells and the duodenum and colon of piglets [97]. In addition, Wan et al. [98] proved functionality of the same *in vitro* model by showing enhanced the secretion of α -defensins-1 and 2 and reduced the *E. coli* translocation across a confluent IPEC cells by epigallocatechin-3-gallate, the major polyphenol specie in green tea.

Colon

The case of the colon bears some singularity in the sense that there is a reciprocal relationship between polyphenols and colonic microbiota. It has been clearly established that the gut microbiome is a key actor in modulating the production, bioavailability, and biological activities of complex low molecular weight phenolic metabolites grouped under the term polyphenol metabolome [99,100]. Rarely, the transport of polyphenols by the colon has directly been evaluated as most of the studies employed intestinal cell models displaying features of the small intestine [101]. It is, however, worthy to mention that T84 colon carcinoma cell line monolayers, incubated with ferulic, isoferulic, cinnamic, and hydroxycinnamic acids, as well as with flavonoids, showed appreciable transport from the luminal to the basolateral side [102]. Measurable levels of ferulic glucuronide and sulfate were detected in the apical and basolateral compartments when supplied at supra-physiological concentrations. Other reports bear mostly on the polyphenol anticancerogenic properties without addressing the uptake and transport per se [103–106]. The enterohepatic cycle is an important mechanism for the bioavailability and disposition of polyphenol aglycones and their metabolites. This is true whether absorbed by the small intestine or the colon (where they undergo *in situ* phase II enzymatic conversion to their

respective methyl, glucuronide, and sulfate conjugates) or delivered to the liver via the portal circulation for further conjugation (before entering the blood stream and being excreted in urine). Alternatively, they enter the bile duct where mixed with bile salts, re-enter the small intestine for either a second-round absorption by enterocytes and transport to the liver, or excretion in the stools [37,107–109].

3. Interaction between Polyphenols and the Colon Microbiota

Humans are colonized by a wide array of microorganisms referred to as the microbiota that consists of obligate and facultative anaerobes, mainly targeting the colon [110,111]. Their main assignment is to provide assistance to their host in digesting food complex polysaccharides and proteins unprocessed in the upper GI tract [112]. The saccharolytic pathway, mainly active in the proximal colon, yields short chain fatty acids, of which acetic, propionic, and butyric acids are the most abundant, as well as lactic acid, CO₂, methane, and ethanol. The second catabolic pathway responsible for protein fermentation, mainly present in the distal colon, leads to metabolite species such as ammonia, various amines, thiols, phenols, and indoles [113,114]. The healthy gut ecosystem consists of the anaerobes Bacteroidetes and Firmicutes, the latter contributing to more than 90% of the total bacterial species, and Proteobacteria, Verrucomicrobia, and Actinobacteria accounting for the balance [115]. Diet composition has a definite role in the taxonomic and functional profile of the colon microbiota. For example, several reports have shown that high carbohydrate and fiber intakes are related to higher abundance of 3 enterotypes: Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, and Bifidobacteria [116–118]. For their part, omnivorous women were shown to have a higher abundance of fecal butyrate producing taxa (Clostridium cluster XIVa and Roseburia/Eubacterium) than vegetarians [119]. Intervention studies have also established that changing from a carnivorous diet to a plant-based diet resulted in a gradual decrease in abundance of Bacteroides, a bile-tolerant symbiotic microorganism, and an increase in Firmicutes that preferentially metabolizes plant polysaccharides [120]. Furthermore, population food tradition-related differences in microbiota constitution have been reported; those consuming meat-based diets had higher abundances of Bacteroides than those traditionally consuming plant-based diets [118,121]. A controlled 10-week-diet intervention, involving overweight volunteers, demonstrated a rapid modification in microbiota species composition

despite the inter-individual variation in initial composition [122]. Overall, the results indicate that *Bacteroides*, together with *Alistipes* and *Parabacteroides*, may be the primary proteolytic taxon in the human colon [112].

3.1. Polyphenol–Microbiota Interaction

Of interest, although still poorly understood, evidence is accruing on the influence of dietary polyphenols, perceived as xenobiotics, on the modulation of the colonic microflora and health [123]. They interfere with bacterial cell-to-cell communication and coordinate pathogenic behaviors, two clinically important characteristics with regards to virulence control and wound healing [124,125]. They also sensitize bacteria to xenobiotics and alter membrane permeability. This is exemplified by the sensitization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to β -lactam through the (-)-epicatechin gallate-mediated alterations of the bacterium cell wall bilayer, and enhanced release of lipoteichoic acid from the cytoplasmic membrane [126]. Polyphenols, acting as prebiotics, have also been shown to modulate gut metabolism and immunity as well as inflammatory pathways through the change of T-cell functions, inhibition of mast cell degranulation, and down regulation of inflammatory cytokine responses [127–130]. Studies in animals and in humans have shown modification of colon microflora by polyphenolic compounds, resulting in growth inhibition of certain bacterial groups while permitting others to flourish [131–133]. Valuable effects of polyphenols, such as those present in red wine, include among others, enhanced abundance of beneficial bacterium taxa such as *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, capable of improving gut barrier protection, *Faecalibacterium prausnitzii* having anti-inflammatory properties, and *Roseburia* as a butyrate producer. Interestingly, the proliferation of these bacteria occurred at the expense of the less desirable *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* [134]. Most of the important biological actions resulting from phenolic compounds and microbiota are depicted in Figure 2.

3.2. Impact of Microbiota on Polyphenol Metabolism

The transformation of polyphenols into bioactive metabolites is tributary to the colonic microflora species. For example, the Firmicutes: *Eubacterium ramulus* and oxidoreducens, *Clostridium orbiscidens* and *Flavonifractor plautii* metabolize the flavonols Kaempferol, Quercetin, and

Myricetin by O-deglycosylation and C-ring fission into a series of metabolites comprising protocatechuic, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-acetic, 2-(4-hydroxyphenyl)-propionic, 3-hydroxyphenylacetic, 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionic, 2-(3-hydroxyphenyl)-acetic, 2-(3-dihydroxyphenyl)-acetic, and 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-acetic acids as well as short-chain fatty acids (SCFAs) [83,135,136] (Figure 2). Furthermore, *Enterococcus casseliflavus* (Firmicutes) hydrolyzes sugar moieties from quercetin-3-O-glucoside, a process releasing the aglycone and ultimately producing lactic, formic, and acetic acids, together with ethanol [137]. The Actinobacteria: *Slackia equolifaciens*, *Slackia isoflavoniconvertens*, *Eggerthella lenta*, *Adlercreutzia equolifaciens*, and *Bifidobacterium* spp metabolize the flavonones Naringenin and Hesperidin through C-ring fission yielding 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic, 3-phenylpropionic and hydroxyphenylpropionic acids [135,136]. *Adlercreutzia equolifaciens*, *Paraeggerthella hongkongensis*, *Slackia equolifaciens*, *Slackia isoflavoniconvertens*, *Bacteroides ovatus*, *S. intermedius*, *R. productus*, *E. sp. Julong*, *E. faecium* EPI1, *L. mucosae* EPI2, and *F. magna*, have also been shown convert some the isoflavone daidzein to (S)-equol, a nonsteroidal estrogen-like molecule [((3S)-3-(4-hydroxyphenyl)-7-chromanol)] [108,137].

4. Polyphenols and Metabolic Syndrome

The polyphenol metabolites, produced by the gut microbiota once absorbed and directed to the target tissues and organs, contribute to the metabolic health, through their antioxidant and anti-inflammatory properties, by preventing or reducing the risk of developing several cardiometabolic disorders (CMD), notably the metabolic syndrome (MetS). The increasing prevalence of childhood MetS along with overweight and obesity is a major public health concern in both developed and developing countries. MetS is a key risk factor for the development of T2D, non-alcoholic fatty liver disease, and CVD in early adulthood [138–140]. MetS is a cluster of interrelated risk factors, including abdominal obesity, dyslipidemia, hypertension, hyperglycemia, and IR, which is triggered by cellular redox imbalance and inflammation as cardinal features [141–143]. In the last two decades, strategies to limit the deleterious effects of the MetS have been focused on diet regimen containing natural fruits, green vegetables, whole grains, legumes, probiotics, vitamin C, vitamin E, and ω -3 polyunsaturated-fatty acids [20,144–148]. Likewise, prebiotics, including polyphenols with their prebiotic potential, have also demonstrated

promising effects on IR, glycemia, lipid profile, and CVD [8,134,149]. Other multiple studies, involving animal models, have consistently shown that administration of polyphenols, extracted from various sources, increased insulin sensitivity (via measurement of homeostatic model assessment for insulin resistance index, glucose intolerance, or insulin tolerance tests) and decreasing circulating free-fatty acid, triglyceride, cholesterol, C-reactive protein, resistin, and leptin concentrations [150–154]. At the clinical level, a parallel, double-blinded controlled and randomized 6-week dietary intervention demonstrated that strawberry and cranberry polyphenols improved insulin sensitivity in overweight and obese nondiabetic, insulin-resistant human subjects [8]. There was not a significant improvement of other cardiometabolic risk factors, which is probably due to the length of the intervention. Nevertheless, these in vivo results show the potential clinical preventive and therapeutic impact of polyphenols on human diseases. Considering that impaired redox potential and inflammatory processes are the basis of MetS, polyphenols, identified for their antioxidant and anti-inflammatory properties [155,156], appear as suitable candidates for preventing its development. The review of the mechanisms linking polyphenols and alleviation of these features follows.

4.1. Antioxidative Effects of Polyphenols

Polyphenols are known as major contributors to the fruit total antioxidant activity [157]. They do so by donation of an electron or hydrogen atom to reactive oxygen, nitrogen, and chlorine species based either on hydrogen atom transfer or single electron transfer by proton transfer [158]. Reacting with the inner side of the plasma membrane hydrophobic compounds, polyphenols impede lipid and protein oxidation, thus protecting the structure, fluidity, and function of the cell membrane [159]. Polyphenols also chelate transition metals as Fe^{2+} , thus directly reducing the Fenton reaction and preventing oxidation by highly reactive hydroxyl radicals [160]. Reactive oxygen species (ROS) play leading roles in provoking pan-cellular inflammation. Their action is mediated by the activation of powerful transcription factors such as nuclear redox factor-2 (Nrf2), nuclear factor-kappa B (NF- κ B), and activator protein 1 [161]. Under unstressed conditions, inactive Nrf2 is linked to its cytoplasmic regulator actin-anchored Kelch-like ECH-associating protein 1. Due to reactive species accumulation in cells under OxS, Nrf2 dissociates from Kelch-like ECH-associating protein 1, translocates into the nucleus where it modulates antioxidant-

responsive elements-mediated transcription cytoprotective genes [162,163]. Phenolic compounds are able to enhance protective pathways by activating Nrf2. For example, flavonoids induce Nrf2 translocation to the nucleus where it forms heterodimers with the leucine zipper-like transcription factors small musculo-aponeurotic fibrosarcoma proteins, then bind to antioxidant-responsive elements to activate target genes such as Phase II enzymes involved in detoxification [164]. In addition, Zhang et al. [165], using human breast cells, hepatic human liver cancer cells, and mouse Hepa-1 cells, demonstrated cell-dependent agonist/antagonist effects of several flavonoids on the regulation of aryl-hydrocarbon receptor-mediated signalling pathways. Polyphenols may also suppress pro-oxidative response by down-regulating the synthesis of the pro-inflammatory interleukin-(IL)-1 β , tumor necrosis factor-alpha (TNF α), and interferon-gamma. They do so by modulating NF- κ B and mitogen-activated protein kinase signaling pathways [166]. Moreover, phenolic compounds can display genoprotective effects, thereby preventing/reversing the progression of various CMD diseases [167]. Through the protection of DNA against OxS damages, some types of polyphenols can promote metabolic health [168–171]. For example, epigallocatechin gallate and resveratrol exhibit high capacity to decrease DNA double strand breaks, chromosome loss, and DNA deterioration response in H₂O₂-induced genotoxicity in cells [172,173]. A human supplementation trial has also shown the ability of green tea polyphenolic antioxidants to increase the resistance of DNA to oxidation damages [174].

4.2. Anti-Inflammatory Effects of Polyphenols

The crosstalk between oxidative and inflammation signalling pathways is important for cell homeostasis and survival. Indeed, overproduction of ROS has been shown to stimulate the release of pro-inflammatory cytokines. Reciprocally, NF- κ B controlled genes are able to regulate ROS production [175,176]. Various studies, particularly those oriented toward cancer, revealed that polyphenols are able to control chronic inflammatory responses at the level of cytokine production, NF- κ B-mediated gene expression, and the release of the tumor-suppressing transforming growth factor-beta [177–179]. Furthermore, closely related to the MetS, our group has more recently demonstrated, in post-confluent Caco-2/15 cells, that polyphenols extracted from dried apple peels (DAPP), containing phenolic acids, flavonol glycosides, flavan-3-ols, and procyanidins prevented iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation and counteracted

lipopolysaccharide-mediated inflammation as shown by the down regulation of the cytokines TNF α and IL-6, lessening of cyclooxygenase-2 expression, and production of prostaglandin E2 via the decline of NF- κ B. Concomitantly, the alleviation of inflammation was accompanied by the induction of Nrf2 (orchestrating cellular antioxidant defenses and maintaining redox homeostasis) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (the “master controller” of mitochondrial biogenesis) [180]. We later demonstrated that DAPP prevented and alleviated dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation in mice, stimulated antioxidant transcription factors, and improved mitochondrial dysfunction. They also decreased lipid peroxidation and up-regulated antioxidant enzymes, while decreasing the activity of myeloperoxidase, the expression of cyclooxygenase-2, and the production of prostaglandin E2. Moreover, DAPP partially restored mitochondrial redox homeostasis, fatty acid β -oxidation, ATP synthesis, apoptosis, and regulatory mitochondrial transcription factors [181]. As DAPP in parallel decreased the relative abundance of Peptostreptococcaceae and Enterobacteriaceae bacteria [182], it is possible that the modifications of intestinal microbiota brought about the amelioration of oxidative and inflammatory processes.

4.3. Epigenetic Control of Polyphenols

Epigenetic modification of gene expression is extremely important in the modulation of the Oxs and inflammatory pathways briefly described above. Such alterations have been associated with abnormalities in various metabolic pathways [183]. Epigenetic control includes methylation of CpG rich regions, post-transcriptional modulation of chromatin histone/non-histone, and micro-RNAs (miRNAs) regulating gene expression [184–186]. Importantly, while these alterations may persist for cells lifespan and may have inter-generational effects, they are reversible and have thus become prime targets for interventions in the treatment of MetS [187]. Unfortunately, data on these mechanisms, particularly those bearing on DNA methylation and histone acetylation, are scarce. Table 3 shows that, in both animal models and human studies, polyphenol consumption decreases obesity, IR, and hypertension. These metabolic improvements are associated to epigenetic modifications, including increased DNA methylation, and histone methylation and acetylation. Interestingly, reports involving miRNAs are more profuse. Table 4 summarizes the major findings obtained regarding the modulation of miRNAs and their effect on

the expression of specific genes. It can be appreciated that polyphenols, independently of their origin, modulate miRNAs, especially controlling OxS and inflammation pathways in different cell models. In animal models, they also regulate miRNAs expression involved in the control of inflammation, obesity, lipogenesis, and energy expenditure. One human study shows that polyphenol consumption modulates miRNAs expression related to inflammation processes.

5. Polyphenol Metabolites

In the first part of the present review, we have defined the polyphenols, described their structure, reported their digestion and absorption, elaborated on their mode of action and potential benefits, emphasized their epigenetic regulation, and pointed out their interaction with intestinal microbiota. The goal of the second part is to focus on the polyphenol metabolites, derived from their colonic microbial metabolism and biotransformation. As mentioned above, parent or native polyphenols have glycosidic linkages, which limit their absorption in the small intestine, forcing them to continue their way to the colon. It is in this part of the large intestine that glycosides are cleaved and further metabolized by microbiota to potentially generate more active and better-absorbed metabolites. Using transporters and passive diffusion, the small molecular weight end-products have easy access to the circulation. Hence, the second part of this review is dedicated to specify the biological activity and consequential functional effects of polyphenol metabolites on CMD. Table 5 provides information on the different metabolites issued from colonic digestion and on their pleiotropic effects.

5.1. Flavonoid Metabolites and Their Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects

Bacterial flavonoid catabolism in the colon follows a generic pattern yielding non-specific metabolites such as hydroxylated phenylpropionic acid (HPPA) and phenylacetic acids (HPAA) that ultimately may be subjected to β -oxidation and glycation to yield hippuric acid and its hydroxylated counterpart [34,217]. It can therefore be appreciated that a relatively small number of degradation products emanate from extremely diverse parent flavonoids.

5.1.1. Flavonol Quercetin Metabolites

Quercetin (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one) is supplied by apples, tea, red wine, berries, tomatoes, and onions. This polyphenol has attracted a lot of interest from the biomedical milieu in view of its beneficial properties in prevention-diseases (e.g., T2D, CVD) despite its limited bioavailability because of its low solubility, weak stability in the upper gastrointestinal tract, rapid fast metabolism, and short biological half-life [98]. However, quercetin molecules unable to be absorbed in the small intestine reach the colon, and are metabolized into a series of phenolic acids by luminal bacteria [265]. In fact, the health-promoting properties observed with quercetin could account for by microbiota-mediated metabolites. Quercetin, quercetin 3-O-rutinoside (rutin) and their colon-derived flavonoid metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (3,4-HPAA), 4-hydroxyphenylacetic acid (4-HPAA), 3-hydroxyphenylacetic acid (3-HPAA), and hippuric acid (N-benzoylglycine) have been shown to possess antioxidant and anti-inflammatory properties. On the other hand, when *in vitro* studies using primary cultures of rat liver parenchymal cells or the human HepG2 hepatoma cell line were treated with t-butylhydroperoxide to produce OxS, the radical scavenging properties were noted only for the parent molecules quercetin and rutin, as well as for 3,4-dihydroxytoluene (3,4-DHT). The metabolites 3-HPAA, 4-HPAA, and hippuric acid remained almost ineffective [208]. Similarly, quercetin and 3,4-DHT showed the potency to inhibit cholesterol synthesis. Another *in vitro* study, testing the radical scavenging capacity of 3,4-DHPAA, 3-HPAA, and 4-HPPA in human polymorphonuclear cells (stimulated with opsonized zymosan or N-formyl-methionyl-leucyl phenylalanine) revealed that out of the 3 metabolites investigated, only 3,4-DHPAA was active [209]. This radical scavenging capacity is of utmost importance when considering the cell protection from cytotoxicity. Indeed, as an adjunct to its radical scavenging properties, 3,4-DHPAA activates phase 2 cytoprotective enzymes (i.e., hemeoxynegese-1, glutathione S-transferase), increases the gene and protein expression of aldehyde dehydrogenase isozymes in mouse hepatoma Hepa1c1c7 cells, and induces nuclear translocation of Nrf2 and aryl hydrocarbon receptor [210,211], all involved in controlling cellular REDOX status and in inhibiting cell cytotoxicity.

In vitro studies have also established the anti-inflammatory properties of quercetin metabolites. For example, experiments with lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood

mononuclear cells showed the modulatory effect of 3,4-DHPPA, 3-HPPA, 3,4-DHPAA, 3-HPAA, and 4-hydroxybenzoic acid on the expression of the central pro-inflammatory cytokines; TNF α , IL-1 β , and IL-6. TNF α expression was also significantly decreased by the metabolites 3,4-DHPPA, 3,4-DHPAA, and 4-hydroxy-hippuric acid (4-HHA), whereas 3,4-DHPPA and 3,4-DHPAA only suppressed secretion of IL-1 β and IL-6 [212]. In another study, in which lipopolysaccharide was used to induce inflammation in RAW 264.7 murine macrophage cell line, 3,4-DHT disclosed an anti-inflammatory capacity by modulating the I κ B/NF- κ B signaling pathway [266]. Surprisingly, very little research has highlighted the potential anti-diabetic properties of colonic metabolites derived flavonoids. However, when the ability of DHPAA and HPPA was examined on β cell function, the findings clearly emphasized an elevated glucose-stimulated insulin secretion, high protection against tert-butyl hydroperoxide-induced β cell toxicity, hence better survival and function of β cells [215]. The last functions were mediated by the activation of protein kinase C and the extracellular regulated kinases (ERKs) pathways. Collectively, these interesting data suggest that flavonol quercetin/rutin metabolites exert anti-diabetic actions.

5.1.2. Flavones and Flavanones Metabolites

Flavones (e.g., apigenin) are present in foods as cereals, parsley, thyme, celery, and citrus fruits under their O-glycosidic or C-glycosides derivatives. Once glucosides are hydrolyzed at the intestinal level by digestive enzymes, unabsorbed aglycons undergo further reactions in the large intestine by specific micro-organisms (*Clostridium orbiscindens*, *Enterococcus avium*) causing C-ring fission. Following the metabolism of apigenin, metabolites [e.g., phloretin chalcon, 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic, 3-(3-hydroxyphenyl)-propionic, and 4-hydroxycinnamic acids] are acquired [221]. Flavanones (e.g., naringenin) are abundant in tomatoes and citrus fruits, and seem to have higher bioavailability in comparison to flavonols and flavan-3-ols [267]. Flavanone deglycosylation and further degradation by colonic microbiota pathways follow the similar fate of flavonols [267]. *Clostridium* species and *Eubacterium ramulus* are largely involved in these transformations in the colon [217,268]. Metabolites, including 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propionic, 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic, and 3-(3-hydroxyphenyl)-propionic acids are produced following naringenin metabolism. However, as for quercetin metabolites, hydroxyphenyl

propionic acids (derived from apigenin and naringenin metabolism) display antioxidant and anti-inflammatory capacities (Table 5).

5.1.3. Isoflavone Daidzein and Daidzin Metabolites

Isoflavone, as a phytoestrogen precursor, is another flavonoid class of interest. Like many types of polyphenols, isoflavones exert advantageous effects on intestinal health, menopause symptoms, hormone-mediated syndromes, and CVD [269]. They are also transformed into their active metabolites by enzymes from the gut microbiota to generate compounds endowed with elevated estrogenic activity (e.g., 40 ,7-isoflavandiol; equol) or inactive compounds (e.g., O-desmethylangolensin; O-DMA) [270]. Importantly, the majority of humans are competent to yield O-DMA, but only 25–50% among them engender equol [271,272]. The potential health properties of equol and O-DMA, both derived from daidzein and its 7-O-glycoside daidzin, are the subject of continuing debate. Some studies claim their beneficial effects on the risk of coronary heart disease events [273,274] and others have shown a limited action [275]. The diverging conclusions stems in part from the inter-individual variability in the gut microbiota [276] or from a characteristic that is influenced by ethnicity [277]. Interestingly enough, prehypertensive postmenopausal women producing equol/O-DMA had more favorable cardiovascular risk profiles than non-producers [278]. Furthermore, equol/O-DMA producers exhibited lower serum uric acid, triglycerides, and waist/hip ratio, as well as a tendency to have higher high-density lipoprotein-cholesterol compared to equol non-producers [279]. These effects are probably exerted through the control of cell redox potential as both equol and O-DMA have antioxidant capacity, exemplified by the stimulation of catalase and total superoxide dismutase activities [226]. In a population-based, cross-sectional investigation, urinary concentrations of isoflavones and equol/O-DMA were related to well-disposed insulin sensitivity and cardiometabolic markers in pregnant women [280]. Other studies emphasized the beneficial role of O-DMA in obesity [281]. However, caution should be exerted when concluding on the effects of isoflavone and related metabolite interventions, as sufficiently randomized controlled trials with statistical are needed [275].

5.1.4. Flavanol Catechin Metabolites

Flavanols or flavan-3-ols are among the most consumed phenolic compounds in Western populations [282]. They are composed of monomers (e.g., catechin, epicatechin, epigallocatechin) and oligomers/polymers (known as proanthocyanidins) [283]. Several groups have reported their ability to prevent chronic diseases (e.g., T2D and CVD) [283–285]. Hydroxy-phenyl- γ -valerolactones and their related hydroxy-phenylvaleric acids are the main metabolites of dietary flavan-3-ols [87,286]. Although a number of studies based on different models aiming at assessing hydroxy-phenyl- γ -valerolactones bioactivity have been reported in the past decade, those involving human subjects are scarce. Inflammatory and OxS processes were particularly studied. For example, (3,4-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone significantly decreased TNF α -induced NF- κ B transcriptional activity in HepG2 cells [92]. Furthermore, a decrease was noted in nitrous oxide production and inducible nitrous oxide synthase expression in the murine macrophage RAW264.7 cells and freshly isolated human monocytes, both treated with (δ -(3,4-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone) a metabolite of the maritime pine bark Pycnogenol [233]. The accumulation of pro-inflammatory cytokine-producing T-lymphocytes and macrophages with the concomitant secretion of the vascular cell-adhesion molecule-1 by the endothelium is key to the early development of the atherosclerotic plaque [287]. Inhibition of this process was observed following the incubation of cultured human umbilical vein endothelial cells with 3,4-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone [234], thereby providing the evidence that this compound is a potential therapeutic target. Transferability of the concentrations (quantities) of natural compounds to in vivo or clinical environment (cytotoxicity) represents a major limit of these *in vitro* experiments. The polyphenolic metabolites 3,4,5-trihydroxyphenyl)- γ -valerolactone and 5-(3,5-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone also displayed, in spontaneously hypertensive rats, the capacity to lower angiotensin-1 converting enzyme activity and blood pressure, both contributing to improving endothelial function and arterial elasticity [235]. Paradoxically, the flavan-3-ol metabolites 5-(3,4,5-trihydroxyphenyl)- γ -valerolactone, 5-(3,4-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone, and 5-(3-methoxy, 4-hydroxyphenyl)- γ -valerolactone did not improve vascular endothelial plasticity of freshly isolated mouse saphenous arteries [236]. The dissimilarity in data could partially be explained by the different models used, especially that isolated saphenous artery endothelium is less reactive than the vessels of the spontaneously hypertensive rat. The *in*

vivo versus the *in vitro* situations and the experimental time frame are also factors that have to be considered. The decrease in obesity, a major element in the development of MetS, in response to the consumption of foods rich in flavan-3-ols (e.g., green tea), has been attributed to the role of their content on polyphenolic metabolites in increasing energy expenditure via the modulation of cell differentiation and thermogenesis in adipose tissues [231]. However, when tested *in vitro*, the flavan-3-ol metabolites [5-(3',4'-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone, 5-(3'-hydroxyphenyl)- γ -valerolactone-4'-O-sulfate, and 5-phenyl- γ -valerolactone-3',4'-di-O-sulfate] did not stimulate cell differentiation and the activation of immortalized pre-adipocytes. In addition, none of the metabolites regulated the expression of the uncoupled protein 1, nor the main transcription factors implicated in brown adipocyte genesis. Nevertheless, both 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone and 5-(3'-hydroxyphenyl)- γ -valerolactone-4'-O-sulfate protected immortalized pre-adipocytes from H₂O₂ generated OxS [231]. In a recent clinical trial, Rodriguez-Mateos et al. [288] showed that cranberry juice given to healthy volunteers improved, in a concentration and time-dependent manner, the flow-mediated vasodilatation, an early clinical sign in the development of atherosclerosis. Interestingly, the plasma level of the flavan-3-ols metabolite, 5-(3'-hydroxyphenyl)- γ -valerolactone-4'-O-sulfate, was significantly positively correlated to flow-mediated vasodilatation. Noteworthy, mice on high-fat diet improved non-alcoholic fatty liver disease by lessening IR and endotoxin-toll-like receptor 4/NF- κ B pathway in response to raised hepatic catechin metabolites (namely phenyl- γ -valerolactones) following catechin-rich green tea extract [289]. Overall, these findings offer promising beneficial health effects of polyphenols metabolites. However, additional clinical studies are necessary to validate the data in humans and to ensure their transferability from *in vitro* and animal models to *in vivo* human situations.

5.1.5. Tannin Ellagitannin and Urolithin Metabolites

Hydrolysable tannins, named ellagitannins, encompass one or more gallic acid units and one or more hexahydroxydiphenolic acid units, ester-connected with a sugar residue. In view of their difficulty to be absorbed in the small intestine, ellagitannins reach the colon where they are hydrolyzed into mainly ellagic acid and urolithin (3,4-benzocoumarin derivatives). Supporting data propose a stringent relationship between the consumption of ellagitannins-rich foods and healthy effects based on animal and human models. The rat under high carbohydrate high-fat

diet-induced MetS model has demonstrated the ability of ellagic acid to improve hepatic and cardiometabolic functions, while normalizing glucose tolerance, blood lipid components, central obesity, and body weight [290]. The mechanisms involved in the modulation of OxS and inflammation are through the protein level regulation of Nrf2 and NF- κ B, with an impact on metabolic pathways such as fatty acid β -oxidation [290]. Other studies confirm the health benefit properties of ellagic acid, for example, by showing that it dose-dependently repressed the IL-1 β -induced production of ROS [248]. This was associated with a significant reduction of the attachment of the established human monocyte cell line to IL-1 β -treated human umbilical vein endothelial cells through the suppression of NF- κ B, thereby downregulating the expression of vascular cell-adhesion molecule-1 and E-selectin and resulting in decreased monocyte adhesion. Along the same line of evidence, ellagic acid significantly inhibited oxidized low-density lipoprotein and platelet-derived growth factor-BB-induced proliferation of rat aortic smooth muscle cells via inactivation of ERK and marked decrease of proliferating cell nuclear antigen. [249]. More evidence for ellagic acid effects in preventing the development of atherosclerotic events has been provided by showing its capacity of reducing platelet growth factor (PDGF) receptor- β -phosphorylation, diminishing ROS production, and lessening downstream activation of ERK, and finally blocking platelet-derived growth factor-induced expression of cyclin D1 in primary cultures of rat aortic smooth muscle cells [291]. Moreover, these *in vitro* results were further supported by the ability of ellagic acid to block T2D-induced medial thickness, and lipid and collagen deposition in the arch of aorta in streptozotocin-induced diabetic rats [291]. Collectively, these data suggest that ellagic acid can inhibit OxS and inflammation response, which thus favorably contributes to the regulation of vascular homeostasis. Urolithins, formed primarily from the oxidative linkage of galloyl groups, have extensively emerged as novel natural bioactive compounds, being currently the focus of extensive investigations. The type of urolithin produced depends on the colon microbiome. Three ellagitannins metabolizing metabolotypes have been identified: 'metabotype A' (producers of the dihydroxylated urolithin-A conjugates), 'metabotype B' (producers of urolithin-A/isourolithin-A conjugates and/or monohydroxylated urolithin-B conjugates), and 'metabotype 00 (no urolithins produced) [292]. Contrary to the parent compounds, which bloodstream concentrations are negligible, these ellagic acid derivatives may

reach micromolar concentrations and thus act as surrogate biomarkers of the inter-individual variation in the colon metabotype [245]. Among the numerous metabolites, urolithin-A has been particularly studied in terms of its anti-inflammatory and anti-oxidative properties both *in vitro* and *in vivo* [250,293,294], as well as anti-atherosclerotic and anti-angiogenic activities [293,295]. In line with these features, adhesion model involving established human aortic endothelial cells and human leukemia monocytic THP-1 cells showed that urolithin-A inhibited TNF α -stimulated adhesiveness and endothelial cell migration [257]. To delve deeper and uncover the mechanisms, the authors could further demonstrate that these effects were concomitant to a down regulation of the levels of chemokine ligand 2, plasminogen activator inhibitor-1, and IL-8. Even more interesting, a clinical trial provided evidence that overweight-obese individuals consuming ellagitannin-containing food with the urolithin metabotype producing urolithin-A were protected against CMD when compared to those with a urolithin-B metabotype [296]. Despite the small number of participants, this clinical trial pointed out the important inter-individual disparity in metabolizing polyphenols, the regulation by microbiota, and indicated that urine metabolite profiling is a valuable tool in assessing potential effects. Fecal polyphenol metabolite profiling could also shed some light on the mechanisms of action. In this context, the profile of fecal phenolic-derived metabolites correlated to blood biomarkers of OxS and inflammation, thus providing support to this avenue [297]. Urolithin may constitute a central regulator of CMD as IR decreased in response to urolithin administration to mice fed high-fat, high-sucrose diet [298]. Concomitantly, urolithin lowered glucose, fatty acids, and triglycerides, while ameliorating adiponectin and mitochondrial function. Furthermore, in the same animal model, through thyroid hormone modulation, urolithin increased energy expenditure by enhancing thermogenesis in brown adipose tissue and inducing browning of white adipose tissue [299]. Therefore, this first-in-class natural compound contributed to metabolic homeostasis via its capacity to normalize OxS, inflammation, obesity, and IR, which overall contribute to MetS.

5.2. Non-Flavonoids

5.2.1. Lignan Metabolites

Plant lignans are non-flavonoids, but polyphenolic, phytoestrogenic compounds. They exhibit several biological functions with potent protective benefits. Anti-estrogenic, antioxidant, anti-inflammatory, anti-atherosclerotic, and anti-carcinogenic effects are among their properties, thereby conferring therapeutic values [300,301]. These properties explain the impact of lignan-rich diets on the prevention of hyperlipidemia, IR and hyperglycemia, T2D, and CMD [302–304]. The most frequent forms of dietary lignans are secoisolariciresinol, lariciresinol, pinoresinol, and matairesinol, which are metabolized by gut microflora enzymes into enterolignans such as enterodiols and enterolactone undergoing enterohepatic circulation [305,306]. At least, 28 bacterial species belonging to 12 different genera (e.g., Bacteroides, Clostridium, Bifidobacterium, and Ruminococcus) have been identified to be involved in the transformation of lignans to enterolignans [307]. Several groups have quantified the concentrations of the enterolactone metabolite in blood and urine, and reported a protective association in view of the reduction (30–45%) of cardiovascular mortality [308]. Similarly, in a prospective investigation, enterolactone (more than enterodiols) was associated with a lower risk of T2D in U.S. women [309]. A cross-sectional trial of the general U.S. population found that subjects with high excretion of enterolactone had lower odds of having MetS [310]. Moreover, in a representative sample of U.S. adults, the cross-sectional analysis of data detected that urinary enterolignan concentrations are associated with lower serum triglyceride and greater high-density lipoprotein-cholesterol concentrations in U.S. adults [311]. Additional efforts are obviously needed to confirm these interesting cardiometabolic findings and to explore potential mechanisms of action behind diverse enterolignan metabolites.

5.2.2. Resveratrol Metabolites

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) belongs to the stilbene derivative and is a dietary polyphenolic compound accessible in 70 plant species such as grapes, mulberries, and peanuts [312]. Its pleiotropic effects have made it so famous that it is called a star molecule. It displays numerous biological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, cardioprotective, anti-aging, and cancer-chemopreventive features [313,314]. Accordingly, the wealth of scientific reports revealed the effectiveness and beneficial actions of resveratrol in MetS and related disorders such as obesity, IR, and T2D [315,316]). For example, a meta-analysis evaluating 11

studies involving 388 T2D subjects mentioned that resveratrol markedly lessened fasting glucose, insulin, haemoglobin A1c, and IR [278]. Resveratrol was also able to improve hypertension by acting on vascular nitric oxide production, reducing endothelial dysfunction and arteriolar remodeling [317,318]. However, other studies could not record advantageous data on MetS in response to resveratrol [319]. Today, it is well established that resveratrol is easily absorbed by the intestine and promptly metabolized to produce glucuronide and sulfate conjugates [320,321]. Although many gaps are still persistent in the metabolic route of resveratrol, intestinal bacteria transform resveratrol into dihydroresveratrol, known to be partially absorbed and subsequently metabolized to conjugated forms, which can be excreted in urine [322,323]. Besides dihydroresveratrol, two additional bacterial trans-resveratrol metabolites were identified: 3,4' -dihydroxy-trans-stilbene and 3,4' -dihydroxybibenzyl (lunularin) [264]. Large inter-individual variation was noticed in different subjects: some of them were lunularin producers, others were dihydroresveratrol producers, and the last category was mixed producers, according to levels of these metabolites [264]. Clearly, there was a close relationship between lunularin producers and the abundance of Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia, and Cyanobacteria, along with lower abundance of Firmicutes compared to dihydroresveratrol or mixed producers [264]. Whether resveratrol metabolites are physiologically relevant to tackle metabolic disorders still remains an enigma.

6. Conclusions

Consuming a diet rich in fruits and vegetables is associated with a reduced risk of several noncommunicable lifestyle-related diseases, including CVD. They contribute several essential and bioactive micronutrients such as polyphenols. The first goal of this review was to focus on the available and pertinent literature, which assessed the health-promoting potential of polyphenols to modulate OxS and inflammation. These two major components are powerful inducers of IR, leading to CMD, especially MetS and related complications such as T2D and atherosclerosis. For the reader's benefit, our review first summarized the most widely distributed classes, sources, and properties of the naturally occurring polyphenols, separated into two main groups, flavonoids and non-flavonoid compounds. Second, attention was paid to their transformation in the intestinal lumen, absorption in different regions of the GI tract, and their bioavailability in the

bloodstream. Clearly, most of polyphenols undergo complex intraluminal transformation during digestive and absorptive processes. Data obtained from critical literature revision underline the poor bioavailability, aqueous solubility, permeability, and instability of especially polyphenols with high molecular weights. Third, considerable emphasis was devoted to the essential polyphenol-microbiota interaction as polyphenols directly exert their regulatory effects on intestinal bacteria with concomitant biotransformation of polyphenols into metabolites by gut microbiota. This fundamental interplay provides the central explanation as to the stupefying pleiotropic biological/clinical actions and functions of “parent” polyphenols whereas their systemic bioavailability is incredibly limited, which highlights the prominent contribution of polyphenol metabolites. Fourth, the multifaceted actions and functions of “parent” polyphenols were summed up. Not only do polyphenols show the great ability to regulate cellular, molecular, and physiological pathways in relation with OxS and inflammation, but they also exhibit a remarkable effectiveness in improving cardiometabolic biomarkers to the advantage of human health. Thanks to their anti-obesogenic, -hyperlipidemic, -hypertensive, -IR, -atherosclerotic, as well as -diabetic effects, they may help to prevent and treat CMD as global public health problems with vast mortality and economic consequences. Fifth, although polyphenol metabolites were also shown to play a similar beneficial role in metabolic complications, there are various enigmatic issues to deal with: inter-individual differences in the microbial conversion of parent polyphenols, largely unknown microbial metabolites from distinct polyphenols, unidentifiable bacterial strains involved, metabolite health-promoting effects of a multitude of metabolites, elusive metabolite doses, the underlying mechanisms of their specific actions, and the lack of clinical trials.

Author Contributions: Conceptualization, E.L. and E.D.; methodology, E.L.; validation, E.L. and E.D.; resources, E.L.; data curation, M.K., F.F. and E.D.; writing—original draft preparation, E.D. and E.L.; writing—review and editing, S.S., Y.D. and E.L.; supervision, E.L.; project administration, S.S.; funding acquisition, E.L. and Y.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant from the JA deSève Research Chair in nutrition (E.L.) and the NSERC-Diana Food Industrial Chair on prebiotic effects of polyphenols (401240871) (E.L. & Y.D.).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations CMD: cardiometabolic disorders; CVD: cardiovascular disease; DAPP: dried apple peels; ERK: extracellular regulated kinases; GI: gastrointestinal; HPAA: phenylacetic acids; HPPA: phenylpropionic acid; IL: interleukin; IPEC: intestinal porcine enterocyte cell line; IR: insulin resistance; MetS: Metabolic syndrome; miRNAs: micro-RNAs; NF- κ B: nuclear factor-kappa B; Nrf2: nuclear redox factor-2; OxS: oxidative stress; ROS: reactive oxygen species; TNF α : tumor necrosis factor-alpha.

References

1. Chen, Y.; Huang, L.; Liang, X.; Dai, P.; Zhang, Y.; Li, B.; Lin, X.; Sun, C. Enhancement of polyphenolic metabolism as an adaptive response of lettuce (*Lactuca sativa*) roots to aluminum stress. *Environ. Pollut.* 2020, 261, 114230. [CrossRef]
2. Czerniewicz, P.; Sytykiewicz, H.; Durak, R.; Borowiak-Sobkowiak, B.; Chrzanowski, G. Role of phenolic compounds during antioxidative responses of winter triticale to aphid and beetle attack. *Plant Physiol. Biochem.* 2017, 118, 529–540. [CrossRef]
3. Mestar, N.G.; Boudiaf, M.N.; Lahcene, S.; Abbaci, H.; Aiche, G.I.; Metna, B.; Saadoun, N.S.; Taibi, F.; Houali, K. Bio-insecticidal effects of Oleaster leaves aqueous extracts against *Psylla* larvae (*Euphyllura olivina* (Costa)), a primary pest of *Olea europaea* L. *Cell Mol. Biol.* 2018, 64, 35–40. [CrossRef]
4. Antonioli, A.; Fontana, A.R.; Piccoli, P.; Bottini, R. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chem.* 2015, 178, 172–178. [CrossRef]
5. Anhe, F.F.; Roy, D.; Pilon, G.; Dudonne, S.; Matamoros, S.; Varin, T.V.; Garofalo, C.; Moine, Q.; Desjardins, Y.; Levy, E.; et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* 2015, 64, 872–883. [CrossRef]
6. D'Amore, S.; Vacca, M.; Cariello, M.; Graziano, G.; D'Orazio, A.; Salvia, R.; Sasso, R.C.; Sabba, C.; Palasciano, G.; Moschetta, A. Genes and miRNA expression signatures in peripheral blood

mononuclear cells in healthy subjects and patients with metabolic syndrome after acute intake of extra virgin olive oil. *Biochim. Biophys. Acta* 2016, 1861, 1671–1680. [CrossRef] [PubMed]

7. Kantartzis, K.; Fritsche, L.; Bombrich, M.; Machann, J.; Schick, F.; Staiger, H.; Kunz, I.; Schoop, R.; Lehn-Stefan, A.; Heni, M.; et al. Effects of resveratrol supplementation on liver fat content in overweight and insulin-resistant subjects: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Diabet. Obes. Metab.* 2018, 20, 1793–1797. [CrossRef]

8. Paquette, M.; Medina Larque, A.S.; Weisnagel, S.J.; Desjardins, Y.; Marois, J.; Pilon, G.; Dudonne, S.; Marette, A.; Jacques, H. Strawberry and cranberry polyphenols improve insulin sensitivity in insulin-resistant, non-diabetic adults: A parallel, double-blind, controlled and randomised clinical trial. *Br. J. Nutr.* 2017, 117, 519–531. [CrossRef]

9. Babu, P.V.A.; Liu, D.; Gilbert, E.R. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J. Nutr. Biochem.* 2013, 24, 1777–1789. [CrossRef]

10. Dominguez Avila, J.A.; Rodrigo Garcia, J.; Gonzalez Aguilar, G.A.; de la Rosa, L.A. The Antidiabetic Mechanisms of Polyphenols Related to Increased Glucagon-Like Peptide-1 (GLP1) and Insulin Signaling. *Molecules* 2017, 22, 903. [CrossRef]

11. Les, F.; Casedas, G.; Gomez, C.; Moliner, C.; Valero, M.S.; Lopez, V. The role of anthocyanins as antidiabetic agents: From molecular mechanisms to in vivo and human studies. *J. Physiol. Biochem.* 2020. [CrossRef] [PubMed]

12. Macho-Gonzalez, A.; Lopez-Oliva, M.E.; Merino, J.J.; Garcia-Fernandez, R.A.; Garcimartin, A.; Redondo-Castillejo, R.; Bastida, S.; Sanchez-Muniz, F.J.; Benedi, J. Carob fruit extract-enriched meat improves pancreatic beta-cell dysfunction, hepatic insulin signaling and lipogenesis in late-stage type 2 diabetes mellitus model. *J. Nutr. Biochem.* 2020, 84, 108461. [CrossRef] [PubMed]

13. Wang, S.; Moustaid-Moussa, N.; Chen, L.; Mo, H.; Shastri, A.; Su, R.; Bapat, P.; Kwun, I.; Shen, C.L. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J. Nutr. Biochem.* 2014, 25, 1–18. [CrossRef] [PubMed]

14. Cho, Y.J.; Lee, H.G.; Seo, K.H.; Yokoyama, W.; Kim, H. Antiobesity Effect of Prebiotic Polyphenol-Rich Grape Seed Flour Supplemented with Probiotic Kefir-Derived Lactic Acid Bacteria. *J. Agric. Food. Chem.* 2018, 66, 12498–12511. [CrossRef]
15. Sandoval, V.; Sanz-Lamora, H.; Arias, G.; Marrero, P.F.; Haro, D.; Relat, J. Metabolic Impact of Flavonoids Consumption in Obesity: From Central to Peripheral. *Nutrients* 2020, 12, 2393. [CrossRef]
16. Anhe, F.F.; Nachbar, R.T.; Varin, T.V.; Trottier, J.; Dudonne, S.; Le Barz, M.; Feutry, P.; Pilon, G.; Barbier, O.; Desjardins, Y.; et al. Treatment with camu camu (*Myrciaria dubia*) prevents obesity by altering the gut microbiota and increasing energy expenditure in diet-induced obese mice. *Gut* 2019, 68, 453–464. [CrossRef]
17. McKay, D.L.; Blumberg, J.B. Cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and cardiovascular disease risk factors. *Nutr. Rev.* 2007, 65, 490–502. [CrossRef]
18. Ruel, G.; Couillard, C. Evidences of the cardioprotective potential of fruits: The case of cranberries. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 692–701. [CrossRef]
19. Ruel, G.; Lapointe, A.; Pomerleau, S.; Couture, P.; Lemieux, S.; Lamarche, B.; Couillard, C. Evidence that cranberry juice may improve augmentation index in overweight men. *Nutr. Res.* 2013, 33, 41–49. [CrossRef]
20. Martinez-Gonzalez, M.A.; Gea, A.; Ruiz-Canela, M. The Mediterranean Diet and Cardiovascular Health. *Circ. Res.* 2019, 124, 779–798. [CrossRef]
21. Ferrari, C.K.B. Anti-atherosclerotic and cardiovascular protective benefits of Brazilian nuts. *Front. Biosci. Schol Ed.* 2020, 12, 38–56. [CrossRef]
22. Perez de Vega, M.J.; Moreno-Fernandez, S.; Pontes-Quero, G.M.; Gonzalez-Amor, M.; Vazquez-Lasa, B.; Sabater-Munoz, B.; Briones, A.M.; Aguilar, M.R.; Miguel, M.; Gonzalez-Muniz, R. Characterization of Novel Synthetic Polyphenols: Validation of Antioxidant and Vasculoprotective Activities. *Antioxidants* 2020, 9, 787. [CrossRef]

23. Devi, S.A.; Chamoli, A. Polyphenols as an Effective Therapeutic Intervention Against Cognitive Decline During Normal and Pathological Brain Aging. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2020, 1260, 159–174.
24. Oppedisano, F.; Maiuolo, J.; Gliozzi, M.; Musolino, V.; Carresi, C.; Nucera, S.; Scicchitano, M.; Scarano, F.; Bosco, F.; Macri, R.; et al. The Potential for Natural Antioxidant Supplementation in the Early Stages of Neurodegenerative Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 2618. [CrossRef]
25. Silva, R.F.M.; Pogacnik, L. Polyphenols from Food and Natural Products: Neuroprotection and Safety. *Antioxidants* 2020, 9, 61. [CrossRef]
26. Bensalem, J.; Dudonne, S.; Gaudout, D.; Servant, L.; Calon, F.; Desjardins, Y.; Laye, S.; Lafenetre, P.; Pallet, V. Polyphenol-rich extract from grape and blueberry attenuates cognitive decline and improves neuronal function in aged mice. *J. Nutr. Sci.* 2018, 7, e19. [CrossRef]
27. Mao, X.; Xiao, X.; Chen, D.; Yu, B.; He, J. Tea and Its Components Prevent Cancer: A Review of the Redox-Related Mechanism. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 5249. [CrossRef]
28. Toric, J.; Markovic, A.K.; Brala, C.J.; Barbaric, M. Anticancer effects of olive oil polyphenols and their combinations with anticancer drugs. *Acta Pharm.* 2019, 69, 461–482. [CrossRef]
29. Abdelgawad, I.Y.; Grant, M.K.O.; Zordoky, B.N. Leveraging the Cardio-Protective and Anticancer Properties of Resveratrol in Cardio-Oncology. *Nutrients* 2019, 11, 627. [CrossRef] [PubMed]
30. Horne, J.R.; Vohl, M.C. Biological plausibility for interactions between dietary fat, resveratrol, ACE2, and SARS-CoV illness severity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2020, 318, e830–e833. [CrossRef]
31. Mani, J.S.; Johnson, J.B.; Steel, J.C.; Broszczak, D.A.; Neilsen, P.M.; Walsh, K.B.; Naiker, M. Natural product-derived phytochemicals as potential agents against coronaviruses: A review. *Virus Res.* 2020, 284, 197989. [CrossRef]
32. Levy, E.; Delvin, E.; Marcil, V.; Spahis, S. May phytotherapy with polyphenols serve as a powerful approach for the prevention and therapy tool of novel coronavirus disease 2019 (Covid-19)? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2020, 319. [CrossRef]

33. Dabeek, W.M.; Marra, M.V. Dietary Quercetin and Kaempferol: Bioavailability and Potential Cardiovascular-Related Bioactivity in Humans. *Nutrients* 2019, 11, 2288. [CrossRef]
34. Rechner, A.R.; Kuhnle, G.; Bremner, P.; Hubbard, G.P.; Moore, K.P.; Rice-Evans, C.A. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 2002, 33, 220–235. [CrossRef]
35. D'Archivio, M.; Filesi, C.; Vari, R.; Sczzocchio, B.; Masella, R. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11, 1321–1342. [CrossRef]
36. Brglez Mojzer, E.; Knez Hrnčić, M.; Skerget, M.; Knez, Z.; Bren, U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* 2016, 21, 901. [CrossRef]
37. Kawabata, K.; Yoshioka, Y.; Terao, J. Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules* 2019, 24, 370. [CrossRef]
38. Cardona, F.; Andrés-Lacueva, C.; Tulipani, S.; Tinahones, F.J.; Queipo-Ortuño, M.I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J. Nutr. Biochem.* 2013, 24, 1415–1422. [CrossRef]
39. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 1998, 56, 317–333. [CrossRef]
40. Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 2009, 26, 1001–1043. [CrossRef]
41. Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2010, 2, 1231–1246. [CrossRef]
42. Smeriglio, A.; Barreca, D.; Bellocco, E.; Trombetta, D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: Occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *Br. J. Pharmacol.* 2017, 174, 1244–1262. [CrossRef]
43. Prigent, S.V.; Gruppen, H.; Visser, A.J.; Van Koningsveld, G.A.; De Jong, G.A.; Voragen, A.G. Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat

denaturation and solubility of globular proteins. *J. Agric. Food. Chem.* 2003, 51, 5088–5095. [CrossRef]

44. Prigent, S.V.; Voragen, A.G.; Li, F.; Visser, A.J.; van Koningsveld, G.A.; Gruppen, H. Covalent interactions between amino acid side chains and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid). *J. Sci. Food Agric.* 2008, 88, 1748–1754. [CrossRef]

45. Le Bourvellec, C.; Renard, C.M. Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2012, 52, 213–248. [CrossRef]

46. Kevers, C.; Pincemail, J.; Tabart, J.; Defraigne, J.O.; Dommes, J. Influence of cultivar, harvest time, storage conditions, and peeling on the antioxidant capacity and phenolic and ascorbic acid contents of apples and pears. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 6165–6171. [CrossRef] [PubMed]

47. Gomez-Rico, A.; Salvador, M.D.; La Greca, M.; Fregapane, G. Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 7130–7136. [CrossRef]

48. Bonoli, M.; Bendini, A.; Cerretani, L.; Lercker, G.; Toschi, T.G. Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 7026–7032. [CrossRef]

49. Yao, L.H.; Jiang, Y.M.; Shi, J.; Tomas-Barberan, F.A.; Datta, N.; Singanusong, R.; Chen, S.S. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2004, 59, 113–122. [CrossRef]

50. Marti, M.P.; Pantaleon, A.; Rozek, A.; Soler, A.; Valls, J.; Macia, A.; Romero, M.P.; Motilva, M.J. Rapid analysis of procyanidins and anthocyanins in plasma by microelution SPE and ultra-HPLC. *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 2841–2853. [CrossRef]

51. Denis, M.C.; Dubé, P.; Dudonné, S.; Desjardins, Y.; Matei, C.; Delvin, E.; Levy, E.; Furtos, A. Characterization of bioactive cranberry fractions by mass spectrometry. *Can. J. Chem.* 2020, in press. [CrossRef]

52. Meng, X.; Maliakal, P.; Lu, H.; Lee, M.J.; Yang, C.S. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 935–942. [CrossRef]
53. Vallejo, F.; Tomas-Barberan, F.; Garcia-Viguera, C. Health-promoting compounds in broccoli as influenced by refrigerated transport and retail sale period. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3029–3034. [CrossRef]
54. Xu, B.; Chang, S.K. Total Phenolic, Phenolic Acid, Anthocyanin, Flavan-3-ol, and Flavonol Profiles and Antioxidant Properties of Pinto and Black Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as Affected by Thermal Processing. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 4754–4764. [CrossRef] [PubMed]
55. Khatun, M.; Eguchi, S.; Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Matoba, T. Effect of Thermal Treatment on Radical-scavenging Activity of Some Spices. *Food Sci. Technol. Res.* 2006, 12, 178–185. [CrossRef]
56. Azuma, K.; Ippoushi, K.; Ito, H.; Higashio, H.; Terao, J. Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 1706–1712. [CrossRef]
57. Visioli, F.; Galli, C.; Grande, S.; Colonnelli, K.; Patelli, C.; Galli, G.; Caruso, D. Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J. Nutr.* 2003, 133, 2612–2615. [CrossRef] [PubMed]
58. Williamson, G.; Kay, C.D.; Crozier, A. The Bioavailability, Transport, and Bioactivity of Dietary Flavonoids: A Review from a Historical Perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2018, 17, 1054–1112. [CrossRef]
59. Pérez-Jiménez, J.; Hubert, J.; Hooper, L.; Cassidy, A.; Manach, C.; Williamson, G.; Scalbert, A. Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: A systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010, 92, 801–809. [CrossRef]
60. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 727–747. [CrossRef]

61. Gonthier, M.P.; Donovan, J.L.; Texier, O.; Felgines, C.; Remesy, C.; Scalbert, A. Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, 35, 837–844. [CrossRef]
62. Chen, Z.; Zheng, S.; Li, L.; Jiang, H. Metabolism of flavonoids in human: A comprehensive review. *Curr. Drug Metab.* 2014, 15, 48–61. [CrossRef]
63. Villa-Rodriguez, J.A.; Ifie, I.; Gonzalez-Aguilar, G.A.; Roopchand, D.E. The Gastrointestinal Tract as Prime Site for Cardiometabolic Protection by Dietary Polyphenols. *Adv. Nutr.* 2019, 10, 999–1011. [CrossRef]
64. Spencer, J.P.; Chaudry, F.; Pannala, A.S.; Srail, S.K.; Debnam, E.; Rice-Evans, C. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 272, 236–241. [CrossRef] [PubMed]
65. Zhu, Q.Y.; Holt, R.R.; Lazarus, S.A.; Ensunsa, J.L.; Hammerstone, J.F.; Schmitz, H.H.; Keen, C.L. Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 1700–1705. [CrossRef] [PubMed]
66. Corona, G.; Tzounis, X.; Assunta Dessi, M.; Deiana, M.; Debnam, E.S.; Visioli, F.; Spencer, J.P. The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: Implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radic. Res.* 2006, 40, 647–658. [CrossRef] [PubMed]
67. Serra, A.; Macia, A.; Romero, M.P.; Valls, J.; Blade, C.; Arola, L.; Motilva, M.J. Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in *in vitro* and *in vivo* models. *Br. J. Nutr.* 2010, 103, 944–952. [CrossRef]
68. Kahle, K.; Kempf, M.; Schreier, P.; Scheppach, W.; Schrenk, D.; Kautenburger, T.; Hecker, D.; Huemmer, W.; Ackermann, M.; Richling, E. Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *Eur. J. Nutr.* 2011, 50, 507–522. [CrossRef]
69. Van Rymenant, E.; Salden, B.; Voorspoels, S.; Jacobs, G.; Noten, B.; Pitart, J.; Possemiers, S.; Smagghe, G.; Grootaert, C.; Van Camp, J. A Critical Evaluation of *In Vitro* Hesperidin 2S Bioavailability in a Model Combining Luminal (Microbial) Digestion and Caco-2 Cell Absorption in

Comparison to a Randomized Controlled Human Trial. *Mol. Nutr. Food Res.* 2018, 62, e1700881. [CrossRef]

70. Hu, X.P.; Yin, F.W.; Zhou, D.Y.; Xie, H.K.; Zhu, B.W.; Ma, X.C.; Tian, X.G.; Wang, C.; Shahidi, F. Stability of resveratrol esters with caprylic acid during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chem.* 2019, 276, 675–679. [CrossRef]

71. Liu, D.; Dhital, S.; Wu, P.; Chen, X.D.; Gidley, M.J. *In Vitro* Digestion of Apple Tissue Using a Dynamic Stomach Model: Grinding and Crushing Effects on Polyphenol Bioaccessibility. *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 574–583. [CrossRef] [PubMed]

72. Ma, T.; Lan, T.; Geng, T.; Ju, Y.; Cheng, G.; Que, Z.; Gao, G.; Fang, Y.; Sun, X. Nutritional properties and biological activities of kiwifruit (*Actinidia*) and kiwifruit products under simulated gastrointestinal *in vitro* digestion. *Food Nutr. Res.* 2019, 63. [CrossRef] [PubMed]

73. Rios, L.Y.; Bennett, R.N.; Lazarus, S.A.; Remesy, C.; Scalbert, A.; Williamson, G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002, 76, 1106–1110. [CrossRef] [PubMed]

74. Konishi, Y.; Zhao, Z.; Shimizu, M. Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 7539–7543. [CrossRef]

75. Pforte, H.; Hempel, J.; Jacobasch, G. Distribution pattern of a flavonoid extract in the gastrointestinal lumen and wall of rats. *Nahrung* 1999, 43, 205–208. [CrossRef]

76. Piskula, M.K.; Yamakoshi, J.; Iwai, Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett.* 1999, 447, 287–291. [CrossRef]

77. Crespy, V.; Morand, C.; Besson, C.; Manach, C.; Demigne, C.; Remesy, C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 618–621. [CrossRef]

78. Gil-Izquierdo, A.; Zafrilla, P.; Tomás-Barberán, F.A. An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *Eur. Food Res. Technol.* 2002, 214, 155–159. [CrossRef]

79. Ortega, N.; Reguant, J.; Romero, M.P.; Macia, A.; Motilva, M.J. Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an *in vitro* digestion model. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 5743–5749. [CrossRef]
80. Tsai, Y.M.; Chang-Liao, W.L.; Chien, C.F.; Lin, L.C.; Tsai, T.H. Effects of polymer molecular weight on relative oral bioavailability of curcumin. *Int. J. Nanomed.* 2012, 7, 2957–2966. [CrossRef]
81. Day, A.J.; Gee, J.M.; DuPont, M.S.; Johnson, I.T.; Williamson, G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: The role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 65, 1199–1206. [CrossRef]
82. Henry-Vitrac, C.; Desmouliere, A.; Girard, D.; Merillon, J.M.; Krisa, S. Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells. *Eur. J. Nutr.* 2006, 45, 376–382. [CrossRef]
83. Murota, K.; Nakamura, Y.; Uehara, M. Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2018, 82, 600–610. [CrossRef] [PubMed]
84. Murota, K.; Shimizu, S.; Chujo, H.; Moon, J.-H.; Terao, J. Efficiency of Absorption and Metabolic Conversion of Quercetin and Its Glucosides in Human Intestinal Cell Line Caco-2. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000, 384, 391–397. [CrossRef] [PubMed]
85. Amaretti, A.; Raimondi, S.; Leonardi, A.; Quartieri, A.; Rossi, M. Hydrolysis of the rutinose-conjugates flavonoids rutin and hesperidin by the gut microbiota and bifidobacteria. *Nutrients* 2015, 7, 2788–2800. [CrossRef] [PubMed]
86. Song, Q.; Li, D.; Zhou, Y.; Yang, J.; Yang, W.; Zhou, G.; Wen, J. Enhanced uptake and transport of (+)-catechin and (–)-epigallocatechin gallate in niosomal formulation by human intestinal Caco-2 cells. *Int. J. Nanomed.* 2014, 9, 2157–2165. [CrossRef]
87. Borges, G.; Ottaviani, J.I.; van der Hoof, J.J.J.; Schroeter, H.; Crozier, A. Absorption, metabolism, distribution and excretion of (–)-epicatechin: A review of recent findings. *Mol. Asp. Med.* 2018, 61, 18–30. [CrossRef]
88. Levy, E.; Yotov, W.; Seidman, E.G.; Garofalo, C.; Delvin, E.;

Menard, D. Caco-2 cells and human fetal colon: A comparative analysis of their lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1439, 353–362. [CrossRef]

89. Nauli, A.M.; Nauli, S.M. Intestinal transport as a potential determinant of drug bioavailability. *Curr. Clin. Pharmacol.* 2013, 8, 247–255. [CrossRef]

90. Kern, S.M.; Bennett, R.N.; Needs, P.W.; Mellon, F.A.; Kroon, P.A.; Garcia-Conesa, M.T. Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the *in vitro* model of human small intestinal epithelium caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 7884–7891. [CrossRef]

91. Hu, J.N.; Zou, X.G.; He, Y.; Chen, F.; Deng, Z.Y. Esterification of Quercetin Increases Its Transport across Human Caco-2 Cells. *J. Food Sci.* 2016, 81, H1825–H1832. [CrossRef] [PubMed]

92. Su, H.F.; Lin, Q.; Wang, X.Y.; Fu, Y.; Gong, T.; Sun, X.; Zhang, Z.R. Absorptive interactions of concurrent oral administration of (+)-catechin and puerarin in rats and the underlying mechanisms. *Acta Pharmacol. Sin.* 2016, 37, 545–554. [CrossRef] [PubMed]

93. Dudonne, S.; Dal-Pan, A.; Dube, P.; Varin, T.V.; Calon, F.; Desjardins, Y. Potentiation of the bioavailability of blueberry phenolic compounds by co-ingested grape phenolic compounds in mice, revealed by targeted metabolomic profiling in plasma and feces. *Food Funct.* 2016, 7, 3421–3430. [CrossRef] [PubMed]

94. Dudonne, S.; Dube, P.; Pilon, G.; Marette, A.; Jacques, H.; Weisnagel, J.; Desjardins, Y. Modulation of Strawberry/Cranberry Phenolic Compounds Glucuronidation by Co-Supplementation with Onion: Characterization of Phenolic Metabolites in Rat Plasma Using an Optimized muSPE-UHPLC-MS/MS Method. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 3244–3256. [CrossRef]

95. Deglaire, A.; Moughan, P.J. Animal models for determining amino acid digestibility in humans—A review. *Br. J. Nutr.* 2012, 108 (Suppl. S2), S273–S281. [CrossRef]

96. Vergauwen, H. The IPEC-J2 Cell Line. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*; Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 125–134.

97. Chedea, V.S.; Palade, L.M.; Marin, D.E.; Pelmus, R.S.; Habeanu, M.; Rotar, M.C.; Gras, M.A.; Pistol, G.C.; Taranu, I. Intestinal Absorption and Antioxidant Activity of Grape Pomace Polyphenols. *Nutrients* 2018, 10, 588. [CrossRef]
98. Wang, W.; Sun, C.; Mao, L.; Ma, P.; Liu, F.; Yang, J.; Gao, Y. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Food Sci. Tech.* 2016, 56, 21–38. [CrossRef]
99. Zhang, L.; Wang, Y.; Li, D.; Ho, C.T.; Li, J.; Wan, X. The absorption, distribution, metabolism and excretion of procyanidins. *Food Funct.* 2016, 7, 1273–1281. [CrossRef]
100. Rothwell, J.A.; Urpi-Sarda, M.; Boto-Ordóñez, M.; Llorach, R.; Farran-Codina, A.; Barupal, D.K.; Neveu, V.; Manach, C.; Andres-Lacueva, C.; Scalbert, A. Systematic analysis of the polyphenol metabolome using the Phenol-Explorer database. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016, 60, 203–211. [CrossRef]
101. Martínez-Maqueda, D.; Miralles, B.; Recio, I. HT29 Cell Line. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*; Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 113–124.
102. Bergmann, H.; Rogoll, D.; Scheppach, W.; Melcher, R.; Richling, E. The Ussing type chamber model to study the intestinal transport and modulation of specific tight-junction genes using a colonic cell line. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, 53, 1211–1225. [CrossRef]
103. Alsolmei, F.A.; Li, H.; Pereira, S.L.; Krishnan, P.; Johns, P.W.; Siddiqui, R.A. Polyphenol-Enriched Plum Extract Enhances Myotubule Formation and Anabolism while Attenuating Colon Cancer-induced Cellular Damage in C2C12 Cells. *Nutrients* 2019, 11, 1077. [CrossRef]
104. Blanquer-Rossello, M.D.; Hernandez-Lopez, R.; Roca, P.; Oliver, J.; Valle, A. Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2017, 1861, 431–440. [CrossRef]

105. Saunier, E.; Antonio, S.; Regazzetti, A.; Auzeil, N.; Laprevote, O.; Shay, J.W.; Coumoul, X.; Barouki, R.; Benelli, C.; Huc, L.; et al. Resveratrol reverses the Warburg effect by targeting the pyruvate dehydrogenase complex in colon cancer cells. *Sci. Rep.* 2017, 7, 6945. [CrossRef]
106. Valdes, A.; Garcia-Canas, V.; Simo, C.; Ibanez, C.; Micol, V.; Ferragut, J.A.; Cifuentes, A. Comprehensive foodomics study on the mechanisms operating at various molecular levels in cancer cells in response to individual rosemary polyphenols. *Anal. Chem.* 2014, 86, 9807–9815. [CrossRef]
107. Williamson, G.; Clifford, M.N. Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* 2017, 139, 24–39. [CrossRef]
108. Marin, L.; Miguelez, E.M.; Villar, C.J.; Lombo, F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. *Biomed. Res. Int.* 2015, 2015, 905215. [CrossRef]
109. Monagas, M.; Urpi-Sarda, M.; Sanchez-Patan, F.; Llorach, R.; Garrido, I.; Gomez-Cordoves, C.; Andres-Lacueva, C.; Bartolome, B. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct.* 2010, 1, 233–253. [CrossRef]
110. Neish, A.S. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009, 136, 65–80. [CrossRef] 111. Arora, T.; Backhed, F. The gut microbiota and metabolic disease: Current understanding and future perspectives. *J. Intern. Med.* 2016, 280, 339–349. [CrossRef]
112. Korpela, K. Diet, Microbiota, and Metabolic Health: Trade-Off between Saccharolytic and Proteolytic Fermentation. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2018, 9, 65–84. [CrossRef]
113. Ma, N.; Tian, Y.; Wu, Y.; Ma, X. Contributions of the Interaction Between Dietary Protein and Gut Microbiota to Intestinal Health. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2017, 18, 795–808. [CrossRef]
114. Zhao, J.; Zhang, X.; Liu, H.; Brown, M.A.; Qiao, S. Dietary Protein and Gut Microbiota Composition and Function. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2019, 20, 145–154. [CrossRef]

115. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K.S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Levenez, F.; Yamada, T.; et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010, 464, 59–65. [CrossRef]
116. Ou, J.; Carbonero, F.; Zoetendal, E.G.; DeLany, J.P.; Wang, M.; Newton, K.; Gaskins, H.R.; O’Keefe, S.J. Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013, 98, 111–120. [CrossRef]
117. Wu, G.D.; Chen, J.; Hoffmann, C.; Bittinger, K.; Chen, Y.Y.; Keilbaugh, S.A.; Bewtra, M.; Knights, D.; Walters, W.A.; Knight, R.; et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011, 334, 105–108. [CrossRef]
118. Zhernakova, A.; Kurilshikov, A.; Bonder, M.J.; Tigchelaar, E.F.; Schirmer, M.; Vatanen, T.; Mujagic, Z.; Vila, A.V.; Falony, G.; Vieira-Silva, S.; et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* 2016, 352, 565–569. [CrossRef]
119. Kabeerdoss, J.; Devi, R.S.; Mary, R.R.; Ramakrishna, B.S. Faecal microbiota composition in vegetarians: Comparison with omnivores in a cohort of young women in southern India. *Br. J. Nutr.* 2012, 108, 953–957. [CrossRef]
120. David, L.A.; Maurice, C.F.; Carmody, R.N.; Gootenberg, D.B.; Button, J.E.; Wolfe, B.E.; Ling, A.V.; Devlin, A.S.; Varma, Y.; Fischbach, M.A.; et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014, 505, 559–563. [CrossRef]
121. De Filippo, C.; Cavalieri, D.; Di Paola, M.; Ramazzotti, M.; Poullet, J.B.; Massart, S.; Collini, S.; Pieraccini, G.; Lionetti, P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 14691–14696. [CrossRef]
122. Walker, A.W.; Ince, J.; Duncan, S.H.; Webster, L.M.; Holtrop, G.; Ze, X.; Brown, D.; Stares, M.D.; Scott, P.; Bergerat, A.; et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* 2011, 5, 220–230. [CrossRef]

123. Kumar Singh, A.; Cabral, C.; Kumar, R.; Ganguly, R.; Kumar Rana, H.; Gupta, A.; Rosaria Lauro, M.; Carbone, C.; Reis, F.; Pandey, A.K. Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota and Strategies to Improve Delivery Efficiency. *Nutrients* 2019, 11, 2216. [CrossRef]
124. Yin, H.; Deng, Y.; Wang, H.; Liu, W.; Zhuang, X.; Chu, W. Tea polyphenols as an antivirulence compound Disrupt Quorum-Sensing Regulated Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* 2015, 5, 16158. [CrossRef]
125. Stenvang, M.; Dueholm, M.S.; Vad, B.S.; Seviour, T.; Zeng, G.; Geifman-Shochat, S.; Søndergaard, M.T.; Christiansen, G.; Meyer, R.L.; Kjelleberg, S.; et al. Epigallocatechin Gallate Remodels Overexpressed Functional Amyloids in *Pseudomonas aeruginosa* and Increases Biofilm Susceptibility to Antibiotic Treatment. *J. Biol. Chem.* 2016, 291, 26540–26553. [CrossRef]
126. Stapleton, P.D.; Shah, S.; Ehlert, K.; Hara, Y.; Taylor, P.W. The beta-lactam-resistance modifier (–)-epicatechin gallate alters the architecture of the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 2007, 153, 2093–2103. [CrossRef]
127. Hachimura, S.; Totsuka, M.; Hosono, A. Immunomodulation by food: Impact on gut immunity and immune cell function. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2018, 82, 584–599. [CrossRef]
128. Vitetta, L.; Vitetta, G.; Hall, S. Immunological Tolerance and Function: Associations Between Intestinal Bacteria, Probiotics, Prebiotics, and Phages. *Front. Immunol.* 2018, 9, 2240. [CrossRef]
129. Stan, M.S.; Voicu, S.N.; Caruntu, S.; Nica, I.C.; Olah, N.K.; Burtescu, R.; Balta, C.; Rosu, M.; Herman, H.; Hermenean, A.; et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of a *Thuja occidentalis* Mother Tincture for the Treatment of Ulcerative Colitis. *Antioxidants* 2019, 8, 416. [CrossRef]
130. Mileo, A.M.; Nistic , P.; Miccadei, S. Polyphenols: Immunomodulatory and Therapeutic Implication in Colorectal Cancer. *Front. Immunol.* 2019, 10, 729. [CrossRef]
131. Yamakoshi, J.; Tokutake, S.; Kikuchi, M.; Kubota, Y.; Konishi, H.; Mitsuoka, T. Effect of Proanthocyanidin-Rich Extract from Grape Seeds on Human Fecal Flora and Fecal Odor. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2001, 13, 25–31.

132. Larrosa, M.; Luceri, C.; Vivoli, E.; Pagliuca, C.; Lodovici, M.; Moneti, G.; Dolaro, P. Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, 53, 1044–1054. [CrossRef]
133. Tzounis, X.; Rodriguez-Mateos, A.; Vulevic, J.; Gibson, G.R.; Kwik-Urbe, C.; Spencer, J.P. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011, 93, 62–72. [CrossRef]
134. Moreno-Indias, I.; Sánchez-Alcoholado, L.; Pérez-Martínez, P.; Andrés-Lacueva, C.; Cardona, F.; Tinahones, F.; Queipo-Ortuño, M.I. Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food Funct.* 2016, 7, 1775–1787. [CrossRef]
135. Rowland, I.; Gibson, G.; Heinken, A.; Scott, K.; Swann, J.; Thiele, I.; Tuohy, K. Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* 2018, 57, 1–24. [CrossRef] [PubMed]
136. Braune, A.; Blaut, M. Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes* 2016, 7, 216–234. [CrossRef]
137. Corrêa, T.A.F.; Rogero, M.M.; Hassimotto, N.M.A.; Lajolo, F.M. The Two-Way Polyphenols-Microbiota Interactions and Their Effects on Obesity and Related Metabolic Diseases. *Front. Nutr.* 2019, 6, 188. [CrossRef]
138. Cote, A.T.; Harris, K.C.; Panagiotopoulos, C.; Sandor, G.G.; Devlin, A.M. Childhood obesity and cardiovascular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013, 62, 1309–1319. [CrossRef]
139. Levy, E.; Saenger, A.K.; Steffes, M.W.; Delvin, E. Pediatric Obesity and Cardiometabolic Disorders: Risk Factors and Biomarkers. *Ejifcc* 2017, 28, 6–24. [PubMed]
140. Nehus, E.; Mitsnefes, M. Childhood Obesity and the Metabolic Syndrome. *Pediatr. Clin. N. Am.* 2019, 66, 31–43. [CrossRef]

141. Vona, R.; Gambardella, L.; Cittadini, C.; Straface, E.; Pietraforte, D. Biomarkers of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome and Associated Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019, 2019, 8267234. [CrossRef] [PubMed]
142. Reinehr, T.; Roth, C.L. Inflammation Markers in Type 2 Diabetes and the Metabolic Syndrome in the Pediatric Population. *Curr. Diab. Rep.* 2018, 18, 131. [CrossRef]
143. Rani, V.; Deep, G.; Singh, R.K.; Palle, K.; Yadav, U.C.S. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* 2016, 148, 183–193. [CrossRef] [PubMed]
144. McKeown, N.M.; Meigs, J.B.; Liu, S.; Saltzman, E.; Wilson, P.W.; Jacques, P.F. Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. *Diabet. Care* 2004, 27, 538–546. [CrossRef] [PubMed]
145. Spahis, S.; Alvarez, F.; Ahmed, N.; Dubois, J.; Jalbout, R.; Paganelli, M.; Grzywacz, K.; Delvin, E.; Peretti, N.; Levy, E. Non-alcoholic fatty liver disease severity and metabolic complications in obese children: Impact of omega-3 fatty acids. *J. Nutr. Biochem.* 2018, 58, 28–36. [CrossRef]
146. Sabaté, J.; Wien, M. A perspective on vegetarian dietary patterns and risk of metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* 2015, 113 (Suppl. S2), S136–S143. [CrossRef] [PubMed]
147. Esmailzadeh, A.; Mirmiran, P.; Azizi, F. Whole-grain consumption and the metabolic syndrome: A favorable association in Tehranian adults. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2005, 59, 353–362. [CrossRef]
148. Mallappa, R.H.; Rokana, N.; Duary, R.K.; Panwar, H.; Batish, V.K.; Grover, S. Management of metabolic syndrome through probiotic and prebiotic interventions. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 2012, 16, 20–27.
149. Joseph, S.V.; Edirisinghe, I.; Burton-Freeman, B.M. Fruit Polyphenols: A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2016, 56, 419–444. [CrossRef]

150. Gourineni, V.; Shay, N.F.; Chung, S.; Sandhu, A.K.; Gu, L. Muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) and wine phytochemicals prevented obesity-associated metabolic complications in C57BL/6J mice. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 7674–7681. [CrossRef]
151. Makino-Wakagi, Y.; Yoshimura, Y.; Uzawa, Y.; Zaima, N.; Moriyama, T.; Kawamura, Y. Ellagic acid in pomegranate suppresses resistin secretion by a novel regulatory mechanism involving the degradation of intracellular resistin protein in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, 417, 880–885. [CrossRef]
152. Lei, F.; Zhang, X.N.; Wang, W.; Xing, D.M.; Xie, W.D.; Su, H.; Du, L.J. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *Int. J. Obes.* 2007, 31, 1023–1029. [CrossRef]
153. Monika, P.; Geetha, A. The modulating effect of *Persea americana* fruit extract on the level of expression of fatty acid synthase complex, lipoprotein lipase, fibroblast growth factor-21 and leptin—A biochemical study in rats subjected to experimental hyperlipidemia and obesity. *Phytomedicine* 2015, 22, 939–945. [CrossRef] [PubMed]
154. Kang, I.; Espín, J.C.; Carr, T.P.; Tomás-Barberán, F.A.; Chung, S. Raspberry seed flour attenuates high-sucrose diet-mediated hepatic stress and adipose tissue inflammation. *J. Nutr. Biochem.* 2016, 32, 64–72. [CrossRef] [PubMed]
155. Upadhyay, S.; Dixit, M. Role of Polyphenols and Other Phytochemicals on Molecular Signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 2015, 504253. [CrossRef] [PubMed]
156. Gothai, S.; Ganesan, P.; Park, S.Y.; Fakurazi, S.; Choi, D.K.; Arulselvan, P. Natural Phyto-Bioactive Compounds for the Treatment of Type 2 Diabetes: Inflammation as a Target. *Nutrients* 2016, 8, 461. [CrossRef] [PubMed]
157. Wang, H.; Guo, X.; Hu, X.; Li, T.; Fu, X.; Liu, R.H. Comparison of phytochemical profiles, antioxidant and cellular antioxidant activities of different varieties of blueberry (*Vaccinium* spp.). *Food Chem.* 2017, 217, 773–781. [CrossRef]

158. Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism. *J. Phys. Chem.* 2004, 108, 4916–4922. [CrossRef]
159. Oteiza, P.I.; Erlejtman, A.G.; Verstraeten, S.V.; Keen, C.L.; Fraga, C.G. Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clin. Dev. Immunol.* 2005, 12, 19–25. [CrossRef]
160. Perron, N.R.; Brumaghim, J.L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.* 2009, 53, 75–100. [CrossRef]
161. Spahis, S.; Borys, J.M.; Levy, E. Metabolic Syndrome as a Multifaceted Risk Factor for Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* 2017, 26, 445–461. [CrossRef]
162. Kensler, T.W.; Wakabayashi, N.; Biswal, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007, 47, 89–116. [CrossRef]
163. Kansanen, E.; Kuosmanen, S.M.; Leinonen, H.; Levonen, A.L. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 2013, 1, 45–49. [CrossRef] [PubMed]
164. Köhle, C.; Bock, K.W. Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochem. Pharmacol.* 2006, 72, 795–805. [CrossRef] [PubMed]
165. Zhang, S.; Qin, C.; Safe, S.H. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: Effects of structure and cell context. *Environ. Health Perspect.* 2003, 111, 1877–1882. [CrossRef] [PubMed]
166. Chuang, C.C.; McIntosh, M.K. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annu. Rev. Nutr.* 2011, 31, 155–176. [CrossRef]

167. Diotallevi, C.; Fava, F.; Gobbetti, M.; Tuohy, K. Healthy dietary patterns to reduce obesity-related metabolic disease: Polyphenol: Microbiome interactions unifying health effects across geography. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2020, 23, 437–444. [CrossRef]
168. Sanchez-Marzo, N.; Perez-Sanchez, A.; Barrajon-Catalan, E.; Castillo, J.; Herranz-Lopez, M.; Micol, V. Rosemary Diterpenes and Flavanone Aglycones Provide Improved Genoprotection against UV-Induced DNA Damage in a Human Skin Cell Model. *Antioxidants* 2020, 9, 255. [CrossRef]
169. Matsuno, Y.; Atsumi, Y.; Alauddin, M.; Rana, M.M.; Fujimori, H.; Hyodo, M.; Shimizu, A.; Ikuta, T.; Tani, H.; Torigoe, H.; et al. Resveratrol and its Related Polyphenols Contribute to the Maintenance of Genome Stability. *Sci. Rep.* 2020, 10, 5388. [CrossRef]
170. Huarte, E.; Cid, C.; Azqueta, A.; de Pena, M.P. DNA damage and DNA protection from digested raw and griddled green pepper (poly)phenols in human colorectal adenocarcinoma cells (HT-29). *Eur. J. Nutr.* 2020. [CrossRef]
171. Groh, I.A.M.; Bakuradze, T.; Pahlke, G.; Richling, E.; Marko, D. Consumption of anthocyanin-rich beverages affects Nrf2 and Nrf2-dependent gene transcription in peripheral lymphocytes and DNA integrity of healthy volunteers. *BMC Chem.* 2020, 14, 39. [CrossRef]
172. Abib, R.T.; Quincozes-Santos, A.; Zanotto, C.; Zeidán-Chuliá, F.; Lunardi, P.S.; Gonçalves, C.A.; Gottfried, C. Genoprotective effects of the green tea-derived polyphenol/epicatechin gallate in C6 astroglial cells. *J. Med. Food* 2010, 13, 1111–1115. [CrossRef]
173. Quincozes-Santos, A.; Andreatza, A.C.; Nardin, P.; Funchal, C.; Gonçalves, C.A.; Gottfried, C. Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. *Neurotoxicology* 2007, 28, 886–891. [CrossRef]
174. Han, K.C.; Wong, W.C.; Benzie, I.F. Genoprotective effects of green tea (*Camellia sinensis*) in human subjects: Results of a controlled supplementation trial. *Br. J. Nutr.* 2011, 105, 171–179. [CrossRef]
175. Morgan, M.J.; Liu, Z.G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* 2011, 21, 103–115. [CrossRef]

176. Blaser, H.; Dostert, C.; Mak, T.W.; Brenner, D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends Cell. Biol.* 2016, 26, 249–261. [CrossRef] [PubMed]
177. Kim, Y.S.; Young, M.R.; Bobe, G.; Colburn, N.H.; Milner, J.A. Bioactive food components, inflammatory targets, and cancer prevention. *Cancer Prev. Res.* 2009, 2, 200–208. [CrossRef] [PubMed]
178. Yu, Z.; Tang, Y.; Hu, D.; Li, J. Inhibitory effect of genistein on mouse colon cancer MC-26 cells involved TGF-beta1/Smad pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 333, 827–832. [CrossRef] [PubMed]
179. Nguyen, K.A.; Cao, Y.; Chen, J.R.; Townsend, C.M., Jr.; Ko, T.C. Dietary fiber enhances a tumor suppressor signaling pathway in the gut. *Ann. Surg.* 2006, 243, 619–625. [CrossRef]
180. Denis, M.C.; Furtos, A.; Dudonne, S.; Montoudis, A.; Garofalo, C.; Desjardins, Y.; Delvin, E.; Levy, E. Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. *PLoS ONE* 2013, 8, e53725. [CrossRef]
181. Yeganeh, P.R.; Leahy, J.; Spahis, S.; Patey, N.; Desjardins, Y.; Roy, D.; Delvin, E.; Garofalo, C.; Leduc-Gaudet, J.P.; St-Pierre, D.; et al. Apple peel polyphenols reduce mitochondrial dysfunction in mice with DSS-induced ulcerative colitis. *J. Nutr. Biochem.* 2018, 57, 56–66. [CrossRef]
182. Denis, M.C.; Roy, D.; Yeganeh, P.R.; Desjardins, Y.; Varin, T.; Haddad, N.; Amre, D.; Sane, A.T.; Garofalo, C.; Furtos, A.; et al. Apple peel polyphenols: A key player in the prevention and treatment of experimental inflammatory bowel disease. *Clin. Sci.* 2016, 130, 2217–2237. [CrossRef]
183. Cheng, Z.; Zheng, L.; Almeida, F.A. Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: Nutritional factors and beyond. *J. Nutr. Biochem.* 2018, 54, 1–10. [CrossRef]
184. Lim, W.-J.; Kim, K.H.; Kim, J.-Y.; Jeong, S.; Kim, N. Identification of DNA-Methylated CpG Islands Associated With Gene Silencing in the Adult Body Tissues of the Ogye Chicken Using RNA-Seq and Reduced Representation Bisulfite Sequencing. *Front. Genet.* 2019, 10, 346. [CrossRef]

185. Bannister, A.J.; Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011, 21, 381–395. [CrossRef] [PubMed]
186. Moutinho, C.; Esteller, M. Chapter Seven—MicroRNAs and Epigenetics. In *Advances in Cancer Research*; Croce, C.M., Fisher, P.B., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017; Volume 135, pp. 189–220.
187. Bruce, K.D.; Cagampang, F.R. Epigenetic priming of the metabolic syndrome. *Toxicol. Mech. Methods* 2011, 21, 353–361. [CrossRef] [PubMed]
188. Fan, R.; You, M.; Toney, A.M.; Kim, J.; Giraud, D.; Xian, Y.; Ye, F.; Gu, L.; Ramer-Tait, A.E.; Chung, S. Red Raspberry Polyphenols Attenuate High-Fat Diet-Driven Activation of NLRP3 Inflammasome and its Paracrine Suppression of Adipogenesis via Histone Modifications. *Mol. Nutr. Food Res.* 2019, 64, e1900995. [CrossRef] [PubMed]
189. Nettore, I.C.; Rocca, C.; Mancino, G.; Albano, L.; Amelio, D.; Grande, F.; Puoci, F.; Pasqua, T.; Desiderio, S.; Mazza, R.; et al. Quercetin and its derivative Q2 modulate chromatin dynamics in adipogenesis and Q2 prevents obesity and metabolic disorders in rats. *J. Nutr. Biochem.* 2019, 69, 151–162. [CrossRef] [PubMed]
190. Boqué, N.; de la Iglesia, R.; de la Garza, A.L.; Milagro, F.I.; Olivares, M.; Bañuelos, O.; Soria, A.C.; Rodríguez-Sánchez, S.; Martínez, J.A.; Campión, J. Prevention of diet-induced obesity by apple polyphenols in Wistar rats through regulation of adipocyte gene expression and DNA methylation patterns. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, 57, 1473–1478. [CrossRef] [PubMed]
191. Crescenti, A.; Solà, R.; Valls, R.M.; Caimari, A.; Del Bas, J.M.; Anguera, A.; Anglés, N.; Arola, L. Cocoa Consumption Alters the Global DNA Methylation of Peripheral Leukocytes in Humans with Cardiovascular Disease Risk Factors: A Randomized Controlled Trial. *PLoS ONE* 2013, 8, e65744. [CrossRef]
192. Han, S.; Uludag, M.O.; Usanmaz, S.E.; Ayaloglu-Butun, F.; Akcali, K.C.; Demirel-Yilmaz, E. Resveratrol affects histone 3 lysine 27 methylation of vessels and blood biomarkers in DOCA salt-induced hypertension. *Mol. Biol. Rep.* 2015, 42, 35–42. [CrossRef]
193. Boesch-Saadatmandi, C.; Loboda, A.; Wagner, A.E.; Stachurska, A.; Jozkowicz, A.; Dulak, J.; Döring, F.; Wolfram, S.; Rimbach, G. Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and

quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: Role of miR-155. *J. Nutr. Biochem.* 2011, 22, 293–299. [CrossRef]

194. Tili, E.; Michaille, J.J.; Adair, B.; Alder, H.; Limagne, E.; Taccioli, C.; Ferracin, M.; Delmas, D.; Latruffe, N.; Croce, C.M. Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a microRNA targeting JunB and JunD. *Carcinogenesis* 2010, 31, 1561–1566. [CrossRef] [PubMed]

195. Rasheed, Z.; Rasheed, N.; Al-Shobaili, H.A. Epigallocatechin-3-O-gallate up-regulates microRNA-199a-3p expression by down-regulating the expression of cyclooxygenase-2 in stimulated human osteoarthritis chondrocytes. *J. Cell. Mol. Med.* 2016, 20, 2241–2248. [CrossRef]

196. Carpi, S.; Scoditti, E.; Massaro, M.; Polini, B.; Manera, C.; Digiaco, M.; Esposito Salsano, J.; Poli, G.; Tuccinardi, T.; Doccini, S.; et al. The Extra-Virgin Olive Oil Polyphenols Oleocanthal and Oleacein Counteract Inflammation-Related Gene and miRNA Expression in Adipocytes by Attenuating NF- κ B Activation. *Nutrients* 2019, 11, 2855. [CrossRef] [PubMed]

197. Scoditti, E.; Carpi, S.; Massaro, M.; Pellegrino, M.; Polini, B.; Carluccio, M.A.; Wabitsch, M.; Verri, T.; Nieri, P.; De Caterina, R. Hydroxytyrosol Modulates Adipocyte Gene and miRNA Expression Under Inflammatory Condition. *Nutrients* 2019, 11, 2493. [CrossRef] [PubMed]

198. Zaccaria, V.; Curti, V.; Di Lorenzo, A.; Baldi, A.; Maccario, C.; Sommatì, S.; Mocchi, R.; Daglia, M. Effect of Green and Brown Propolis Extracts on the Expression Levels of microRNAs, mRNAs and Proteins, Related to Oxidative Stress and Inflammation. *Nutrients* 2017, 9, 1090. [CrossRef]

199. Howell, J.C.; Chun, E.; Farrell, A.N.; Hur, E.Y.; Caroti, C.M.; Iuvone, P.M.; Haque, R. Global microRNA expression profiling: Curcumin (diferuloylmethane) alters oxidative stress-responsive microRNAs in human ARPE-19 cells. *Mol. Vis.* 2013, 19, 544–560.

200. Noratto, G.D.; Angel-Morales, G.; Talcott, S.T.; Mertens-Talcott, S.U. Polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect human umbilical vascular Endothelial cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 7999–8012. [CrossRef]

201. Song, J.; Jun, M.; Ahn, M.R.; Kim, O.Y. Involvement of miR-Let7A in inflammatory response and cell survival/apoptosis regulated by resveratrol in THP-1 macrophage. *Nutr. Res. Pract.* 2016, 10, 377–384. [CrossRef]
202. Boesch-Saadatmandi, C.; Wagner, A.E.; Wolffram, S.; Rimbach, G. Effect of quercetin on inflammatory gene expression in mice liver in vivo—Role of redox factor 1, miRNA-122 and miRNA-125b. *Pharmacol. Res.* 2012, 65, 523–530. [CrossRef]
203. Mohamed, H.E.; Abo-ELmatty, D.M.; Salah, S.M.; Sakr, A.T. Ameliorative effect of grape seed extract on metabolic disorders caused by high fat diet induced obesity in rats by reversing the increase in hepatic miR-33a and miR-122. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2016, 10, 699–708.
204. Zhao, X.J.; Yu, H.W.; Yang, Y.Z.; Wu, W.Y.; Chen, T.Y.; Jia, K.K.; Kang, L.L.; Jiao, R.Q.; Kong, L.D. Polydatin prevents fructose-induced liver inflammation and lipid deposition through increasing miR-200a to regulate Keap1/Nrf2 pathway. *Redox Biol.* 2018, 18, 124–137. [CrossRef] [PubMed]
205. Otton, R.; Bolin, A.P.; Ferreira, L.T.; Marinovic, M.P.; Rocha, A.L.S.; Mori, M.A. Polyphenol-rich green tea extract improves adipose tissue metabolism by down-regulating miR-335 expression and mitigating insulin resistance and inflammation. *J. Nutr. Biochem.* 2018, 57, 170–179. [CrossRef] [PubMed]
206. Gracia, A.; Miranda, J.; Fernández-Quintela, A.; Eseberri, I.; Garcia-Lacarte, M.; Milagro, F.I.; Martínez, J.A.; Aguirre, L.; Portillo, M.P. Involvement of miR-539-5p in the inhibition of de novo lipogenesis induced by resveratrol in white adipose tissue. *Food Funct.* 2016, 7, 1680–1688. [CrossRef] [PubMed]
207. Tomé-Carneiro, J.; Larrosa, M.; Yáñez-Gascón, M.J.; Dávalos, A.; Gil-Zamorano, J.; González, M.; García-Almagro, F.J.; Ruiz Ros, J.A.; Tomás-Barberán, F.A.; Espín, J.C.; et al. One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. *Pharmacol. Res.* 2013, 72, 69–82. [CrossRef]

208. Glässer, G.; Graefe, E.U.; Struck, F.; Veit, M.; Gebhardt, R. Comparison of antioxidative capacities and inhibitory effects on cholesterol biosynthesis of quercetin and potential metabolites. *Phytomedicine* 2002, 9, 33–40. [CrossRef]
209. Merfort, I.; Heilmann, J.; Weiss, M.; Pietta, P.; Gardana, C. Radical scavenger activity of three flavonoid metabolites studied by inhibition of chemiluminescence in human PMNs. *Planta Med.* 1996, 62, 289–292. [CrossRef]
210. Tang, Y.; Nakashima, S.; Saiki, S.; Myoi, Y.; Abe, N.; Kuwazuru, S.; Zhu, B.; Ashida, H.; Murata, Y.; Nakamura, Y. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid is a predominant biologically-active catabolite of quercetin glycosides. *Food Res. Int.* 2016, 89, 716–723. [CrossRef]
211. Liu, Y.; Kurita, A.; Nakashima, S.; Zhu, B.; Munemasa, S.; Nakamura, T.; Murata, Y.; Nakamura, Y. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid is a potential aldehyde dehydrogenase inducer in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2017, 81, 1978–1983. [CrossRef]
212. Monagas, M.; Khan, N.; Andres-Lacueva, C.; Urpi-Sarda, M.; Vazquez-Agell, M.; Lamuela-Raventos, R.M.; Estruch, R. Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Br. J. Nutr.* 2009, 102, 201–206. [CrossRef]
213. Rechner, A.R.; Kroner, C. Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thromb. Res.* 2005, 116, 327–334. [CrossRef] [PubMed]
214. Álvarez-Cilleros, D.; Ramos, S.; Goya, L.; Martín, M.Á. Colonic metabolites from flavanols stimulate nitric oxide production in human endothelial cells and protect against oxidative stress-induced toxicity and endothelial dysfunction. *Food Chem. Toxicol.* 2018, 115, 88–97. [CrossRef] [PubMed]
215. Fernandez-Millan, E.; Ramos, S.; Alvarez, C.; Bravo, L.; Goya, L.; Martin, M.A. Microbial phenolic metabolites improve glucose-stimulated insulin secretion and protect pancreatic beta cells against tert-butyl hydroperoxide-induced toxicity via ERKs and PKC pathways. *Food Chem. Toxicol.* 2014, 66, 245–253. [CrossRef] [PubMed]

216. Carrasco-Pozo, C.; Gotteland, M.; Castillo, R.L.; Chen, C. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, a microbiotaderived metabolite of quercetin, protects against pancreatic beta-cells dysfunction induced by high cholesterol. *Exp. Cell Res.* 2015, 334, 270–282. [CrossRef] [PubMed]
217. Rechner, A.R.; Smith, M.A.; Kuhnle, G.; Gibson, G.R.; Debnam, E.S.; Srai, S.K.S.; Moore, K.P.; Rice-Evans, C.A. Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic. Biol. Med.* 2004, 36, 212–225. [CrossRef] [PubMed]
218. Winter, J.; Moore, L.H.; Dowell, V.R., Jr.; Bokkenheuser, V.D. C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989, 55, 1203–1208. [CrossRef]
219. Schneider, H.; Simmering, R.; Hartmann, L.; Pforte, H.; Blaut, M. Degradation of quercetin-3-glucoside in gnotobiotic rats associated with human intestinal bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 89, 1027–1037. [CrossRef]
220. Feng, X.; Li, Y.; Brobbey Oppong, M.; Qiu, F. Insights into the intestinal bacterial metabolism of flavonoids and the bioactivities of their microbe-derived ring cleavage metabolites. *Drug Metab. Rev.* 2018, 50, 343–356. [CrossRef]
221. Hanske, L.; Loh, G.; Sczesny, S.; Blaut, M.; Braune, A. The Bioavailability of Apigenin-7-Glucoside Is Influenced by Human Intestinal Microbiota in Rats. *J. Nutr.* 2009, 139, 1095–1102. [CrossRef]
222. Labib, S.; Erb, A.; Kraus, M.; Wickert, T.; Richling, E. The pig caecum model: A suitable tool to study the intestinal metabolism of flavonoids. *Mol. Nutr. Food Res.* 2004, 48, 326–332. [CrossRef]
223. Zou, W.; Luo, Y.; Liu, M.; Chen, S.; Wang, S.; Nie, Y.; Cheng, G.; Su, W.; Zhang, K. Human intestinal microbial metabolism of naringin. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2015, 40, 363–367. [CrossRef]
224. Yuan, J.-P.; Wang, J.-H.; Liu, X. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora—Implications for health. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 765–781. [CrossRef] [PubMed]

225. Sekikawa, A.; Ihara, M.; Lopez, O.; Kakuta, C.; Lopresti, B.; Higashiyama, A.; Aizenstein, H.; Chang, Y.F.; Mathis, C.; Miyamoto, Y.; et al. Effect of S-equol and Soy Isoflavones on Heart and Brain. *Curr. Cardiol. Rev.* 2019, 15, 114–135. [CrossRef] [PubMed]
226. Choi, E.J.; Kim, G.H. The antioxidant activity of daidzein metabolites, O-desmethylangolensin and equol, in HepG2 cells. *Mol. Med. Rep.* 2014, 9, 328–332. [CrossRef] [PubMed]
227. Schneider, H.; Blaut, M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. *Arch. Microbiol.* 2000, 173, 71–75. [CrossRef] [PubMed]
228. Tzounis, X.; Vulevic, J.; Kuhnle, G.G.C.; George, T.; Leonczak, J.; Gibson, G.R.; Kwik-Urbe, C.; Spencer, J.P.E. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *Br. J. Nutr.* 2008, 99, 782–792. [CrossRef] [PubMed]
229. Mena, P.; Bresciani, L.; Brindani, N.; Ludwig, I.; Pereira Caro, G.; Angelino, D.; Llorach, R.; Calani, L.; Brighenti, F.; Clifford, M.; et al. Phenyl- γ -valerolactones and phenylvaleric acids, the main colonic metabolites of flavan-3-ols: Synthesis, analysis, bioavailability, and bioactivity. *Nat. Prod. Rep.* 2019, 36, 714–752. [CrossRef]
230. Ottaviani, J.I.; Borges, G.; Momma, T.Y.; Spencer, J.P.E.; Keen, C.L.; Crozier, A.; Schroeter, H. The metabolome of [2-14C](–)-epicatechin in humans: Implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. *Sci. Rep.* 2016, 6, 29034. [CrossRef]
231. Mele, L.; Carobbio, S.; Brindani, N.; Curti, C.; Rodriguez-Cuenca, S.; Bidault, G.; Mena, P.; Zanotti, I.; Vacca, M.; Vidal-Puig, A.; et al. Phenyl- γ -valerolactones, flavan-3-ol colonic metabolites, protect brown adipocytes from oxidative stress without affecting their differentiation or function. *Mol. Nutr. Food Res.* 2017, 61, 1700074. [CrossRef]
232. Lambert, J.D.; Rice, J.E.; Hong, J.; Hou, Z.; Yang, C.S. Synthesis and biological activity of the tea catechin metabolites, M4 and M6 and their methoxy-derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 873–876. [CrossRef]
233. Uhlenhut, K.; Högger, P. Facilitated cellular uptake and suppression of inducible nitric oxide synthase by a metabolite of maritime pine bark extract (Pycnogenol). *Free Radic. Biol. Med.* 2012, 53, 305–313. [CrossRef]

234. Lee, C.C.; Kim, J.H.; Kim, J.S.; Oh, Y.S.; Han, S.M.; Park, J.H.Y.; Lee, K.W.; Lee, C.Y. 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl-gamma-valerolactone), a Major Microbial Metabolite of Proanthocyanidin, Attenuates THP-1 Monocyte-Endothelial Adhesion. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1363. [CrossRef] [PubMed]
235. Takagaki, A.; Nanjo, F. Effects of Metabolites Produced from (-)-Epigallocatechin Gallate by Rat Intestinal Bacteria on Angiotensin I-Converting Enzyme Activity and Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 8262–8266. [CrossRef] [PubMed]
236. Van Rymenant, E.; Grootaert, C.; Beerens, K.; Needs, P.W.; Kroon, P.A.; Kerimi, A.; Williamson, G.; Garcia-Villalba, R.; Gonzalez-Sarrias, A.; Tomas-Barberan, F.; et al. Vasorelaxant activity of twenty-one physiologically relevant (poly)phenolic metabolites on isolated mouse arteries. *Food Funct.* 2017, 8, 4331–4335. [CrossRef] [PubMed]
237. Miladinović, B.; Kostić, M.; Šavikin, K.; Đorđević, B.; Mihajilov-Krstev, T.; Živanović, S.; Kitić, D. Chemical Profile and Antioxidative and Antimicrobial Activity of Juices and Extracts of 4 Black Currants Varieties (*Ribes nigrum* L.). *J. Food Sci.* 2014, 79, C301–C309. [CrossRef]
238. Aura, A.M.; Martin-Lopez, P.; O'Leary, K.A.; Williamson, G.; Oksman-Caldentey, K.M.; Poutanen, K.; Santos-Buelga, C. *In vitro* metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur. J. Nutr.* 2005, 44, 133–142. [CrossRef]
239. Vitaglione, P.; Donnarumma, G.; Napolitano, A.; Galvano, F.; Gallo, A.; Scalfi, L.; Fogliano, V. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J. Nutr.* 2007, 137, 2043–2048. [CrossRef] [PubMed]
240. Williamson, G.; Clifford, M.N. Colonic metabolites of berry polyphenols: The missing link to biological activity? *Br. J. Nutr.* 2010, 104 (Suppl. S3), S48–S66. [CrossRef]
241. Gowd, V.; Bao, T.; Wang, L.; Huang, Y.; Chen, S.; Zheng, X.; Cui, S.; Chen, W. Antioxidant and antidiabetic activity of blackberry after gastrointestinal digestion and human gut microbiota fermentation. *Food Chem.* 2018, 269, 618–627. [CrossRef]

242. Ho, G.T.; Wangenstein, H.; Barsett, H. Elderberry and Elderflower Extracts, Phenolic Compounds, and Metabolites and Their Effect on Complement, RAW 264.7 Macrophages and Dendritic Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 584. [CrossRef]
243. Andreasen, M.F.; Kroon, P.A.; Williamson, G.; Garcia-Conesa, M.T. Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5679–5684. [CrossRef]
244. Couteau, D.; McCartney, A.L.; Gibson, G.R.; Williamson, G.; Faulds, C.B. Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *J. Appl. Microbiol.* 2001, 90, 873–881. [CrossRef] [PubMed]
245. Cerdá, B.; Periago, P.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. Identification of Urolithin A as a Metabolite Produced by Human Colon Microflora from Ellagic Acid and Related Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 5571–5576. [CrossRef] [PubMed]
246. González-Barrio, R.; Borges, G.; Mullen, W.; Crozier, A. Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 3933–3939. [CrossRef]
247. Iino, T.; Tashima, K.; Umeda, M.; Ogawa, Y.; Takeeda, M.; Takata, K.; Takeuchi, K. Effect of ellagic acid on gastric damage induced in ischemic rat stomachs following ammonia or reperfusion. *Life Sci.* 2002, 70, 1139–1150. [CrossRef]
248. Yu, Y.M.; Wang, Z.H.; Liu, C.H.; Chen, C.S. Ellagic acid inhibits IL-1 β -induced cell adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cells. *Br. J. Nutr.* 2007, 97, 692–698. [CrossRef]
249. Chang, W.C.; Yu, Y.M.; Chiang, S.Y.; Tseng, C.Y. Ellagic acid suppresses oxidised low-density lipoprotein-induced aortic smooth muscle cell proliferation: Studies on the activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and proliferating cell nuclear antigen expression. *Br. J. Nutr.* 2008, 99, 709–714. [CrossRef]

250. Ishimoto, H.; Tai, A.; Yoshimura, M.; Amakura, Y.; Yoshida, T.; Hatano, T.; Ito, H. Antioxidative properties of functional polyphenols and their metabolites assessed by an ORAC assay. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012, 76, 395–399. [CrossRef]
251. Bialonska, D.; Kasimsetty, S.G.; Khan, S.I.; Ferreira, D. Urolithins, intestinal microbial metabolites of Pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 10181–10186. [CrossRef]
252. Verzelloni, E.; Pellacani, C.; Tagliazucchi, D.; Tagliaferri, S.; Calani, L.; Costa, L.G.; Brighenti, F.; Borges, G.; Crozier, A.; Conte, A.; et al. Antiglycative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011, 55 (Suppl. S1), S35–S43. [CrossRef]
253. Komatsu, W.; Kishi, H.; Yagasaki, K.; Ohhira, S. Urolithin A attenuates pro-inflammatory mediator production by suppressing PI3-K/Akt/NF- κ B and JNK/AP-1 signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264 macrophages: Possible involvement of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Eur. J. Pharmacol.* 2018, 833, 411–424. [CrossRef]
254. Singh, R.; Chandrashekarappa, S.; Bodduluri, S.R.; Baby, B.V.; Hegde, B.; Kotla, N.G.; Hiwale, A.A.; Saiyed, T.; Patel, P.; Vijay-Kumar, M.; et al. Enhancement of the gut barrier integrity by a microbial metabolite through the Nrf2 pathway. *Nat. Commun.* 2019, 10, 89. [CrossRef] [PubMed]
255. Tang, L.; Mo, Y.; Li, Y.; Zhong, Y.; He, S.; Zhang, Y.; Tang, Y.; Fu, S.; Wang, X.; Chen, A. Urolithin A alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017, 486, 774–780. [CrossRef] [PubMed]
256. González-Sarrías, A.; Larrosa, M.; Tomás-Barberán, F.A.; Dolaro, P.; Espín, J.C. NF-kappaB-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts. *Br. J. Nutr.* 2010, 104, 503–512. [CrossRef] [PubMed]
257. Giménez-Bastida, J.A.; González-Sarrías, A.; Larrosa, M.; Tomás-Barberán, F.; Espín, J.C.; García-Conesa, M.T. Ellagitannin metabolites, urolithin A glucuronide and its aglycone urolithin A, ameliorate TNF- α -induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 2012, 56, 784–796. [CrossRef] [PubMed]

258. Corsini, E.; Dell'Agli, M.; Facchi, A.; De Fabiani, E.; Lucchi, L.; Boraso, M.S.; Marinovich, M.; Galli, C.L. Enterodiol and enterolactone modulate the immune response by acting on nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) signaling. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 6678–6684. [CrossRef] [PubMed]
259. Prasad, K. Antioxidant Activity of Secoisolariciresinol Diglucoside-derived Metabolites, Secoisolariciresinol, Enterodiol, and Enterolactone. *Int. J. Angiol.* 2000, 9, 220–225. [CrossRef] [PubMed]
260. Kitts, D.D.; Yuan, Y.V.; Wijewickreme, A.N.; Thompson, L.U. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Mol. Cell. Biochem.* 1999, 202, 91–100. [CrossRef]
261. Heinonen, S.; Nurmi, T.; Liukkonen, K.; Poutanen, K.; Wähälä, K.; Deyama, T.; Nishibe, S.; Adlercreutz, H. *In Vitro* Metabolism of Plant Lignans: New Precursors of Mammalian Lignans Enterolactone and Enterodiol. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3178–3186. [CrossRef]
262. Springer, M.; Moco, S. Resveratrol and Its Human Metabolites-Effects on Metabolic Health and Obesity. *Nutrients* 2019, 11, 143. [CrossRef]
263. Lu, D.L.; Ding, D.J.; Yan, W.J.; Li, R.R.; Dai, F.; Wang, Q.; Yu, S.S.; Li, Y.; Jin, X.L.; Zhou, B. Influence of glucuronidation and reduction modifications of resveratrol on its biological activities. *Chembiochem* 2013, 14, 1094–1104. [CrossRef]
264. Bode, L.M.; Bunzel, D.; Huch, M.; Cho, G.S.; Ruhland, D.; Bunzel, M.; Bub, A.; Franz, C.M.; Kulling, S.E. In vivo and *in vitro* metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013, 97, 295–309. [CrossRef] [PubMed]
265. Rodriguez-Mateos, A.; Heiss, C.; Borges, G.; Crozier, A. Berry (poly)phenols and cardiovascular health. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 3842–3851. [CrossRef] [PubMed]
266. Su, K.-Y.; Yu, C.Y.; Chen, Y.-P.; Hua, K.-F.; Chen, Y.-L.S. 3,4-Dihydroxytoluene, a metabolite of rutin, inhibits inflammatory responses in lipopolysaccharide-activated macrophages by reducing the activation of NF-κB signaling. *BMC Complement Altern. Med.* 2014, 14, 1–9. [CrossRef] [PubMed]

267. Ozdal, T.; Sela, D.A.; Xiao, J.; Boyacioglu, D.; Chen, F.; Capanoglu, E. The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. *Nutrients* 2016, 8, 78. [CrossRef] [PubMed]
268. Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, 81, 230S–242S. [CrossRef] [PubMed]
269. Rietjens, I.M.C.M.; Lousse, J.; Beekmann, K. The potential health effects of dietary phytoestrogens. *Br. J. Pharmacol.* 2017, 174, 1263–1280. [CrossRef]
270. Sánchez-Calvo, J.M.; Rodríguez-Iglesias, M.A.; Molinillo, J.M.G.; Macías, F.A. Soy isoflavones and their relationship with microflora: Beneficial effects on human health in equol producers. *Phytochem. Rev.* 2013, 12, 979–1000. [CrossRef]
271. Tousen, Y.; Uehara, M.; Abe, F.; Kimira, Y.; Ishimi, Y. Effects of short-term fructooligosaccharide intake on equol production in Japanese postmenopausal women consuming soy isoflavone supplements: A pilot study. *Nutr. J.* 2013, 12, 127. [CrossRef]
272. Setchell, K.D.; Brown, N.M.; Summer, S.; King, E.C.; Heubi, J.E.; Cole, S.; Guy, T.; Hokin, B. Dietary factors influence production of the soy isoflavone metabolite s(-)equol in healthy adults. *J. Nutr.* 2013, 143, 1950–1958. [CrossRef]
273. Usui, T.; Tochiya, M.; Sasaki, Y.; Muranaka, K.; Yamakage, H.; Himeno, A.; Shimatsu, A.; Inaguma, A.; Ueno, T.; Uchiyama, S.; et al. Effects of natural S-equol supplements on overweight or obesity and metabolic syndrome in the Japanese, based on sex and equol status. *Clin. Endocrinol.* 2013, 78, 365–372. [CrossRef]
274. Yoshikata, R.; Myint, K.Z.Y.; Ohta, H. Effects of Equol Supplement on Bone and Cardiovascular Parameters in Middle-Aged Japanese Women: A Prospective Observational Study. *J. Altern. Complement. Med.* 2018, 24, 701–708. [CrossRef] [PubMed]
275. Birru, R.L.; Ahuja, V.; Vishnu, A.; Evans, R.W.; Miyamoto, Y.; Miura, K.; Usui, T.; Sekikawa, A. The impact of equol-producing status in modifying the effect of soya isoflavones on risk factors

for CHD: A systematic review of randomised controlled trials. *J. Nutr. Sci.* 2016, 5, e30. [CrossRef] [PubMed]

276. Atkinson, C.; Frankenfeld, C.L.; Lampe, J.W. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: Exploring the relevance to human health. *Exp. Biol. Med.* 2005, 230, 155–170. [CrossRef] [PubMed]

277. Atkinson, C.; Newton, K.M.; Bowles, E.J.; Yong, M.; Lampe, J.W. Demographic, anthropometric, and lifestyle factors and dietary intakes in relation to daidzein-metabolizing phenotypes among premenopausal women in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008, 87, 679–687. [CrossRef]

278. Liu, Z.M.; Ho, S.C.; Chen, Y.M.; Liu, J.; Woo, J. Cardiovascular risks in relation to daidzein metabolizing phenotypes among Chinese postmenopausal women. *PLoS ONE* 2014, 9, e87861. [CrossRef]

279. Guo, K.; Zhang, B.; Chen, C.; Uchiyama, S.; Ueno, T.; Chen, Y.; Su, Y. Daidzein-metabolising phenotypes in relation to serum lipids and uric acid in adults in Guangzhou, China. *Br. J. Nutr.* 2010, 104, 118–124. [CrossRef]

280. Shi, L.; Ryan, H.H.; Jones, E.; Simas, T.A.M.; Lichtenstein, A.H.; Sun, Q.; Hayman, L.L. Urinary isoflavone concentrations are inversely associated with cardiometabolic risk markers in pregnant U.S. women. *J. Nutr.* 2014, 144, 344–351. [CrossRef]

281. Frankenfeld, C.L.; Atkinson, C.; Wähälä, K.; Lampe, J.W. Obesity prevalence in relation to gut microbial environments capable of producing equol or O-desmethylangolensin from the isoflavone daidzein. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2014, 68, 526–530. [CrossRef]

282. Pérez-Jiménez, J.; Fezeu, L.; Touvier, M.; Arnault, N.; Manach, C.; Hercberg, S.; Galan, P.; Scalbert, A. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011, 93, 1220–1228. [CrossRef]

283. Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 2013, 18, 1818–1892. [CrossRef]

284. Sansone, R.; Rodriguez-Mateos, A.; Heuel, J.; Falk, D.; Schuler, D.; Wagstaff, R.; Kuhnle, G.G.C.; Spencer, J.P.E.; Schroeter, H.; Merx, M.W.; et al. Cocoa flavanol intake improves endothelial function and Framingham Risk Score in healthy men and women: A randomised, controlled, double-masked trial: The Flaviola Health Study. *Br. J. Nutr.* 2015, 114, 1246–1255. [CrossRef] [PubMed]
285. Stote, K.S.; Clevidence, B.A.; Novotny, J.A.; Henderson, T.; Radecki, S.V.; Baer, D.J. Effect of cocoa and green tea on biomarkers of glucose regulation, oxidative stress, inflammation and hemostasis in obese adults at risk for insulin resistance. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2012, 66, 1153–1159. [CrossRef] [PubMed]
286. Castello, F.; Costabile, G.; Bresciani, L.; Tassotti, M.; Naviglio, D.; Luongo, D.; Ciciola, P.; Vitale, M.; Vetrani, C.; Galaverna, G.; et al. Bioavailability and pharmacokinetic profile of grape pomace phenolic compounds in humans. *Arch. Biochem. Biophys.* 2018, 646, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
287. Hansson, G.K.; Libby, P. The immune response in atherosclerosis: A double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 2006, 6, 508–519. [CrossRef] [PubMed]
288. Rodriguez-Mateos, A.; Feliciano, R.P.; Boeres, A.; Weber, T.; Dos Santos, C.N.; Ventura, M.R.; Heiss, C. Cranberry (poly)phenol metabolites correlate with improvements in vascular function: A double-blind, randomized, controlled, dose-response, crossover study. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016, 60, 2130–2140. [CrossRef]
289. Sasaki, G.Y.; Li, J.; Cichon, M.J.; Riedl, K.M.; Kopec, R.E.; Bruno, R.S. Green Tea Extract Treatment in Obese Mice with Nonalcoholic Steatohepatitis Restores the Hepatic Metabolome in Association with Limiting Endotoxemia-TLR4-NFκB-Mediated Inflammation. *Mol. Nutr. Food Res.* 2019, 63, e1900811. [CrossRef]
290. Panchal, S.K.; Ward, L.; Brown, L. Ellagic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *Eur. J. Nutr.* 2013, 52, 559–568. [CrossRef]
291. Rani, U.P.; Kesavan, R.; Ganugula, R.; Avaneesh, T.; Kumar, U.P.; Reddy, G.B.; Dixit, M. Ellagic acid inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and prevents atheroma

formation in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr. Biochem.* 2013, 24, 1830–1839. [CrossRef]

292. Tomás-Barberán, F.A.; García-Villalba, R.; González-Sarrías, A.; Selma, M.V.; Espín, J.C. Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: Consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 6535–6538. [CrossRef]

293. Larrosa, M.; González-Sarrías, A.; Yáñez-Gascón, M.J.; Selma, M.V.; Azorín-Ortuño, M.; Toti, S.; Tomás-Barberán, F.; Dolara, P.; Espín, J.C. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J. Nutr. Biochem.* 2010, 21, 717–725. [CrossRef]

294. Ishimoto, H.; Shibata, M.; Myojin, Y.; Ito, H.; Sugimoto, Y.; Tai, A.; Hatano, T. In vivo anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 5901–5904. [CrossRef] [PubMed]

295. Kawai, Y. Immunochemical detection of food-derived polyphenols in the aorta: Macrophages as a major target underlying the anti-atherosclerotic activity of polyphenols. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011, 75, 609–617. [CrossRef] [PubMed]

296. Selma, M.V.; González-Sarrías, A.; Salas-Salvadó, J.; Andrés-Lacueva, C.; Alasalvar, C.; Örem, A.; Tomás-Barberán, F.A.; Espín, J.C. The gut microbiota metabolism of pomegranate or walnut ellagitannins yields two urolithin-metabotypes that correlate with cardiometabolic risk biomarkers: Comparison between normoweight, overweight-obesity and metabolic syndrome. *Clin. Nutr.* 2018, 37, 897–905. [CrossRef]

297. Gutiérrez-Díaz, I.; Fernández-Navarro, T.; Salazar, N.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V.; López, P.; Suárez, A.; de Los Reyes-Gavilán, C.G.; Gueimonde, M.; González, S. Could Fecal Phenylacetic and Phenylpropionic Acids Be Used as Indicators of Health Status? *J. Agric. Food Chem.* 2018, 66, 10438–10446. [CrossRef] [PubMed]

298. Yang, J.; Guo, Y.; Henning, S.M.; Chan, B.; Long, J.; Zhong, J.; Acin-Perez, R.; Petcherski, A.; Shirihai, O.; Heber, D.; et al. Ellagic Acid and Its Microbial Metabolite Urolithin A Alleviate Diet-Induced Insulin Resistance in Mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 2020, 64, e2000091. [CrossRef]
299. Xia, B.; Shi, X.C.; Xie, B.C.; Zhu, M.Q.; Chen, Y.; Chu, X.Y.; Cai, G.H.; Liu, M.; Yang, S.Z.; Mitchell, G.A.; et al. Urolithin A exerts antiobesity effects through enhancing adipose tissue thermogenesis in mice. *PLoS Biol.* 2020, 18, e3000688. [CrossRef]
300. Adolphe, J.L.; Whiting, S.J.; Juurlink, B.H.; Thorpe, L.U.; Alcorn, J. Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Br. J. Nutr.* 2010, 103, 929–938. [CrossRef]
301. Imran, M.; Ahmad, N.; Anjum, F.M.; Khan, M.K.; Mushtaq, Z.; Nadeem, M.; Hussain, S. Potential protective properties of flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Nutr. J.* 2015, 14, 71. [CrossRef]
302. Zhang, W.; Wang, X.; Liu, Y.; Tian, H.; Flickinger, B.; Empie, M.W.; Sun, S.Z. Dietary flaxseed lignan extract lowers plasma cholesterol and glucose concentrations in hypercholesterolaemic subjects. *Br. J. Nutr.* 2008, 99, 1301–1309. [CrossRef]
303. Prasad, K. Secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed delays the development of type 2 diabetes in Zucker rat. *J. Lab. Clin. Med.* 2001, 138, 32–39. [CrossRef]
304. Kottke, T.E.; Ogowang, Z.; Smith, J.C. Reasons for not meeting coronary artery disease targets of care in ambulatory practice. *Perm. J.* 2010, 14, 12–16. [CrossRef] [PubMed]
305. Durazzo, A.; Lucarini, M.; Camilli, E.; Marconi, S.; Gabrielli, P.; Lisciani, S.; Gambelli, L.; Aguzzi, A.; Novellino, E.; Santini, A.; et al. Dietary Lignans: Definition, Description and Research Trends in Databases Development. *Molecules* 2018, 23, 3251. [CrossRef]
306. Corona, G.; Kreimes, A.; Barone, M.; Turroni, S.; Brigidi, P.; Keleszade, E.; Costabile, A. Impact of lignans in oilseed mix on gut microbiome composition and enterolignan production in younger healthy and premenopausal women: An *in vitro* pilot study. *Microb. Cell Fact.* 2020, 19, 82. [CrossRef] [PubMed]

307. Brito, A.F.; Zang, Y. A Review of Lignan Metabolism, Milk Enterolactone Concentration, and Antioxidant Status of Dairy Cows Fed Flaxseed. *Molecules* 2018, 24, 41. [CrossRef] [PubMed]
308. Rienks, J.; Barbaresko, J.; Nöthlings, U. Association of Polyphenol Biomarkers with Cardiovascular Disease and Mortality Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients* 2017, 9, 415. [CrossRef]
309. Sun, Q.; Wedick, N.M.; Pan, A.; Townsend, M.K.; Cassidy, A.; Franke, A.A.; Rimm, E.B.; Hu, F.B.; van Dam, R.M. Gut microbiota metabolites of dietary lignans and risk of type 2 diabetes: A prospective investigation in two cohorts of U.S. women. *Diabet. Care* 2014, 37, 1287–1295. [CrossRef]
310. Struja, T.; Richard, A.; Linseisen, J.; Eichholzer, M.; Rohrmann, S. The association between urinary phytoestrogen excretion and components of the metabolic syndrome in NHANES. *Eur. J. Nutr.* 2014, 53, 1371–1381. [CrossRef]
311. Peñalvo, J.L.; López-Romero, P. Urinary enterolignan concentrations are positively associated with serum HDL cholesterol and negatively associated with serum triglycerides in U.S. adults. *J. Nutr.* 2012, 142, 751–756. [CrossRef]
312. Baur, J.A.; Sinclair, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006, 5, 493–506. [CrossRef]
313. Alberdi, G.; Rodríguez, V.M.; Miranda, J.; Macarulla, M.T.; Churruga, I.; Portillo, M.P. Thermogenesis is involved in the body-fat lowering effects of resveratrol in rats. *Food Chem.* 2013, 141, 1530–1535. [CrossRef]
314. Szkudelski, T.; Szkudelska, K. Resveratrol and diabetes: From animal to human studies. *Biochim. Biophys. Acta* 2015, 1852, 1145–1154. [CrossRef] [PubMed]
315. Méndez-del Villar, M.; González-Ortiz, M.; Martínez-Abundis, E.; Pérez-Rubio, K.G.; Lizárraga-Valdez, R. Effect of resveratrol administration on metabolic syndrome, insulin sensitivity, and insulin secretion. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 2014, 12, 497–501. [CrossRef] [PubMed]

316. Timmers, S.; Konings, E.; Bilet, L.; Houtkooper, R.H.; van de Weijer, T.; Goossens, G.H.; Hoeks, J.; van der Krieken, S.; Ryu, D.; Kersten, S.; et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab.* 2011, 14, 612–622. [CrossRef] [PubMed]
317. Javkhedkar, A.A.; Quiroz, Y.; Rodriguez-Iturbe, B.; Vaziri, N.D.; Lokhandwala, M.F.; Banday, A.A. Resveratrol restored Nrf2 function, reduced renal inflammation, and mitigated hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2015, 308, R840–R846. [CrossRef]
318. Dolinsky, V.W.; Chakrabarti, S.; Pereira, T.J.; Oka, T.; Levasseur, J.; Beker, D.; Zordoky, B.N.; Morton, J.S.; Nagendran, J.; Lopaschuk, G.D.; et al. Resveratrol prevents hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats and mice. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1832, 1723–1733. [CrossRef] [PubMed]
319. Walker, J.M.; Eckardt, P.; Aleman, J.O.; da Rosa, J.C.; Liang, Y.; Iizumi, T.; Etheve, S.; Blaser, M.J.; Breslow, J.L.; Holt, P.R. The effects of trans-resveratrol on insulin resistance, inflammation, and microbiota in men with the metabolic syndrome: A pilot randomized, placebo-controlled clinical trial. *J. Clin. Transl. Res.* 2019, 4, 122–135. [PubMed]
320. Wenzel, E.; Soldo, T.; Erbersdobler, H.; Somoza, V. Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49, 482–494. [CrossRef]
321. Boocock, D.J.; Patel, K.R.; Faust, G.E.; Normolle, D.P.; Marczylo, T.H.; Crowell, J.A.; Brenner, D.E.; Booth, T.D.; Gescher, A.; Steward, W.P. Quantitation of trans-resveratrol and detection of its metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007, 848, 182–187. [CrossRef]
322. Walle, T.; Hsieh, F.; DeLegge, M.H.; Oatis, J.E., Jr.; Walle, U.K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug. Metab. Dispos.* 2004, 32, 1377–1382. [CrossRef]

323. Azorín-Ortuño, M.; Yáñez-Gascón, M.J.; Vallejo, F.; Pallarés, F.J.; Larrosa, M.; Lucas, R.; Morales, J.C.; Tomás-Barberán, F.A.; García-Conesa, M.T.; Espín, J.C. Metabolites and tissue distribution of resveratrol in the pig. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011, 55, 1154–1168. [CrossRef]

Table 1. Gastric handling of polyphenols.

Substrates	Sources	Experimental		End Products	Main Observations	Conclusions	Ref
		Conditions	and Model				
Procyanidins polymers (2-6 mers)	Cocoa	Incubation in simulated gastric juice (pH 2.0) at 37 °C for up to 3.5 h	in gastric	Catechin/epicatechin Monomer and dimer	Time-dependant hydrolysis of oligomers.	Role of stomach in the processing of phenolic compounds.	[64]
Dimeric catechin/epicatechin	Cocoa	Incubation in simulated gastric juice (pH 1.8) at 37 °C for up to 60 min	in gastric	Catechin/epicatechin Dimers isomerization	Time-dependant hydrolysis of dimers.	Role of stomach in the processing of phenolic compounds.	[65]

Free and conjugated Hydroxytyrosol and Tyrosol	Olive oil	Incubation in simulated gastric juice (pH 2.0) at 37 °C for up to 4 h	Free hydroxytyrosol and tyrosol	Time-dependent hydrolysis of hydroxytyrosol and tyrosol conjugates.	Stomach hydrolyzes phenolic compounds conjugates.	[66]
Monomeric/Polymeric Catechin/epicatechin	Grape seed extract	Incubation in simulated gastric juice (pH 2.0) + pepsin at 37 °C for 2 h	Catechin/epicatechin Oligomers	Stability of catechin/epicat.	Stability of phenolic compounds at the gastric level.	[67]
Hydroxycinnamic acid derivatives, Flavonols,	Apple juice	Incubation in simulated gastric juice (pH 2.0) +	Hydroxycinnamic acid derivatives, flavonols,	Stability of Hydroxycinnamic acid derivatives,	Stability of phenolic compounds in the	[68]

dihydrochalcones
 monomeric
 flavans-3-ols,
 procyanidin B₂

pepsin at 37 °C for
 up to 4 h

dihydrochalcones
 monomeric,
 Epicatechin monomer

flavonols,
 dihydrochalcones
 monomeric.

stomach
 dependent on
 structure.

Hydrolysis of
 procyanidin B₂.

Purified Hesperidin
 2S

*Citrus
 sinsensis*
 peel extract

Digestion in the
 simulator of
 human intestinal
 microbial
 ecosystem (pH
 2.0).

Intact hesperidin 2S

No degradation of
 Hesperidin 2S.

Hesperidin is
 resistant to the
 degradation in
 the stomach.

[69]

Resveratrol caprylic
 esters

Synthesis
 product

Incubation in
 simulated gastric
 juice (pH 1.2) +

Intact resveratrol
 caprylic esters

No hydrolysis of
 resveratrol caprylic
 esters.

Resveratrol
 caprylic esters are
 not metabolized

[70]

pepsin at 37 °C for up to 2 h.

in the gastric phase.

Polyphenols

Simulated oral digestion of peeled apple tissue

Incubation in simulated gastric juice (pH 1.6) + pepsin at 37 °C for up to 1 h in a dynamic rat stomach wall model

Released from initial material in decreasing order: chlorogenic acid, epicatechin, catechin, procyanidin B₂ flavan-3-ols, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones flavonols.

All polyphenols were stable except for procyanidin B₂ that was hydrolyzed to epicatechin.

Polyphenol resistance to degradation dependent on structure.

[71]

Polyphenols

Simulated oral digestion of

Incubation in simulated gastric juice (pH 1.2) +

Release of the 16 identified polyphenols from initial material

All polyphenols were stable.

Polyphenol resistance to degradation.

[72]

Kiwifruit tissue pepsin at 37 °C for 2 h during stomach digestion: catechin, epicatechin, quercetin, rutin, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, gallic acid, salicylic acid, vanillic acid.

Procyanidins oligomers and flavonol monomers Cocoa

Oral administration of procyanidin oligomers and flavonol monomers to healthy subjects. Gastric contents

Intact procyanidins oligomers and flavonol monomers

Stomach Procyanidins oligomer and flavonol monomer profiles similar to original product.

Procyanidins oligomers and flavonol monomers are stable in the gastric environment.

[73]

collected and analyzed at 20 min.

Caffeic acid, gallic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, coumaric acid
Purchased purified phenolic acids

In vivo rat ligated pylorus model for in situ gastric digestion at 37 °C for 25 min.

Portal vein and abdominal aorta blood collected.

Plasma analyzed with and without sulfatase and β-glucuronidase treatment.

Intact and conjugated coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid, gallic acid, chlorogenic acid

Rapid appearance of coumaric acid > ferulic acid > caffeic acid > gallic acid > chlorogenic acid in portal vein and abdominal artery. Differential absorption efficiency of phenolic acids and differential affinity of monocarboxylic acid transporters. [74]
Rapid appearance mainly of coumaric and ferulic acid conjugates in portal vein and abdominal artery.

<p>Flavone glycosides (apigenin, luteolin, chrysoeriol) and flavonoid glycosides (kaempferol, quercetin, isorhamnetin)</p>	<p>Parsley</p>	<p>Oral administration of glycoside extracts to rats. Animals sacrificed at 1, 1.5, 2, 4, or 12 h post administration. GI tract segmented (stomach, small intestine, colon, cecum). Stomach wall and lumen content analyzed at 2 h.</p>	<p>At 2 h: flavonoid glycosides in the stomach lumen and wall. Quercetin aglycone in the stomach wall.</p>	<p>At 2 h: flavonoid composition of stomach wall similar to stomach lumen but concentration lower. One aglycone present.</p>	<p>Stomach absorbs intact flavonoid glycosides.</p>	<p>[75]</p>
--	----------------	--	--	--	---	-------------

<p>Isoflavones (Daidzein, daidzin,</p>	<p>Commercial source</p>	<p>In vivo rat ligated pylorus model for</p>	<p>Daidzein and genetein (isoflavone aglycones)</p>	<p>Time-dependent absorption and</p>	<p>Selective absorption and</p>	<p>[76]</p>
--	--------------------------	--	---	--------------------------------------	---------------------------------	-------------

genistein, and
genistin)

in situ gastric
digestion at 37 °C
for 25 min.

Jugular vein blood
analyzed for
daidzein, daidzin,
genistein, and
genistin up to 30
min.

transport of transport of
Daidzein and isoflavone
genetein, but not aglycones by the
their respective stomach.
glycosides daidzin
and genistin.

Quercetin, rutin, Commercial
and isoquercetin source

In vivo rat ligated
pylorus model for
in situ gastric
digestion at 37 °C
for 30 min.

Biliary quercetin and 3'-
O-methyl-quercetin

Quercetin

absorbed by the
stomach and
secreted in bile.

No absorption of
rutin or
isoquercetin.

Limited role of the
stomach in
flavonoid
glycosides.
Selective
absorption and

[77]

Biliary duct
cannulation and
content analyzed.

transport of
aglycones.

Aortic blood
collected and
analyzed.

Table 2. Experimented Caco-2 cells in polyphenol transport and metabolism.

Substrates	Sources	Experimental Conditions	Main Observations	Conclusions	Ref
hydroxytyrosol, tyrosol, oleuropein	and Olive oil	Polyphenols added to the apical chamber and incubation for 2 h. Apical and basolateral compartments collected and analyzed.	<p>↓\squarehydroxytyrosol and tyrosol in the apical and \uparrow in the basolateral media.</p> <p>Appearance of 3-<i>O</i>-methyl-tyrosol and glutathionyl-hydroxytyrosol in the apical and basolateral compartments.</p> <p>Φ transport of oleuropein from the apical to the basolateral compartment.</p>	<p>Hydroxytyrosol transported through the enterocyte apical membrane to the basolateral compartment with formation of conjugates.</p>	[66]
<i>Trans</i> -piceid (Resveratrol mono-d-glucoside)	3- β - <i>V. Vinifera</i>	Incubation with <i>trans</i> -piceid up to 360 min.	<p>Bidirectional (apical to basolateral and inverse) transport of <i>trans</i>-piceid.</p> <p>Detectable <i>trans</i>-resveratrol in both chambers.</p>	<p><i>Trans</i>-piceid and its aglycone are transported across the apical side and effluxed by the basolateral membrane.</p>	[82]

<p><i>Trans</i>-piceid (Resveratrol 3-β-mono-d-glucoside)</p>	<p><i>V. Vinifera</i></p>	<p>Pre-incubated with \pm chrysin (5,7-Dihydroxyflavone) and \pm d-saccharic lactone in 6-well plates. Incubated with <i>trans</i>-piceid or <i>trans</i>-resveratrol 24 h.</p>	<p>Appearance of <i>trans</i>- Resveratrol after incubation with <i>trans</i>-piceid. \uparrow <i>trans</i>- resveratrol-glucuronides production in chrysin (UDP-glucuronosyl transferase inducer) treated cells.</p>	<p><i>Trans</i>-piceid undergoes hydrolysis to its aglycone and <i>trans</i>-resveratrol undergoes phase II metabolism within the enterocyte.</p>	<p>[82]</p>
<p>Quercetin, Quercetin-4-O-β-d-glucoside, Quercetin-3-O-β-d-glucoside, Quercetin-3,4-di-O-β-d-glucoside</p>	<p>Purified polyphenols</p>	<p>Polyphenols added to the apical chamber and incubation up to 2 h. Apical, cellular, and basolateral compartments collected.</p>	<p>Time-dependent \downarrow quercetin in apical chamber. Stability of quercetin glycoside in apical chamber. Time-dependent appearance of quercetin glycosides in apical chamber and cellular compartment when quercetin is added. Time-dependent \uparrow quercetin glycosides in basolateral</p>	<p>Quercetin aglycone is preferentially transported through the enterocyte apical membrane to the basolateral compartment after intracellular conjugation.</p>	<p>[84]</p>

compartment and stable low quercetin.

Catechin, epigallocatechin gallate encapsulated or not in non-ionic surfactant-based vesicles (niosomes)

Purified polyphenols

Polyphenols added to the apical chamber and incubation up to 6 h at 37 °C or 4 °C. Cell and basolateral compartments collected and analyzed.

Time-, concentration-, and temperature-dependent uptake of polyphenols. ↑ uptake when inserted into niosomes.

Time-, concentration-, and temperature-dependent transport of polyphenol to the basolateral compartment,

↑ with niosomes. ↓ transport with ATP inhibitor, ↑ transport with EDTA and P-glycoproteins and multidrug resistance proteins inhibitors.

Temperature dependence of uptake suggested energy-driven process.

Deactivation of efflux pumps resulted in increased uptake by apical membrane and efflux in basolateral compartment.

[86]

Free and methyl esters of Hydroxycinnamic acids (ferulic, sinapic, <i>p</i> -coumaric and caffeic methyl esters),	Purified polyphenols	Medium collected after 24 h incubation and analyzed.	Glucuronides of ferulic, sinapic, <i>p</i> -coumaric and caffeic methyl esters, sulfates of ferulic, sinapic, <i>p</i> -coumaric and caffeic methyl esters, ferulic, sinapic, <i>p</i> -coumaric sulfates.	Metabolites produced either intra-cellularly and excreted in medium or produced in the medium by secreted phase I and phase II enzymes.	[90]
Ethyl esters of 5,5-diferulate, 8- <i>O</i> -4-diferulate, 8,5-benzofuran					
Quercetin, Quercetin-3,7,3,4-	Purified polyphenols	Polyphenols added to the apical (A) or basolateral (B) chamber and incubate	Time- and temperature-dependent bidirectional but preferential B-A transport of quercetin and	Quercetin might be a substrate of P-glycoproteins and	[91]

O-tetra-ethylacetate up to 2 h. Apical, and ethylacetate derivative. Transport multidrug resistance basolateral compartments more efficient for the ethylacetate proteins, causing the ↓ collected. P-glycoproteins and bioavailability of multidrug resistance proteins quercetin. Quercetin ethylacetate inhibitors. ↑ quercetin permeation coefficient from A-B and ↓ from B-A. derivative exhibited Φ on ethylacetate derivative. better membrane permeation than parent compound.

Catechin, puerarin Purified Incubation up to 2 h. [92]
 (Daidzein-8-C- polyphenols
 glucoside) Time- and concentration-dependent Deactivation of efflux uptake. pumps resulted in Catechin enhanced uptake and increased uptake by transcellular transport of puerarin apical membrane and

but puerarin inhibited that of efflux in basolateral catechin. compartment.

P-glycoproteins and multidrug resistance proteins inhibitors. ↑ polyphenol uptake and transport.

↑: increase; ↓: decrease; Φ: no effect

Table 3. Effect of polyphenols on DNA and histone methylation and acetylation.

Polyphenols	Experimental Model	Tx Duration (week)	Polyphenol Dosage	Epigenetic Modifications	Outcomes in Response to Polyphenols	Ref
Obesity and Insulin Resistance						
Raspberry extract	HFD-fed mice	16	120 mg/kg/d	↑AT Histone methylation and acetylation	↓Obesity ↓ IR ↓Inflammation ↓Liver steatosis	[189]
Quercetin and Q2 derivative	HFD-fed rats	12	0.26 mg/kg/d	↑AT Histone methylation	↓Obesity ↓ IR ↓Dyslipidemia ↓Liver steatosis	[190]

Apples	HFHSD-fed rats	8	700 mg/kg/d		↓Obesity	[191]
				↑Methylation Aqp7	↓IR	
				↑PGC genes	↑AT lipolysis	
				↑Methylation leptin gene		

Hypertension

Cocoa	Humans	2	6 g/d		ND	[192]
	Pre-hypertension or hypercholesterolemia					
				↓Leuk DNA methylation		
				↓DNA Mtases methylation		

Resveratrol	Salt-sensitive hypertensive rats	0–12	50 g/l drinking water	↑histone H3K27me3 in renal aorta	Prevention of hypertension	[193]
					↑Antioxidant defence	

Tx: treatment; HFD: high-fat diet; HFHSD: high-fat high-sucrose diet; miR: micro-RNA; IR: insulin resistance; AT: adipose tissue; Leuk: leukocytes; Mtases: methylases; ND: no data; ↑: increase; ↓: decrease.

Table 4. Effects of polyphenols on the regulation of miRNAs on oxidative and inflammation pathways.

Polyphenols	Experimental Model/Conditions	Regulated miRNAs	Expression Pattern and Function	Ref
Cellular models				
Quercetin and Isorhamnetin	Pre LPS Tx stimulation of murine RAW 264.7 macrophages. Polyphenols (0, 10–100 μmol/l)	↓miR-155	↓TNFα, ↓iNOS, ↓IL-1β, ↓IL-6, ↓MIP1α, ↓NF-kB ↑Nrf2 and ↑ARE	[194]
Resveratrol	Human THP-1 cell line HPBMC	↑miR-663 ↓miR-155	↓ basal AP-1 and ↓LPS-induced AP-1 ↓ JunB/D mRNA	[195]
EGCG	IL-1β-stimulated human OA chondrocytes	↑hsa-miR-199a-3p	↓COX-2 mRNA/protein expression ↓PGE ₂ production	[196]
EVOO oleocanthal (OC) and oleacein (OA) secoiridoids	SGBS adipocytes pretreated with OC or OA before stimulation by TNFα	↓miR-155-5p, ↓miR-34a-5p ↑let-7c-5p	↓IL-1β, ↓COX-2, ↓MMP-2, ↓NF-kB, ↓NADPH oxidase ↑SOD and ↑GPx, ↑PPARγ ↓MCP-1, ↓CXCL-10, ↓M-CSF	[197]

Olive oil hydroxytyrosol (HT)	SGBS adipocytes pretreated with HT before stimulation by TNF α	<p>↓miR-155-5p,</p> <p>↓miR-34a-5p</p> <p>↑let-7c-5p</p>	<p>↓MCP-1, ↓CXCL-10, ↓IL-1β, ↓IL-6, ↓VEGF, ↓COX-2,</p> <p>↓M-CSF, ↓MMP-2, ↓NF-κB and ↓ROS production</p> <p>↑GPX ↑eNOS, ↑PGC-1α</p>	[198]
Propolis extracts	HaCat cell line treated for 24 h with propolis extracts (3.125, 1.56, and 0.78 mg/mL)	<p>↑miR-19a-3p</p> <p>↑ miR-203a-3p</p> <p>↑miR-27a-3p</p> <p>↓miR-17-3p</p>	<p>↓ TNFα mRNA</p> <p>↓NFE2L2 mRNA</p> <p>↑ GPX2, ↑MnSOD and ↑TRXR2 mRNAs</p>	[199]
Curcumin compound	polyphenolic ARPE-19 cells treated with 20 μ M curcumin and 200 μ M H ₂ O ₂	<p>↑miR-146a</p> <p>↑miR-155</p> <p>↓miR-23b</p> <p>↓miR-27b</p> <p>↓miR-26b</p> <p>↓miR-15b</p> <p>↓miR-9</p>	<p>↓NF-κB</p> <p>↑CAT, ↑GPx</p>	[200]

		↓miR-30b, miR-30e		
Açai and red muscadine grape polyphenols	HUVEC ROS induction by 25 mM glucose for 30 min	↑miR-126 ↑MiR146a	↓IL-6, ↓IL-8, ↓NF-kB, ↓PXR, ↓VCAM-1 ↑CYP1A1, ↑MDRP1, ↑CAT, ↑GST activity	[201]
Resveratrol	LPS-stimulated THP-1 macrophages pretreated with resveratrol	↑miR-Let7A	↓TNFα, ↓IL-6, ↓IL-10, ↓IL-4, ↓SIRT1 mRNAs	[202]
Animal models				
Quercetin	Ctrl or HFD C57BL/6 J fed mice 0.2 or 2.0 mg/g diet	↑miR-125b	↓IL-6, ↓CRP, ↓MCP-1, ↓AOAH, ↓HO-1, ↓Ref-1, ↓TLR-2 mRNAs	[203]
Grape seed extract	HFD-fed obese Rats 30 mg/kg/d	↓miR-33a, ↓miR-122	↓TC, ↓TAG, ↓LDL-C, ↓TNFα, ↓liver MDA ↑SOD, CAT; ↑liver GSH	[204]
Polydatin (3,4',5-trihydroxystilbene-3-β-D-glucoside)	Ctrl, or HFrD, HFrD+Polydatin (7.5, 15, 30 mg/kg), HFrD + PG (4 mg/kg) fed SD rats IG saline, polydatin or PG 7 week	↓ miR200-a	↓ TXNIP, ↓NLRP3, ↓ASC, ↓Casp-1, ↓ SREBP-1 and ↓SCD-1 ↑ PPAR-α and ↑CPT-1	[205]

Tea extract	HFD-fed mice for 12 weeks	↓miR-335	↓Obesity, ↓IR, ↓Inflammation, ↑Energy expenditure	[206]
	500 mg/kg/d	↓ miR-155 in AT		
Resveratrol	HFHS-fed rats for 6 weeks	↑miR-211-3p	↓Obesity, ↓AT lipogenesis	[207]
	30 mg/kg/d	↑miR-1224		
		↑miR-539-5p		
		↓AT miR-511-3p		

Human studies

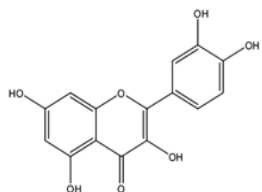
Resveratrol	T2D HT patients.	HPBMC	↓ IL-6, CCL-3, IL-1 β , TNF α , ↑ LRRFIP-1	[208]
	1-year daily intake of grape extract (8.1 mg/d for first 6 months and 16.2 mg/d for last 6 months)	↑miR-21		
		↑miR-181b		
		↑miR-663		
		↑miR-30c2		

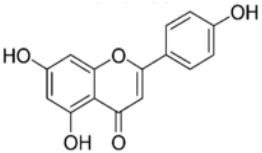
Tx: Treatment; Ctrl: control, HFD: high-fat diet; HFrD: high-fructose diet; PG: pioglitazone; SD: Sprague–Dawley rat; ARPE-19 cells: adult retinal pigment epithelial cell line-19; HUVEC: human umbilical vascular endothelial cells; THP-1: human monocyte leukemia cells; LPS: lipopolysaccharides; TNF α : tumor necrosis factor alpha; iNOS: inducible nitric oxide synthase; IL-1 β : interleukin-1 β ; IL-6: interleukin-6; MIP-1 α : macrophage inflammatory protein-1 α ; NF- κ B: nuclear factor κ B; Nrf2: NF-E2-related factor 2; AOA: acylglycerol acyl hydrolase; HO-1: heme oxygenase-1; Ref-1: redox factor-1; TLR-2: toll like receptor-2; ARE: antioxidant response element; CRP: C-reactive protein; MCP-1: monocyte chemo-attractant protein-1; T2D: type-2 diabetes; HT: hypertensive; HPBMCs: human peripheral blood mononuclear cells; LRRFIP-1: leucine-rich repeat flightless-interacting protein-1; HaCat: human keratinocyte cell line; IG: intra-gastric; ASC: apoptosis-associated Speck-like protein Casp1: caspase-1; SGBS: Simpson–Golabi–Behmel syndrome; ALP: alkaline phosphatase; CCL-3: chemokine (C-C motif) ligand-3; TC: total cholesterol, TAG: triacylglycerol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; TAC: total antioxidant capacity; MDA: malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase;

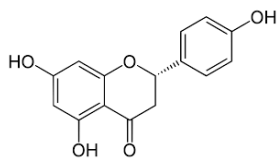
CAT: catalase; GPX: glutathione peroxidase; GSH: glutathion, OA: osteoarthritis; COX2: cyclooxygenase-2; PGE2: prostaglandin-E2; EGCG: epigallocatechin-3-O-gallate; MMP-2: matrix-degrading enzyme metalloproteinase; NADPH oxidase: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; CXCL-10: C-X-C motif ligand 10; M-CSF: macrophage colony-stimulating factor; PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor; NFE2L2: nuclear factor, erythroid 2 like 2; TRXR2: thioredoxin reductase 2; MnSOD: manganese superoxide dismutase; TXNIP: thioredoxin-interacting protein; NLRP3: NOD-like receptor (NLR) family, pyrin domain containing 3; PPAR α : peroxisome proliferator activated receptor- α ; CPT-1: carnitine palmitoyl transferase-1; SREBP-1: sterol regulatory element binding protein 1; SCD-1: stearoyl-CoA desaturase-1; vEGF: vascular endothelial growth factor; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 α ; GLUT-4: glucose transporter-4; VCAM-1: endothelial vascular cell adhesion molecule-1; PXR: pregnane X receptor; GST: glutathione S-transferase; MDRP1: multidrug-resistant protein 1, CYP1A1: cytochrome P450; SIRT1: sirtuin 1; \uparrow : increase; \downarrow : decrease.

Table 5. Polyphenol metabolites and functions.

Polyphenols	Subclasses	Metabolites	Bacterial Catabolism	Metabolites Functions	Ref
Flavonols	Quercetin	3,4-DHPAA	<i>Clostridium orbiscidens</i>	Oxygen radical scavenging (all the metabolites), SOD- like activities (3,4 DHPAA), ↑glutathione S-transferase (3,4 DHPAA), ↑Nrf2-AhR (3,4 DHPAA) ↓Proinflammatory cytokines (3,4 DHPAA) ↑Glucose induced-insulin secretion (3,4 DHPAA) ↑Function and survival of pancreatic β -cells (3,4 DHPAA) Protective effect against OxS induced-endothelial dysfunction (3,4 DHPAA)	[209–223]
		3-HPAA	<i>Eubacterium oxidoreducens</i>		
		4-HPAA	<i>Eubacterium ramulus</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i>		



Flavones	Apigenin	Phloretin	<i>Clostridium orbiscindens</i>	<p>↓Oxygen radical scavenging (3-HPPA)</p> <p>↓Proinflammatory cytokines (3-HPPA)</p> <p>↑Glucose induced-insulin secretion (3-HPPA)</p> <p>↑Function and survival of pancreatic β-cells (3-HPPA)</p> <p>Protective effect against OxS induced-endothelial dysfunction (3-HPPA)</p>	[209,210,214,215,223–226]
		3-HPPA			
		4-HPPA			
		4-HCA			
Flavanones	Naringenin	3,4-DHPPA	<i>Clostridium</i> strains	↓Oxygen radical scavenging (3-HPPA)	[34,60,210,214,219,223–225,227,228]
		3-HPPA	<i>Eubacterium ramulus</i>	↓Proinflammatory; 3,4 DHPPA	
		4-HPPA		<p>↑Glucose induced-insulin secretion (3-HPPA)</p> <p>Protective effect against OxS induced-endothelial dysfunction (3-HPPA)</p>	



Daidzein

(S)-Equol

O-DMA

Isoflavones

Stimulation of cellular antioxidant systems

[229–231]

Bacteroides ovatus,

Streptococcus intermedius,

Ruminococcus productus,

↑Catalase and SOD activity

Anti-atherogenic effect

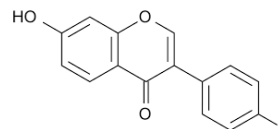
Eggerthella sp.Julong 732,

Enterococcus faecium EPI1,

Lactobacillus mucosae EPI2,

Finegoldia magna EPI3

Clostridium spp. HGHA136



Monomers (catechins,
epicatechins) and
proanthocyanidins

3-HPPA

3,4-DHPPA

3',4'-DHPVL

3,4-DHPVA

Flavan-3-ols

Clostridium coccooides,

Bifidobacterium spp.

Eggerthella lenta

Flavonifractor plautii

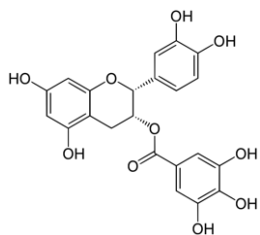
↓Oxygen radical scavenging (3-HPPA)

↓ROS generation (3'-HPVL, 3',4'-DHPVL)

↓NF-κB transcriptional activity

↓NO synthesis (3',4',5'-THPVL; 3',4'-DHPVL)

[87,131,232
–243]



3'-HPVL

3',4',5'-THPVL

3',5'-DHPVL

↓iNOS expression (3',4'-DHPVL)

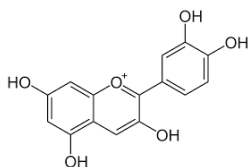
Maintenance of endothelial homeostasis and functions (3',4'-DHPVL):

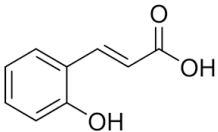
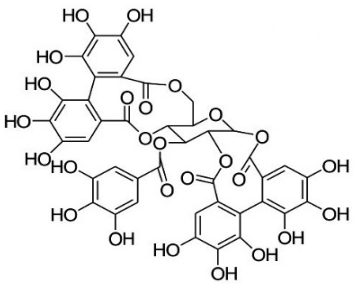
↓Endothelial adhesion (3',4'-DHPVL)

↓VCAM1 and MCP1 (3',4'-DHPVL)

↓Systolic blood pressure (3',4',5'-THPVL; 3',5'-DHPVL)

Anthocyanins	Cyanidin	Protocatechuic acid	<i>Lactobacillus plantarum</i> ,	[244–249]
	Peonidin	Vanillic acid	<i>Lactobacillus casei</i>	Antidiabetic activities due to their antioxidant capacity
	Pelargonidin	4-Hydroxybenzoic acid	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	
	Malvidin	Syringic acid	<i>Bifidobacterium lactis</i>	↓DNA damages, ↓ROS production
	Delphinidin	Gallic acid	BB-12	↑Cellular glutathione level, ↑glucose uptake by HepG2 and human skeletal cells, ↑glycogen production by HepG2 cells, ↑Mitochondria homeostasis



Hydroxycinnamic acids	Chlorogenic acids	3-HPPA	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i>	↓Oxygen radical scavenging(3-HPPA)	[210,223–225,250,251
		3,4-DHPPA		↓Proinflammatory cytokines (3-HPPA; 3,4 DHPPA)]
		Caffeic acid		Antidiabetic activities due to its antioxidant capacity (caffeic acid):	
				↑Cellular glutathione level	
				↓DNA damages	
				↓Cytotoxicity, ↓ROS production	
				↑Glucose consumption	
				↑Glycogen production	
Hydrolyzables tannins	Ellagitannins	Ellagic acid	<i>Butyrivibrio</i> spp.	↓Intracellular ROS accumulation	[252–264]
		Urolithin A		(Urolithin A)	
		Urolithin B		↓Cellular injury by ROS	
				↓Proinflammatory mediators	
				(Ellagic acid and Urolithin A)	
				↓NADPH oxidase activation (Urolithin A)	
				↓PGE2 production (Urolithin A and B)	

↓mPGES-1 and COX-2 expression

(Urolithin A and B)

↓Proteins glycation (Urolithin A and B)

↓Triglycerides accumulation

(Ellagic acid and Urolithin A)

↓Expression of adipogenic protein and gene
(Urolithin A)

↑Fatty acid β -oxidation (Urolithin A)

Alleviation of myocardial ischemia/reperfusion
injury (Urolithin A)

Lignans

Secoisolariciresinol

Enterodiol

Bacteroides distasonis,

Antioxidant capacity

[265–268]

Enterolactone

Bacteroides fragilis, *Bacteroides ovatus*,

OH-scavenging activity

Clostridium cocleatum,

Immunomodulatory effects in human cells

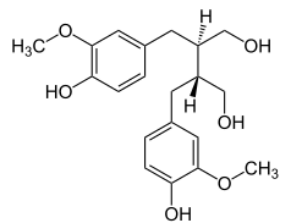
Butyribacterium

↓NF- κ B transcriptional activity

methylotrophicum,

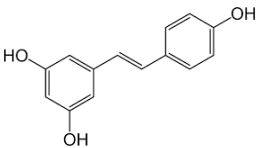
↓Proinflammatory cytokines expression

Eubacterium callanderi,

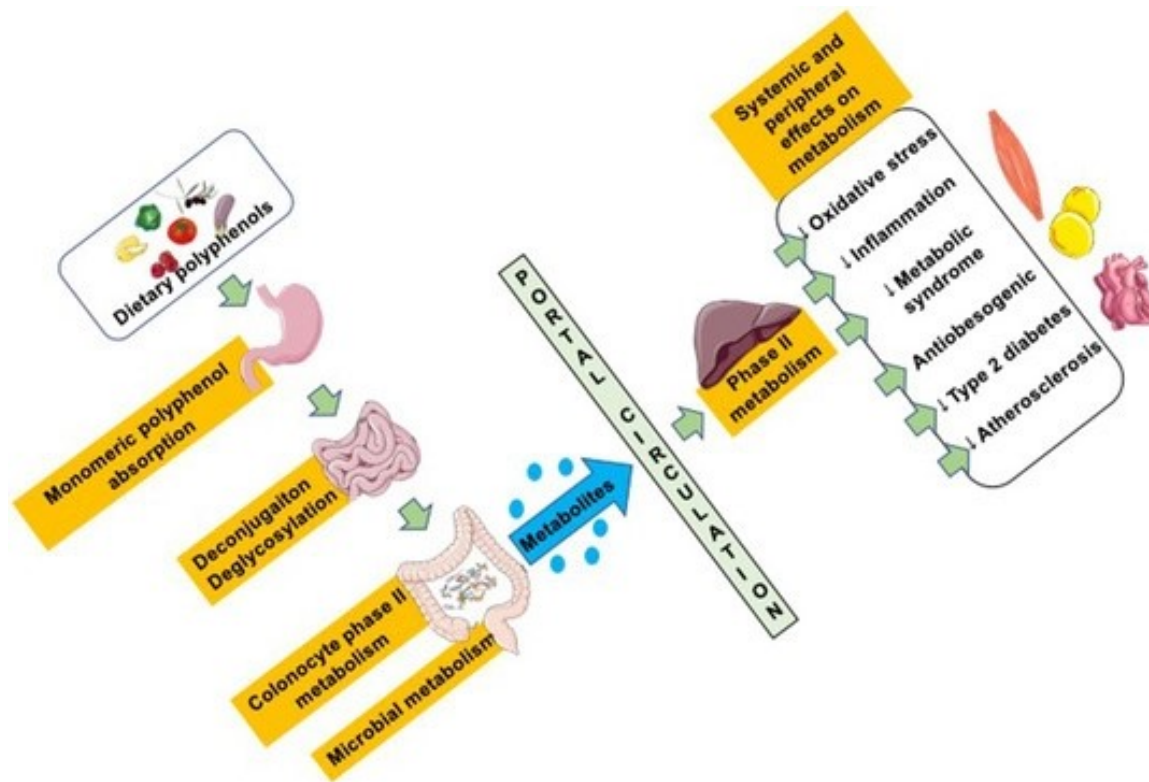


Eubacterium limosum,
Peptostreptococcus productus,

Clostridium scindens,
Eggerthella lenta

Stilbenes	Trans-resveratrol	DHR	<i>Slackia equolifaciens</i>	Antioxidant activity	[269–271]
		3,4'-dihydroxy-trans-stilbene	<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	Free radical scavenging (DHR)	
		3,4'-dihydroxybibenzyl (lunularin)		↓NO production (DHR)	

3,4-DHPPA, 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid; 3-HPPA, 3-hydroxyphenylpropionic acid; 4-HPPA, 4-hydroxyphenylpropionic acid; 4-HCA, 4-hydroxycinnamic acid; 3,4-DHPAA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; 3-HPAA, hydroxyphenylacetic acid; 4-HPAA, 4-hydroxyphenylacetic acid. *O*-DMA, *O*-demethylangolensin, 3,4-DHPVA, 3,4-dihydroxyphenyl- γ -valeric acid; 3',4',5'-THPVL, 3',4',5'-trihydroxyphenyl- γ valerolactone; 3',4'-DHPVL, 3',4'-dihydroxyphenyl- γ -valerolactone; 3',5'-DHPVL, 3',5'-Dihydroxyphenyl- γ -valerolactone; 3'-HPVL, 3'-hydroxyphenyl- γ -valerolactone; DHR, dihydroresveratrol, NO: nitric oxide; ↑: increase; ↓: decrease.



Graphical abstract

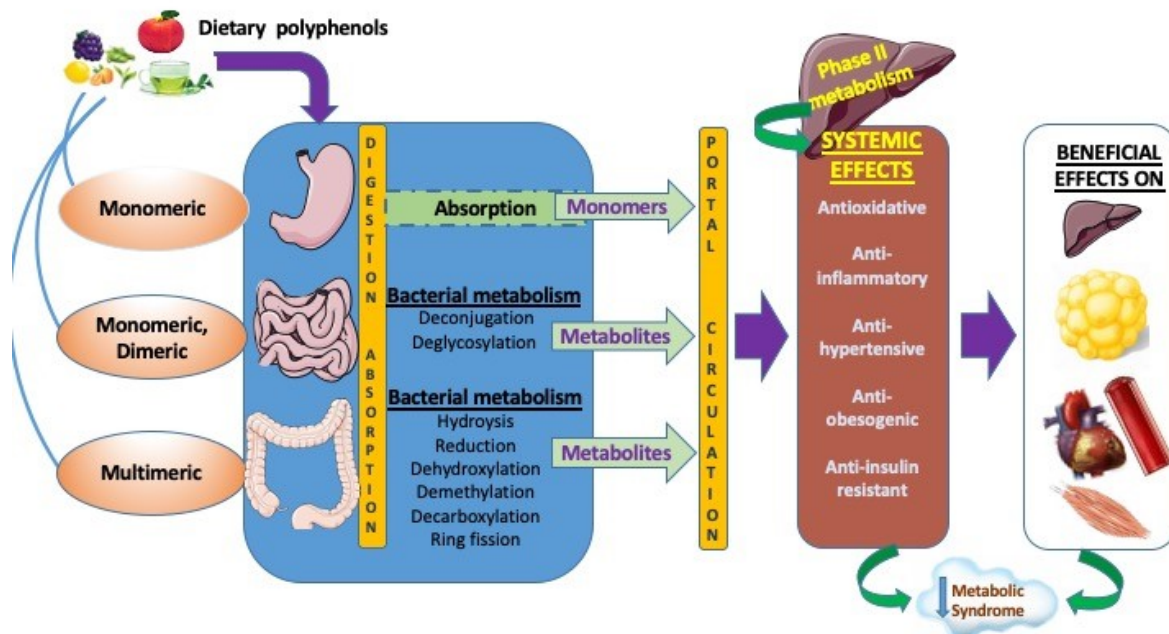


Figure 1. Integrated view of intestinal dietary polyphenol absorption, luminal transformation and actions of their relevant metabolites on cardiometabolic disorders. As dietary polyphenols have limited absorption in the stomach and the small intestine, the unabsorbed polyphenols continue

their transit to the colon where they are hydrolyzed, demethylated, decarboxylated, dehydroxylated, and ring fissioned by microbiota. Following these processes, microbial metabolites are subjected to phase II metabolism in the colon and liver, and enter the bloodstream to exert their biological effects, which extend to peripheral organs. Unabsorbed polyphenols and metabolites are excreted in feces, and absorbed microbial metabolites are mostly excreted in the urine. Noteworthy, whereas polyphenols improve microbiota composition, diversity and functions through their prebiotic actions, gut microbiota transform them into efficient bioactive regulators capable of optimizing cardiometabolic health in healthy individuals, while alleviating and mitigating the metabolic syndrome in patients.

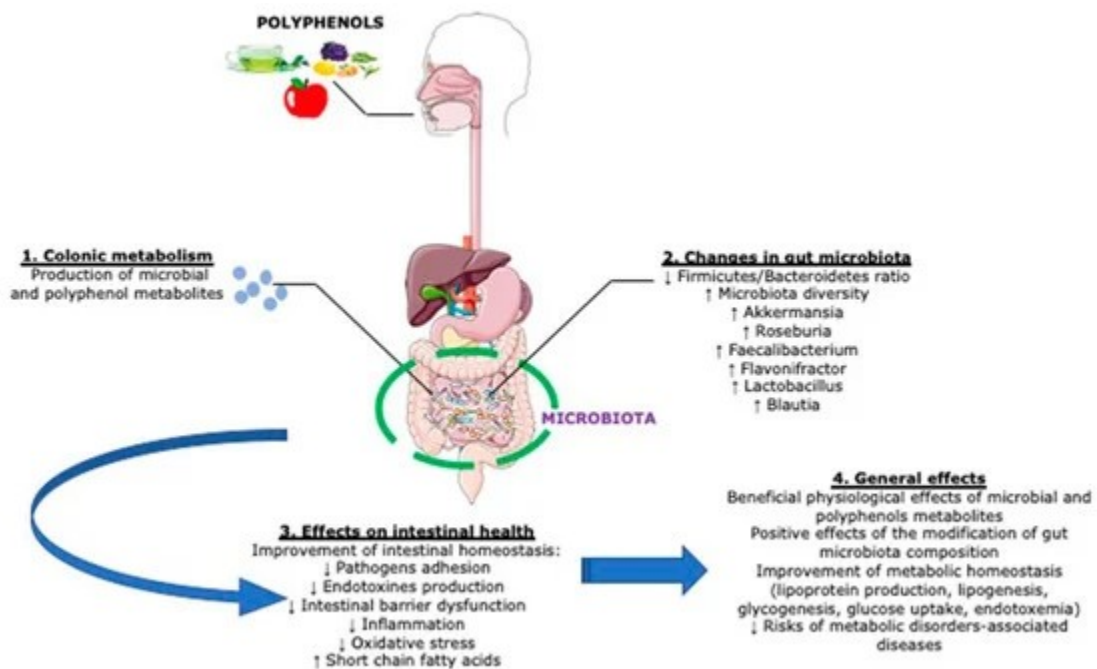


Figure 2. Beneficial actions resulting from the interaction between polyphenols and intestinal microbiota. Polyphenolic compounds exhibit prebiotic ability, which modifies bacterial composition and function. On the other hand, intestinal microbiota ameliorates intestinal homeostasis and cardiometabolic health by producing polyphenolic metabolites. * Created with Servier Medical Art.

Article 4

5-(3',4'-Dihydroxyphenyl- γ -valerolactone), a flavan-3-ol microbial metabolite, efficiently modulates oxidative stress, inflammation and aberrant metabolic pathways in intestinal cells

Mireille Koudoufio^{1,2,3}, Francis Feldman^{1,2,3}, Lena Ahmarani^{1,2,3}, Valérie Marcil^{1,2,3}, Alain Sane^{1,3}, Jacob Lessard-Lord⁴, John Boukouvalas⁴, Edgard Delvin^{1,5}, Jean-François Beaulieu⁶, Schohraya Spahis^{1,2,3}, Alain Stinzi⁷, Yves Desjardins³, Emile Levy^{1,2,3*}

¹Research Centre, CHU Ste-Justine, Departments of ²Nutrition and ⁵Biochemistry, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

³Institute of Nutrition and Functional Foods, Laval University, Quebec City, QC, Canada

⁴Centre de recherche sur les propriétés des interfaces et la catalyse, Department of chemical engineering, Laval University, Quebec City, QC, Canada

⁶Laboratory of Intestinal Physiopathology, Department of Immunology and Cell Biology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

⁷Department of Biochemistry, Microbiology, and Immunology, Faculty of Medicine, Ottawa Institute of Systems Biology, University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada

Short Title: Phenolic metabolite and intestinal metabolic disorders

* Correspondance: emile.levy.hsj@ssss.gouv.qc.ca; Tel.: +1-(514) -345-7783

Les résultats présentés dans cette partie de la thèse contribuent à répondre à l'objectif 5.

Article en préparation pour être soumis

L'étudiante a contribué à la planification des expériences, à leurs réalisations, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article.

Abstract

Context: Proanthocyanidins (PACs), the most abundant polyphenols consumed in diet, exhibit a broad spectrum of biological and pharmacological activities, resulting in various health benefits. However, the potential of their metabolites, produced by gut microbiota, has been little investigated to date.

Objectives: To compare the effects of 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone (DHPVL), the most abundant ring-fission metabolite, with parent polyphenols (PACs), on harsh intestinal conditions known to be intrinsically linked to complex diseases.

Methods: Human intestinal Caco-2/15 cells were pre-incubated with DHPVL (7.5 µg/mL) or PACs (250 µg/mL) in the presence or absence of the pro-oxidant and -inflammatory compounds tert-butyl hydroperoxide (2000 µM) + lipopolysaccharide (LPS, 100 µg/mL), respectively.

Results: The addition of PACs and DHPVL ameliorates intestinal barrier integrity and normalized LPS+tert-induced lipid peroxidation as revealed by the concomitant decrease of malondialdehyde biomarker, as well as increase in transcript levels of the antioxidant enzymes (superoxide dismutase and glutathione peroxidase) through the stimulation of NRF2 transcription factor. Furthermore, an evident anti-inflammatory impact was observed in view of the decline of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and cyclooxygenase-2 (COX-2) likely due to the downregulation of the powerful proinflammatory transcription factor NF- κ B. DHPVL and PACs showed high efficiency in preserving cellular lipid and glucose homeostasis as reflected by enhanced expression of fatty acid β -oxidation markers, depressed lipogenesis enzymes (FAS & ACC) and gluconeogenesis regulators (GPase & PEPCK), resulting from the modulation of associated transcription factors (PPAR α , PGC1 α and SREBP1c). As these metabolic pathways are tightly controlled by insulin sensitivity, we explored the insulin signaling pathway and detected an upregulation of phosphoPI3K/Akt load and a tendency in downregulation of p38-MAPK expressions, -revealing the favorable impact of DHPVL and PACs.

Conclusions: Even at a concentration 30 times less than of PACs, DHPVL shows some abilities to maintain intestinal metabolic homeostasis by improving intestinal barrier integrity, and

counteracting oxidative stress, inflammation and lipid metabolism via mechanisms involving specific transcription factors and insulin signaling.

1. Introduction

Special attention has been paid over the last two decades to plant-derived polyphenols owing to their tremendous health benefits. According to epidemiological and clinical studies, polyphenols composed of stilbenes, flavonoids, phenolic acids, lignans and curcuminoids, are endowed with health-promoting activities, necessary for the prevention and alleviation of chronic diseases [1-3]. In particular, great consideration has been dedicated to proanthocyanidins (PACs), which belong to flavonoids (flavan-3-ols) highly abundant in human diet, and consist of dimers, trimers and highly polymerized oligomers of monomeric catechin and epicatechin [4, 5]. These natural compounds are known to act as powerful agents with anti-angiogenesis, -proliferation, -oxidation, -inflammation and -tumor properties [6-8]. Our recent studies have clarified PACs effectiveness in intestinal cells through characterization of their protective effects on oxidative stress (OxS), antioxidant defense, inflammation, fatty acid (FA) β -oxidation, lipogenesis and gluconeogenesis [9]. Several studies have also evidenced the ability of PACs to interact with cell membranes and protect them from cytotoxicity, oxidation and disruption [10].

Scientific investigations during the last decade have indicated that the beneficial effects of flavan-3-ols in the human organism are mostly attributed not to the parent set of phenolic compounds present *in planta*, but rather to their related enteric metabolites, mostly derived from microbial catabolism taking place in the colon. The dynamic interaction of PACs with intestinal microbiota is well established. Given their high molecular weight, physico-chemical properties and limited small intestinal digestibility, PACs continue their transit to the colon [11, 12] where they meet luminal bacterial communities and are metabolized. In fact, a wide array of microorganisms transforms PACs into bioactive metabolites that may modulate gut metabolism and immunity. Metabolomic analyses have identified phenyl-valerolactones as key products of PACs colonic metabolism [13, 14]. Although the health-promoting effects noted in response to PACs could account for the biotransformation of parent polyphenols into metabolites, the incomplete

available scientific data does not allow to draw definite conclusions about their pleiotropic biological effects and mechanisms of action [15-17] .

The main objective of the present work is to investigate the modulation of intestinal homeostasis by 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone (DHPVL), the most abundant ring-fission enteric microbiome metabolite of PACs monomer components. This study also sought to provide supporting evidence on DHPVL role in gastrointestinal tract, which represents an eloquent target to treat conditions conducive to cardiometabolic disorders (CMD) [18]. To this end, fully differentiated intestinal Caco-2/15 cells were used to evaluate the preventive action of DHPVL, compared to PACs, against OxS, inflammation, insulin insensitivity and aberrant intracellular metabolic pathways.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

PACs were purified from cranberries and were characterized as described previously[19, 20]. The metabolite DHPVL was chemically synthesized using a two-step procedure starting from 2-(trimethylsiloxy) furan and 3,4-dibenzyloxybenzyl chloride (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada). An overall yield of 52% was obtained and no impurity was detected by ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) and ¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN).

2.2 Intestinal Caco-2/15 cell culture and treatments

The human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2/15 cell line was employed as described in our previous studies [9, 20-22] . Briefly, Caco-2/15 cells were cultured at 37 °C with 5% of CO₂ in minimal essential medium, containing 1% penicillin-streptomycin and 1% nonessential amino acids (GIBCO BRL), and were supplemented with 10% decomplemented fetal bovine serum (Flow, McLean, VA, USA). Cells were maintained in T-75 cm² flasks until they reached 80–90% of confluence and were then trypsinized. For individual experiments, these epithelial cells were seeded at the density of 1 × 10⁶ cells/well in 6-well plates (Corning Inc., USA). Cells were cultured for fourteen days at which point the Caco-2/15 cells are highly differentiated into polarized

mature enterocytes and appropriate for metabolic studies [23, 24]. The medium was refreshed every other day.

2.3 Intestinal Caco-2/15 cell integrity and viability

Caco-2/15 cells viability was appraised with Trypan blue solution and with MTT reduction. Monolayer intactness and physical barrier function were tested.

Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability

The dye exclusion test was used to determine the number of viable cells. It is based on the principle that live cells possess intact cell membranes that exclude certain dyes, such as trypan blue, whereas dead cells do not. A cell suspension from each treatment was mixed with equal volume of 0.4% Trypan Blue Stain (Gibco, Life Technologies). Percentage of viable cells was determined using LUNA automated cell counter (Logos Biosystems, MBI Lab equipment).

MTT Reduction

Cytotoxicity was induced by tertbutyl hydroperoxide (250, 500, 1000 and 2000 μM) after 2h incubation period in Caco-2 cells. Cell viability was measured as MTT reduction by cells cultured in a 96-well plate. In brief, 12-mM MTT stock solution was added to each well and cells were incubated at 37°C for 2h. DMSO was then added to the wells and after thorough mix the plate was put back to 37°C for 10 minutes prior to absorbance reading at 540 nm.

2.4 Induction of OxS and inflammation

Prior to OxS and inflammation induction, differentiated Caco 2/15 cells were treated with PACs (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or DHPVL (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24h in serum-free minimal essential medium. LPS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was then added, and cells were incubated overnight. The following day, cells were supplemented with tertbutyl hydroperoxide (2000 μM) for 2h.

2.5 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was assessed through the production of malondialdehyde by Caco-2/15 cells treated with LPS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + tertbutyl peroxide (2000 μM), using an HPLC equipped with fluorescence detection as described previously [25, 26].

2.6 RNA isolation and RT-qPCR

Total RNA was extracted from differentiated controls and LPS/tert; PACs + LPS/tert; or metabolite + LPS/Tert treated Caco-2/15 cells using Trizol lysis reagent (Invitrogen) and 1 µg was reverse transcribed with All-In-One 5X RT MasterMix (abmGood, Canada) to generate cDNA. Real-time-qPCR was performed using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) to better evaluate the expression of a number of genes. The thermal profile included an initial denaturation step at 95°C for 30 s, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 3 s and annealing and extension at 60°C for 30 s. Amplified genes were quantified by fluorescence using the PowerUp SYBR Green Master Mix (Life Technologies). Levels of expression of target-gene mRNAs were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [27] .

2.7 Protein expression by immunoblotting

Following the incubation with the various stimuli, Caco-2/15 cells were homogenized in ice-cold buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na₂VO₄, 1 µg/mL leupeptin, and 1 mM PMSF and prepared for Western blotting. The Bradford assay (Bio-Rad Protein Assay Dye) was used to determine protein concentration. Proteins were denatured in sample buffer containing SDS and β-mercaptoethanol, separated on SDS-PAGE gel, and blotted onto nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites of the membranes were blocked with 5% defatted milk proteins. These membranes were then incubated overnight at 4°C with the specific primary antibodies. After incubation with the relative secondary antibody mouse IgG-POD/rabbit IgG-POD (Roche Diagnostics), immune complexes were revealed using Clarity Max Western ECL substrate (Bio-Rad). Reactive bands were captured using a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). The antibodies and their dilutions are reported in **Supplementary Materials**. All data are expressed as the ratio of target protein over β-actin or GAPDH as housekeeping genes in the same sample.

2.8 Effects of DHPVL and PACs on insulin sensitivity

The phenolic components were added to the cells for 24 h prior to treatment with LPS (100 µg/mL) overnight and tertbutyl (2000 µM) plus insulin (100 nM) for 2h at 37°C. Insulin was added to evaluate insulin signaling.

2.9 Statistical analyses

All values are expressed as the mean ± SEM of at least two different experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test using PRISM 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Effects of PACs and DHPVL on Caco-2/15 cell membrane barrier markers

Previously, we had tested a range of DHPVL concentrations on Caco-2/15 cell viability for 18h. Referring to other studies [28-30], we tested a physiologically realistic concentration range of DHPVL (3; 7.5 and 15 µg/mL) based on the amount of metabolites and conjugates detected in plasma and urine [31]. According to our results and previous data [9], the final concentrations of 7.5 µg/mL DHPVL and 250 µg/mL PACs were used throughout the experiments.

These compounds did not cause cytotoxicity and tight junctions are restored in the presence of PACs and DHPVL (**Figs. 1A-1C**).

3.2 Effects of PACs and DHPVL on lipid peroxidation and endogenous antioxidants

Since the loss of intestinal membrane integrity is accompanied by a fragility of the intestine and greater sensitivity to various harmful stimuli, we decided to look at the markers of oxidative stress and inflammation and verify a potential beneficial effect of phenolic compounds. Consistent with our studies with Fe/Asc [9, 20, 21, 25, 32], pre-treatment with LPS+Tert significantly induced lipid peroxidation as reflected by the large increase of malondialdehyde (**Fig. 2A**). The addition of PACs or DHPVL relieved LPS+Tert-induced lipid peroxidation. In view of these observations, antioxidant defense was investigated in Caco-2/15 cells. The fall of superoxide dismutase and glutathione peroxidase transcript levels, noted in response to LPS +Tertbutyl hydroperoxide, was prevented in the presence of PACs or DHPVL (**Figs. 2B, 2C**). Although there is no statistical difference between controls and LPS-treated cells, protein mass of the two antioxidants is approximately upregulated by phenolic compounds (supplementary data). A trend toward improvement of the expression of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), the master regulator of cellular antioxidant responses, was observed in the presence of PACs or DHPVL, thus favoring cellular redox balance. In fact, PACs displayed the ability to significantly restore the transcript level of NRF2 while the metabolite had no noticeable effect (**Fig. 2D**). Moreover, protein expression levels of NRF2 were re-established by both PACs and DHPVL as revealed by the translational activation of NRF2 estimated by the ratio of NRF2 and Kelch-like ECH-associated

protein 1 (Keap1 (**Fig. 2E**). Keap1 is a negative regulator of NRF2 and a biosensor for oxidative and electrophilic stresses.

Overall, PACs and DHPVL are effective in counteracting LPS+Tert-mediated OxS in intestinal Caco-2/15 cell line.

3.3 Effects of PACs and DHPVL on inflammation and their mechanisms of action

Given the bidirectional relationship between oxidative stress and inflammation and the involvement of both in the loss of intestinal homeostasis, the role of PACs and DHPVL in inflammatory responses was also studied following the confirmation of their antioxidative properties. We first focused on cyclooxygenase-2 (COX-2), the leading promoter of inflammation via the production of prostaglandins. While the expression of COX-2 was enhanced by LPS+Tert, addition of PACs or DHPVL blunted the rise of LPS+Tert-mediated COX-2 expression (**Figs. 3A, 3B**). Additionally, the inducing effect of LPS+Tert on TNF α protein expression was suppressed by the preincubation of Caco-2/15 cells with both phenolic compounds PACs and DHPVL (**Fig. 3C**). Furthermore, we also analysed the protein level of the key transcription factor involved in inflammation. Caco-2/15 cells exposed to LPS+Tert showed increased nuclear factor- κ B (NF- κ B) protein expression which is downregulated by PACs and DHPVL (**Fig. 3D**).

3.4 Effects of PACs and DHPVL on lipid homeostasis

Both oxidative stress and inflammation can affect mitochondria and alter energy metabolism [33]. To test the impact of PACs and DHPVL on intracellular lipid homeostasis, the expression of rate-controlling enzymes of FA β -oxidation, lipogenesis and gluconeogenesis pathways was estimated by RT-qPCR and/or Western blot. LPS+Tert significantly lowered the transcript level of carnitine palmitoyltransferase-1 α (CPT1 α) which was rescued by pre-incubation with PACs and DHPVL (**Fig. 4A**), while there is no change in protein expression (**Fig.4B**). To shed light on the potential mechanisms, we assessed peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator alpha (PGC1 α), two transcription factors necessary for the upregulation of mitochondrial FA β -oxidation. The transcript level and protein mass of PPAR α were of the same trend to that of CPT1 α in response to LPS+Tert and treatment with PACs or DHPVL. In fact, The transcript level and protein mass of PPAR α were

decreased upon treatment with LPS+Tert and rescued in the presence of PACs or DHPVL (**Figs. 4C, 4D**). On the other hand, when analyzing PGC1 α , there is a significant decrease of the protein load in LPS+Tert-treated cells which was prevented by phenolic compounds pre-treatment (**Fig. 4E**).

We subsequently focused on the critical enzymes controlling *de novo* cellular free FA synthesis. As AMP-activated protein kinase alpha (AMPK α) and acetyl-CoA carboxylase (ACC) are central regulators of lipogenesis, we examined their proteins mass and their phosphorylation level to determine their activity. PACs and DHPVL restored transcript level of AMPK α (**Fig. 5A**) while downregulating transcript level of ACC (**Fig. 5B**) as well as its activity through the phosphorylated ACC protein mass as revealed by the value of the ratio (p-ACC/ACC) (**Fig. 5C**). Intriguingly, no significant effect was obtained with the evaluation of the phospho-AMPK/AMPK α ratio. Moreover, in natural sequence, following the upregulation of transcript level of AMPK α (**Fig. 5A**) and the increase in the activity of ACC (**Fig. 5C**), fatty acid synthase (FAS) protein expression was enhanced in the presence of LPS+Tert (**Fig. 5D**). However, PACs and DHPVL lessened its expression probably via the downregulation of the sterol regulatory element binding protein (SREBP)1c transcription factors (**Figs. 5E**). We can notice a relative decrease in the protein expression of this marker in phenolic compounds pretreated-cells (**Fig. 5E**).

We also measured the protein expression of G-6P-ase and PEPCK, which control the gluconeogenesis pathway. As shown in **Fig. 6A and 6B**, while LPS+Tert enhanced their protein mass, PACs and DHPVL took them back to control levels.

3.5 Effects of PACs and DHPVL on insulin sensitivity deriving from insulin signaling pathway

As FA β -oxidation, lipogenesis and gluconeogenesis are regulated by insulin sensitivity, it was reasonable to study insulin signaling through mitogen-activated protein kinases (MAPK)s [p38MAPK, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (AKT)] as well as their phosphorylated forms that reflect their activity level. For this purpose, Caco-2/15 cells were also incubated with insulin during treatments in order to activate the insulin signaling pathway. As expected, LPS+Tert lowered the transcript levels of PI3K and AKT (**Figs. 7A, 7C**). Intriguingly, only PACs were able to restore their gene expression (**Figs. 7A, 7C**) while interestingly both phenolic

compounds, PACs and DHPVL, corrected the phosphorylation rate and increased their activities as revealed by the ratio estimation of p-AKT/AKT and p-PI3K/ PI3K (**Figs. 7B, 7D**), probably via downregulation of p38MAPK (**Figs. 7E, 7F**).

4. Discussion

PACs, as oligomeric or polymeric flavanols, are abundant food-derived bioactive compounds. Given their poor absorption in the small intestine, they can reach the colon in intact form and interact with the intestinal microbiota to be metabolized into various metabolites. During the last decade, accumulated scientific reports suggested that the biological and medicinal actions of flavan-3-ols, including PACs, are mainly executed by their corresponding enteric catabolic products, and in particular, those derived from their colonic microbial metabolism [11, 13, 34, 35]. It is by discovering the properties of polyphenols that the scientific community subsequently realised the paramount importance of their interaction with gut microorganisms [30, 36]. Several metabolomic studies have identified the potential metabolic pathways responsible for the microbial catabolism of PACs, and the corresponding metabolites have been found in human biological fluids [35, 37-41]. These new evidences raise serious questions about the physiological relevance of previous studies, and point to metabolites such as phenyl- γ -valerolactones as the biologically plausible candidates for beneficial metabolic effects attributed to PACs. If considerable information emphasized the health benefits of PACs as a result of intense research, the same cannot be consistently said about PACs metabolites in view of their scarce availability. Largely for this reason, the present study was undertaken to investigate the effectiveness of DHPVL to fight OxS and inflammation in human-derived immortalized Caco-2/15 cell line. Even at very low doses, compared to their PACs precursors, DHPVL was endowed with the potential to strengthen endogenous antioxidant defense and alleviate OxS, decline inflammation, and restore insulin sensitivity, which helps lessen intracellular perturbations of lipid and glucose metabolic pathways by involving critical transcription factors such as PPAR α , PGC1 α and SREBP1c.

No comprehensive studies have yet been performed with the goal of identifying the influence of DHPVL on the gastrointestinal tract, which is of utmost importance for nutrient digestion and absorption while housing microbiota, and harboring neuroendocrine and immune systems [19, 42-44]. A few investigations examined the impact of valerolactones on the human prostate cancer LNCaP cell line [45], brown adipocytes [46], rat skeletal muscle-derived L6 myotube cells [47], neuronal cells [48, 49] and intestinal epithelial IEC-6 cells [50]. However, no assessment of DHPVL effects has been made on the remarkable Caco-2/15 cell line that expresses morphological

and functional characteristics of the mature enterocytes [51] when differentiated. This cellular model is regarded as the most appropriate for the study of lipid/lipoprotein metabolism [21, 22, 52, 53], OxS and inflammation [20, 25, 54-56], and sugar metabolism [21, 57-59]. Our findings provide evidence as to the DHPVL capacity to preserve intestinal integrity and all the more reduce OxS and inflammation, two pivotal processes involved in intestinal and extra-intestinal disorders even with a concentration thirty times less than their metabolic PACs precursors. Interestingly, on a microgram-per-milliliter basis, valerolactones were potent in inhibiting matrix metalloproteinases [60], which significantly contributes to the pathogenesis of various chronic inflammatory and degenerative diseases in response to ROS [61, 62]. Valerolactones could even prevent the release of metalloproteinases from monocytes [60] and OxS caused by H₂O₂ in immortalized brown pre-adipocytes [46]. In our study, we elucidated the mechanisms for the antioxidant and anti-inflammatory effects of DHPVL molecules, and found that they are related to their actions on the NRF-2 and NF- κ B transcription factors. In line with our findings, valerolactones suppressed TNF- α -stimulated transcriptional activation of NF- κ B in human umbilical vein endothelial cells [29].

With regard to small DHPVL concentrations used in the present work, low micromolar concentrations were noted in blood circulation following flavan-3-ols consumption, breakdown by phase II enzymes, and metabolism by the gut microbiota [28, 39, 63]. Similarly, the observed concentrations of valerolactones being associated with vascular effects ranged between low μ M to low nM [40, 63]. Across the studies available, only low μ M concentrations of DHPVL and its conjugated forms were detected in response to the intake of PACs-rich foods [28, 63-65]. Thus, the results of the present work are in excellent agreement with previously published inhibitory concentrations, confirming the validity of our experimental approach.

To our knowledge, this is the first report investigating DHPVL in comparison with its precursors not only for the prevention of redox and inflammation effects, but also for the regulation of metabolic pathways in Caco-2/15 cells. Focusing on FA β -oxidation and lipogenesis, we observed increase of intracellular markers of lipid homeostasis following administration of DHPVL. This metabolite upregulated CPT1 α and downregulated the expression of FAS along with the activation of ACC via its actions on powerful transcription factors PPAR α , PGC-1 α and SREBP1c.

The effects of DHPVL on intracellular lipid metabolism cannot be compared with data in the literature, which has not addressed this issue so far. In a study in adipose tissue cells, DHPVL works by inhibiting lipogenesis, thereby lessening intracellular lipid content [66]. Similarly, resveratrol metabolites and urolithin, a gut microbiota-derived ellagitannin metabolite, were found to constitute anti-steatotic molecules as they contribute to delipidating effects of mouse AML12 hepatocytes and diet-induced obesity rat model [67, 68]. Though it was not determined whether DHPVL primarily bound to the outer cell membrane or is absorbed into the cells, it may be suggested that DHPVL will be more easily and rapidly taken up into the cells or has a high-capacity binding to the cells thanks to its low molecular weight in comparison to polymeric PACs. This can explain the highly preventive effectiveness of the metabolite at a significantly low concentration in comparison to the precursor. Several studies have clearly proposed that exceedingly condensed PACs cannot be absorbed at their native form but can exert their beneficial actions through interactions with cell membranes [10]. These interactions with membrane lipids and proteins could mediate some biological effects of PACs, showing that many of these condensed compounds induce a cell response despite the fact that they are not internalized.

Taken together, these data suggest that the prophylactic effects against metabolic disorders attributed to PACs, cranberry extracts or flavan-3-ols-rich supplements might be reasonably mediated by their metabolites, including DHPVL, which is significantly increased in plasma after cranberry/PACs-rich food consumption. Additionally, our results are in agreement with the earlier reports on the beneficial health effects of phenolic metabolites such as DHPVL in several *in vivo* studies [17, 30]. A double-blind randomized controlled crossover trial showed that polyphenols in cranberry juice can improve vascular function in healthy males and this beneficial effect correlated with the presence of specific phenolic metabolites including phenyl-valerolactones in the plasma [63]. However, our study has limitations. The experiments were performed with human intestinal Caco-2/15 cells, which raises the question of transferability to human systems. Further investigations are required to fully understand the mechanisms underlying the role of DHPVL as the mediator of PACs beneficial effects. Similarly, efforts should be addressed to understanding how inter-individual variability in the production of phenyl- γ -valerolactones may impact on CMD prevention [69]. Our future experiments will be directed to determine the

mechanisms of DHPVL absorption at the intestine level, and to present a basic understanding in DHPVL pharmacokinetics. We are also willing to understand the fate of phenolic metabolites as we found that DHPVL is subject to further intracellular metabolism reactions after being taken up into Caco-2/15 cells.

Acknowledgement

The present work was supported by the JA deSève Research Chair in nutrition (EL), the Government of Canada through Genome Canada and the Ontario Genomics Institute (OGI-149) (AS, EL) and the NSERC-Diana Food Industrial Chair on prebiotic effects of polyphenols (401240871) (YD, EL).

REFERENCES

1. Andriantsitohaina, R., et al., Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr*, 2012. **108**(9): p. 1532-49.
2. Spagnuolo, C., et al., Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. **1259**: p. 95-103.
3. Sun, A.Y., et al., Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol*, 2010. **41**(2-3): p. 375-83.
4. de Freitas, V. and N. Mateus, Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J Agric Food Chem*, 2001. **49**(2): p. 940-5.
5. Aron, P.M. and J.A. Kennedy, Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Mol Nutr Food Res*, 2008. **52**(1): p. 79-104.
6. Nichols, J.A. and S.K. Katiyar, Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res*, 2010. **302**(2): p. 71-83.
7. Sano, A., Safety assessment of 4-week oral intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract in healthy subjects. *Food Chem Toxicol*, 2017. **108**(Pt B): p. 519-523.
8. Bladé, C., et al., Proanthocyanidins in health and disease. *Biofactors*, 2016. **42**(1): p. 5-12.
9. Koudoufio, M., et al., Intestinal protection by proanthocyanidins involves anti-oxidative and anti-inflammatory actions in association with an improvement of insulin sensitivity, lipid and glucose homeostasis. *Sci Rep*, 2021. **11**(1): p. 3878.
10. Erlejman, A.G., C.G. Fraga, and P.I. Oteiza, Procyanidins protect Caco-2 cells from bile acid- and oxidant-induced damage. *Free Radic Biol Med*, 2006. **41**(8): p. 1247-56.
11. Clifford, M.N., J.J. van der Hooft, and A. Crozier, Human studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of tea polyphenols. *Am J Clin Nutr*, 2013. **98**(6 Suppl): p. 1619s-1630s.
12. Del Rio, D., et al., Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(14): p. 1818-92.

13. Sanchez-Patan, F., et al., Synthesis, analytical features, and biological relevance of 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone, a microbial metabolite derived from the catabolism of dietary flavan-3-ols. *J Agric Food Chem*, 2011. **59**(13): p. 7083-91.
14. Ou, K., et al., Microbial catabolism of procyanidins by human gut microbiota. *Mol Nutr Food Res*, 2014. **58**(11): p. 2196-205.
15. Neilson, A.P., S.F. O'Keefe, and B.W. Bolling, High-Molecular-Weight Proanthocyanidins in Foods: Overcoming Analytical Challenges in Pursuit of Novel Dietary Bioactive Components. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2016. **7**: p. 43-64.
16. Gan, R.Y., et al., Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018. **58**(6): p. 924-941.
17. Luca, S.V., et al., Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020. **60**(4): p. 626-659.
18. Schauer, P.R., et al., Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy for Diabetes — 5-Year Outcomes. *New England Journal of Medicine*, 2017. **376**(7): p. 641-651.
19. Anhê, F.F., et al., A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*, 2015. **64**(6): p. 872-83.
20. Denis, M.C., et al., Prevention of oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction in the intestine by different cranberry phenolic fractions. *Clin Sci (Lond)*, 2015. **128**(3): p. 197-212.
21. Foisy-Sauvé, M., et al., Glycomacropeptide Prevents Iron/Ascorbate-Induced Oxidative Stress, Inflammation and Insulin Sensitivity with an Impact on Lipoprotein Production in Intestinal Caco-2/15 Cells. *Nutrients*, 2020. **12**(4).
22. Sane, A.T., et al., Understanding Chylomicron Retention Disease Through *Sar1b* Gtpase Gene Disruption: Insight From Cell Culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. **37**(12): p. 2243-2251.
23. Harmel, E., et al., AMPK in the small intestine in normal and pathophysiological conditions. *Endocrinology*, 2014. **155**(3): p. 873-88.

24. Levy, E., et al., PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells. *Atherosclerosis*, 2013. **227**(2): p. 297-306.
25. Denis, M.C., et al., Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e53725.
26. Marcil, V., et al., Modification in oxidative stress, inflammation, and lipoprotein assembly in response to hepatocyte nuclear factor 4alpha knockdown in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*, 2010. **285**(52): p. 40448-60.
27. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
28. Ottaviani, J.I., et al., The metabolome of [2-(14)C](-)-epicatechin in humans: implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 29034.
29. Lee, C.C., et al., 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl-gamma-valerolactone), a Major Microbial Metabolite of Proanthocyanidin, Attenuates THP-1 Monocyte-Endothelial Adhesion. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(7).
30. Mena, P., et al., Phenyl-gamma-valerolactones and phenylvaleric acids, the main colonic metabolites of flavan-3-ols: synthesis, analysis, bioavailability, and bioactivity. *Nat Prod Rep*, 2019. **36**(5): p. 714-752.
31. Lee, C.C., et al., 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl-gamma-valerolactone), a Major Microbial Metabolite of Proanthocyanidin, Attenuates THP-1 Monocyte-Endothelial Adhesion. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(7).
32. Yara, S., et al., Iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation causes epigenetic changes in the antioxidant defense in intestinal epithelial cells: impact on inflammation. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63456.
33. Bhatti, J.S., G.K. Bhatti, and P.H. Reddy, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2017. **1863**(5): p. 1066-1077.

34. Appeldoorn, M.M., et al., Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone as the major metabolites. *J Agric Food Chem*, 2009. **57**(3): p. 1084-92.
35. Monagas, M., et al., Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct*, 2010. **1**(3): p. 233-53.
36. Déprez, S., et al., Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J Nutr*, 2000. **130**(11): p. 2733-8.
37. Del Rio, D., et al., Bioavailability of catechins from ready-to-drink tea. *Nutrition*, 2010. **26**(5): p. 528-33.
38. Calani, L., et al., Updated bioavailability and 48 h excretion profile of flavan-3-ols from green tea in humans. *Int J Food Sci Nutr*, 2012. **63**(5): p. 513-21.
39. Feliciano, R.P., et al., Plasma and Urinary Phenolic Profiles after Acute and Repetitive Intake of Wild Blueberry. *Molecules*, 2016. **21**(9).
40. Feliciano, R.P., et al., Identification and quantification of novel cranberry-derived plasma and urinary (poly)phenols. *Arch Biochem Biophys*, 2016. **599**: p. 31-41.
41. van der Hooft, J.J., et al., Structural elucidation and quantification of phenolic conjugates present in human urine after tea intake. *Anal Chem*, 2012. **84**(16): p. 7263-71.
42. Levy, E., Insights from human congenital disorders of intestinal lipid metabolism. *J Lipid Res*, 2015. **56**(5): p. 945-62.
43. Bujko, A., et al., Transcriptional and functional profiling defines human small intestinal macrophage subsets. *J Exp Med*, 2018. **215**(2): p. 441-458.
44. Drucker, D.J., The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 24-32.
45. Stanisławska, I.J., et al., The Activity of Urolithin A and M4 Valerolactone, Colonic Microbiota Metabolites of Polyphenols, in a Prostate Cancer In Vitro Model. *Planta Med*, 2019. **85**(2): p. 118-125.

46. Mele, L., et al., Phenyl- γ -valerolactones, flavan-3-ol colonic metabolites, protect brown adipocytes from oxidative stress without affecting their differentiation or function. *Mol Nutr Food Res*, 2017. **61**(9).
47. Takagaki, A., et al., Effects of Microbial Metabolites of (-)-Epigallocatechin Gallate on Glucose Uptake in L6 Skeletal Muscle Cell and Glucose Tolerance in ICR Mice. *Biol Pharm Bull*, 2019. **42**(2): p. 212-221.
48. Unno, K., et al., Blood-Brain Barrier Permeability of Green Tea Catechin Metabolites and their Neurotogenic Activity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Mol Nutr Food Res*, 2017. **61**(12).
49. Cecarini, V., et al., Flavan-3-ol Microbial Metabolites Modulate Proteolysis in Neuronal Cells Reducing Amyloid-beta (1-42) Levels. *Mol Nutr Food Res*, 2021. **65**(18): p. e2100380.
50. Dai, L., et al., Angiopoietin-2 silence alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation, barrier dysfunction and endoplasmic reticulum stress of intestinal epithelial cells by blocking Notch signaling pathway. *Bioengineered*, 2021.
51. Levy, E., M. Mehran, and E. Seidman, Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J*, 1995. **9**(8): p. 626-35.
52. Grenier, E., et al., Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion, and apolipoprotein biogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **293**(6): p. G1178-89.
53. Sane, A.T., et al., Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res*, 2006. **47**(10): p. 2112-20.
54. Levy, E., et al., Biological role, protein expression, subcellular localization, and oxidative stress response of paraoxonase 2 in the intestine of humans and rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **293**(6): p. G1252-61.
55. Bernotti, S., et al., Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003. **285**(5): p. G898-906.

56. Precourt, L.P., et al., Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(7): p. 1628-37.
57. Salomon, R., et al., Caco-2 cell disaccharidase activities are unaffected by gestational hormones. *Can J Physiol Pharmacol*, 1996. **74**(10): p. 1126-31.
58. Ravid, Z., et al., Modulation of intestinal cholesterol absorption by high glucose levels: impact on cholesterol transporters, regulatory enzymes, and transcription factors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **295**(5): p. G873-85.
59. Grenier, E., et al., Role of the apical and basolateral domains of the enterocyte in the regulation of cholesterol transport by a high glucose concentration. *Biochem Cell Biol*, 2013. **91**(6): p. 476-86.
60. Grimm, T., A. Schäfer, and P. Högger, Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol). *Free Radic Biol Med*, 2004. **36**(6): p. 811-22.
61. Rajagopalan, S., et al., Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*, 1996. **98**(11): p. 2572-9.
62. Yoo, H.G., et al., IL-1beta induces MMP-9 via reactive oxygen species and NF-kappaB in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **298**(2): p. 251-6.
63. Rodriguez-Mateos, A., et al., Cranberry (poly)phenol metabolites correlate with improvements in vascular function: A double-blind, randomized, controlled, dose-response, crossover study. *Mol Nutr Food Res*, 2016. **60**(10): p. 2130-2140.
64. Urpi-Sarda, M., et al., Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2009. **1216**(43): p. 7258-67.
65. Li, C., et al., Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion. *Chem Res Toxicol*, 2000. **13**(3): p. 177-84.

66. Lee, Y., et al., 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone, a metabolite of procyanidins in cacao, suppresses MDI-induced adipogenesis by regulating cell cycle progression through direct inhibition of CDK2/cyclin O. *Food Funct*, 2019. **10**(5): p. 2958-2969.
67. Trepiana, J., et al., Resveratrol Metabolites Are Able to Reduce Steatosis in Cultured Hepatocytes. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020. **13**(10).
68. Abdulrahman, A.O., et al., Urolithins Attenuate Multiple Symptoms of Obesity in Rats Fed on a High-Fat Diet. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020. **13**: p. 3337-3348.
69. Mena, P., et al., Metabotypes of flavan-3-ol colonic metabolites after cranberry intake: elucidation and statistical approaches. *Eur J Nutr*, 2021.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Cranberry PACs and their metabolites (3',5'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone protect intestinal integrity and prevent lipid peroxydation in LPS+tertbutyl treated Caco-2/15 cells. Cranberry purified extract rich in proanthocyanidins (PACs, 250µg/ml) or 5-(3',5'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone (DHPVL, 7.5µg/mL) were added to the cells for 24h prior to the treatment with LPS (100 µg/mL) overnight and tertbutyl (2000 µM) for 2h at 37°C. The fold changes in mRNA levels of occludin (A), claudin (B) and Zonula occludens 1 (ZO1) (C) in Caco-2/15 cells were determined by RT-qPCR method. Results represent the means ± SEM of at least 2 independent experiments, each in triplicate. **p<0.01; ****p<0.0001vs controls (ctrl). #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001vs LPS+tertbutyl (LPS+tert) treated cells.

Figure 2. Cranberry PACs and their metabolites (3',5'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone alleviate oxidative stress by modulating NRF2/Keap 1 pathway. Cranberry proanthocyanidins (PACs, 250µg/ml) or 5-(3',5'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone (DHPVL, 7.5µg/mL) were added to the cells for 24h prior to the treatment with LPS (100 µg/mL) overnight and tertbutyl (2000 µM) for 2h at 37°C. Lipid peroxidation was determined by measuring the MDA by HPLC (A). The fold changes in mRNA levels of antioxidant enzymes SOD2 (B), GPx(C) and the key transcription factor NRF2 (D) in Caco-2/15 cells were determined by RT-qPCR method. Protein expression of NRF2 and its negative regulator Keap 1 were determined by Western blot as well. The ratio NRF2/Keap 1 was calculated conjointly (E). Results represent the means ± SEM of at least 2 separate experiments, each in triplicate. A representative Western blot is shown, illustrating an experiment in triplicate on the same gel and with the same exposure. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001vs controls (ctrl). #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001vs LPS+tertbutyl (LPS+Tert) treated cells.

Figure 3. Cranberry PACs and their metabolites (3',5'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone mitigate inflammatory response through the regulation of the key transcription factor NF-kB in LPS+Tertbutyl induced inflammation in Caco-2/15 cells. Cranberry proanthocyanidins (PACs, 250µg/ml) or 5-(3',5'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone (DHPVL, 7.5µg/mL) were added to the cells for 24h prior to the treatment with LPS (100 µg/mL) overnight

and tertbutyl (2000 μ M) for 2h at 37°C. The fold changes in mRNA levels of inflammatory cytokines COX2 (A) in Caco-2/15 cells were estimated by RT-qPCR method. Protein expression of inflammatory markers COX-2 (B), and TNF α (C) were assayed by Western blot. The protein expression of the transcription factor NF-kB (C) was also determined by Western-blot. Results represent the means \pm SEM of at least 2 individual experiments, each in triplicate. A representative Western blot is shown, exhibiting an experiment in triplicate on the same gel and with the same exposure. **p<0.01; ***p<0.001vs controls (ctrl). #p<0.05; ###p<0.001 vs LPS+tertbutyl (LPS+Tert) treated cells.

Figure 4. Effects of cranberry PACs and their metabolites (3',5'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone on β -oxidation markers in Caco-2/15. Cranberry proanthocyanidins (PACs, 250 μ g/ml) or 5-(3',5'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone (DHPVL, 7.5 μ g/mL) were supplemented to the cells for 24h prior to the treatment with LPS (100 μ g/mL) overnight and tertbutyl (2000 μ M) for 2h at 37°C. The fold changes in mRNA levels of CPT1 α (A) and PPAR α (C) in Caco-2/15 cells were settled by RT-qPCR method. The protein expression of specific markers of β -oxidation CPT1 α (B), PPAR α (D) and the key transcription factor PGC1 α (E) were resolved by Western-blot. Results represent the means \pm SEM of at least 2 isolated experiments, each in triplicate. A representative Western blot is shown, displaying an experiment in triplicate on the same gel and with the same exposure. *p<0.05; **p<0.01vs controls (ctrl). #p<0.05; ##p<0.01vs LPS+tertbutyl (LPS+Tert) treated cells.

Figure 5. Effects of cranberry PACs and their metabolites (3',5'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone on lipogenesis markers in Caco-2/15. Cranberry proanthocyanidins (PACs, 250 μ g/ml) or 5-(3',5'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone (DHPVL, 7.5 μ g/mL) were added to the cells for 24h prior to the treatment with LPS (100 μ g/mL) overnight and tertbutyl (2000 μ M) for 2h at 37°C. The fold changes in mRNA levels of AMPK α (A) and ACC (B) in Caco-2/15 cells were rated by RT qPCR method. The protein expression of specific markers of lipogenesis phospho-ACC/ACC (C), FAS (D) and SREBP1C (E) were estimated by Western blot. Results represent the means \pm SEM of at least 2 distinct experiments, each in triplicate. A representative Western blot is shown, representing an experiment in triplicate on the same gel and with the same exposure.

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 vs controls (ctrl). #p<0.05; ##p<0.01vs LPS+tertbutyl (LPS+Tert) treated cells.

Figure 6. Impacts of cranberry PACs and DHPVL on neoglucogenesis markers in Caco-2/15 cells. Proanthocyanidins (PACs, 250 µg/mL) or 5-(3',5'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone (DHPVL, 7.5µg/mL) were introduced to the cells for 24 h prior to treatment with LPS (100 µg/mL) overnight and tertbutyl (2000 µM) for 2h at 37°C. The protein expression of specific markers of neoglucogenesis G-6-Pase (A), and PEPCk (B) were assayed by Western-blot. Results represent the means ± SEM of at least 2 different experiments, each in triplicate. A representative Western blot is shown, depicting an experiment in triplicate on the same gel and with the same exposure. ***p<0.001vs controls (ctrl). #P < 0.05; ##p<0.01vs LPS+tertbutyl (LPS+Tert) treated cells.

Figure 7. Effects of cranberry PACs and their metabolites (3',5'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone on insulin sensitivity markers in Caco-2/15. Cranberry purified extract rich in proanthocyanidins (PACs, 250µg/ml) or 5-(3',5'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone (DHPVL, 7.5µg/mL) were added to the cells for 24h prior to treatment with LPS (100 µg/mL) overnight and tertbutyl (2000 µM) plus insulin (100 nM) for 2h at 37°C. The fold changes in mRNA levels of PI3K (A), Akt(C), and P38-MAPk (E) in Caco-2/15 cells were appraised by RT-qPCR method. The protein expression of insulin signalisation PI3k, phospho-PI3k, Akt, phospho-Akt and P38-MAPk, phospho-P38-MAPk were examined by Western blot. The ratios phospho-PI3k/PI3k (B), phospho-Akt/Akt (D) and phospho P38-MAPk/P38-MAPk (F) were calculated. Results represent the means ± SEM of at least two specific experiments in triplicates. *p<0.05 vs controls (ctrl). ##p<0.01vs LPS+tertbutyl (LPS+Tert) Caco-2/15cells treated with insulin.

Figure 1

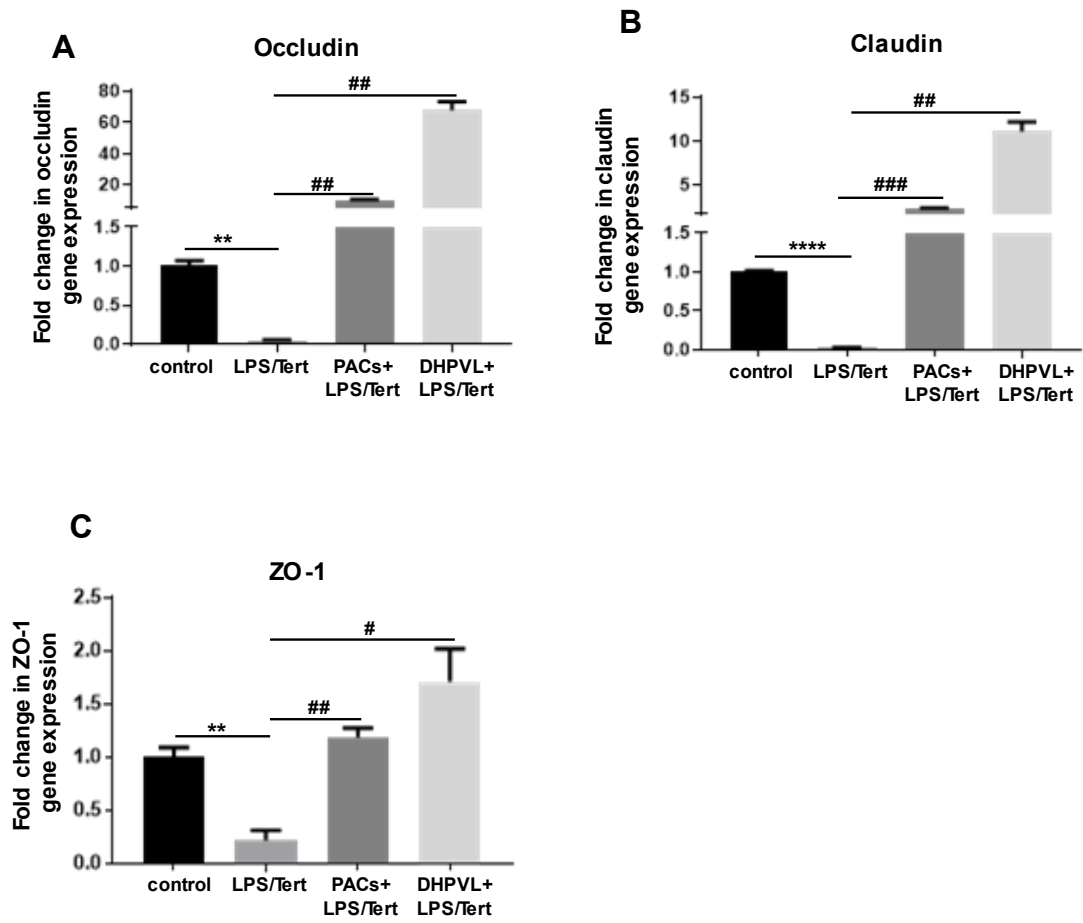


Figure 2
A

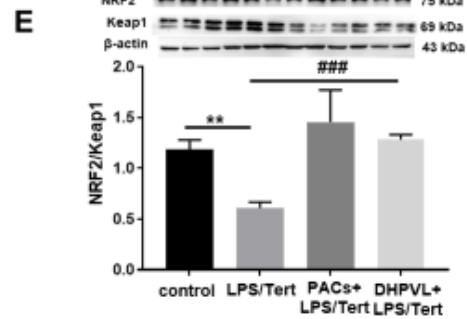
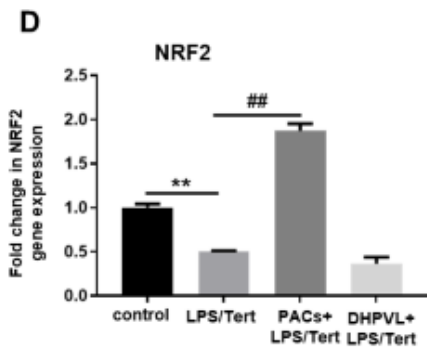
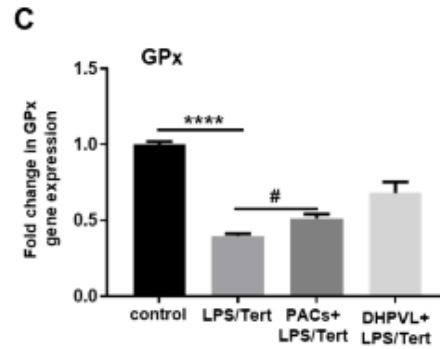
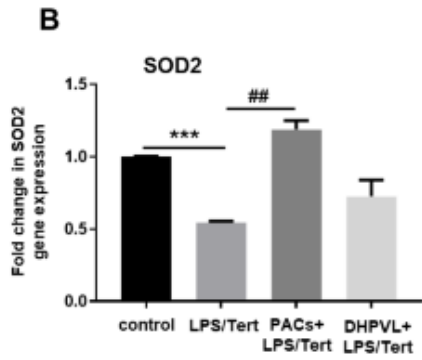
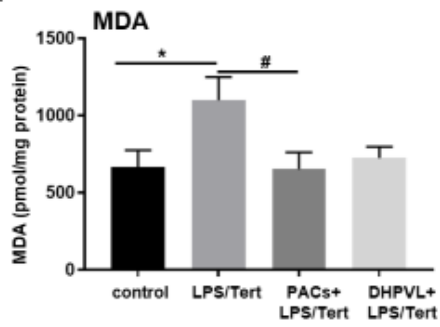


Figure 3

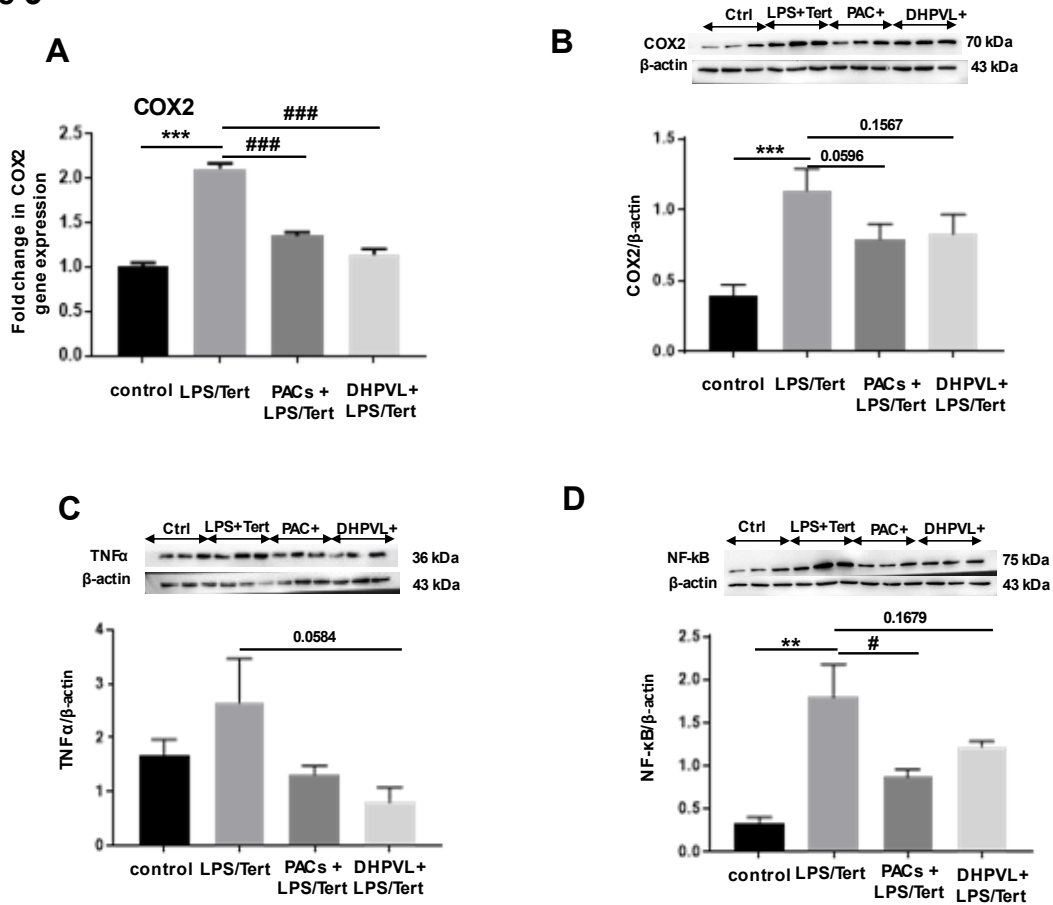


Figure 4

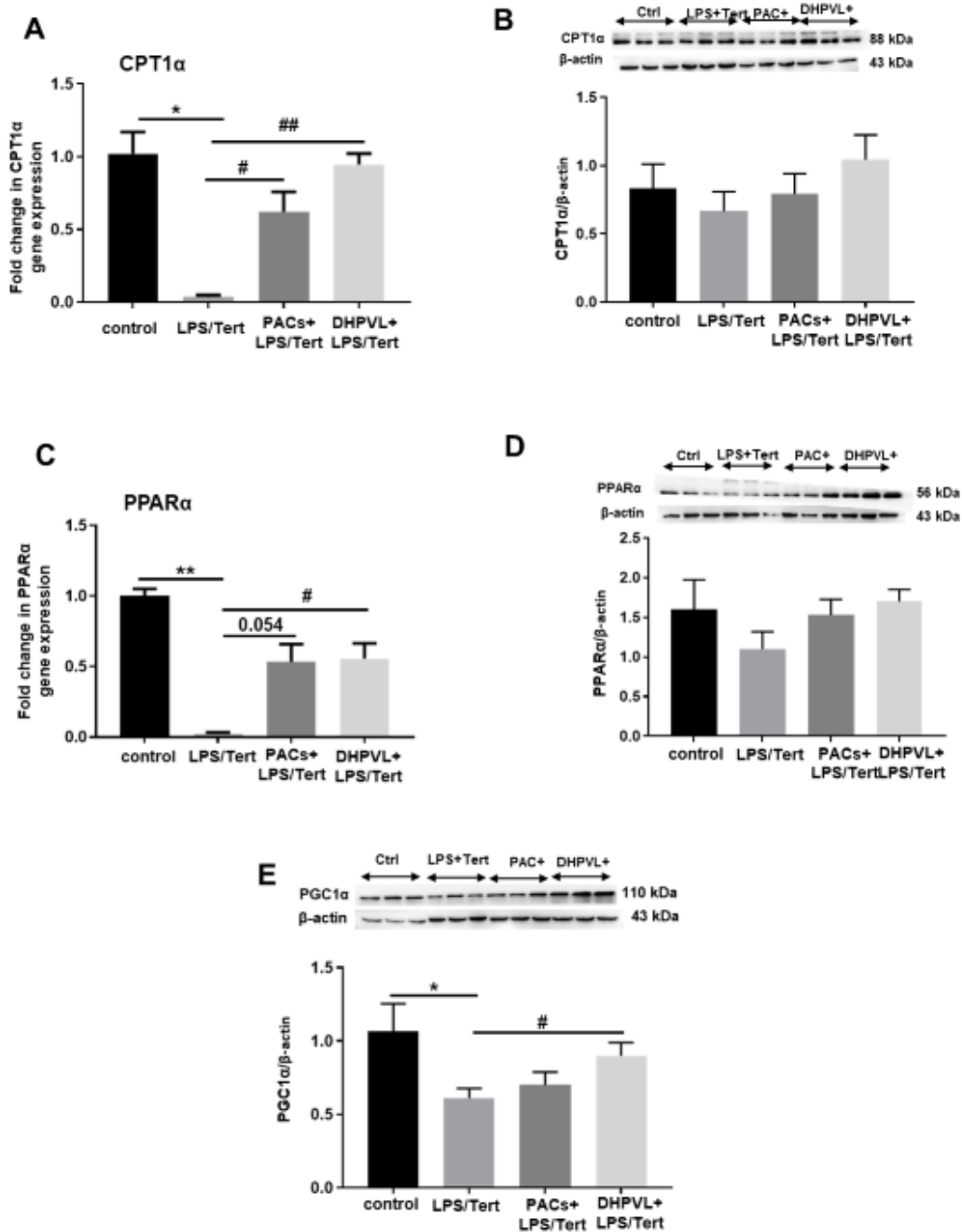


Figure 5

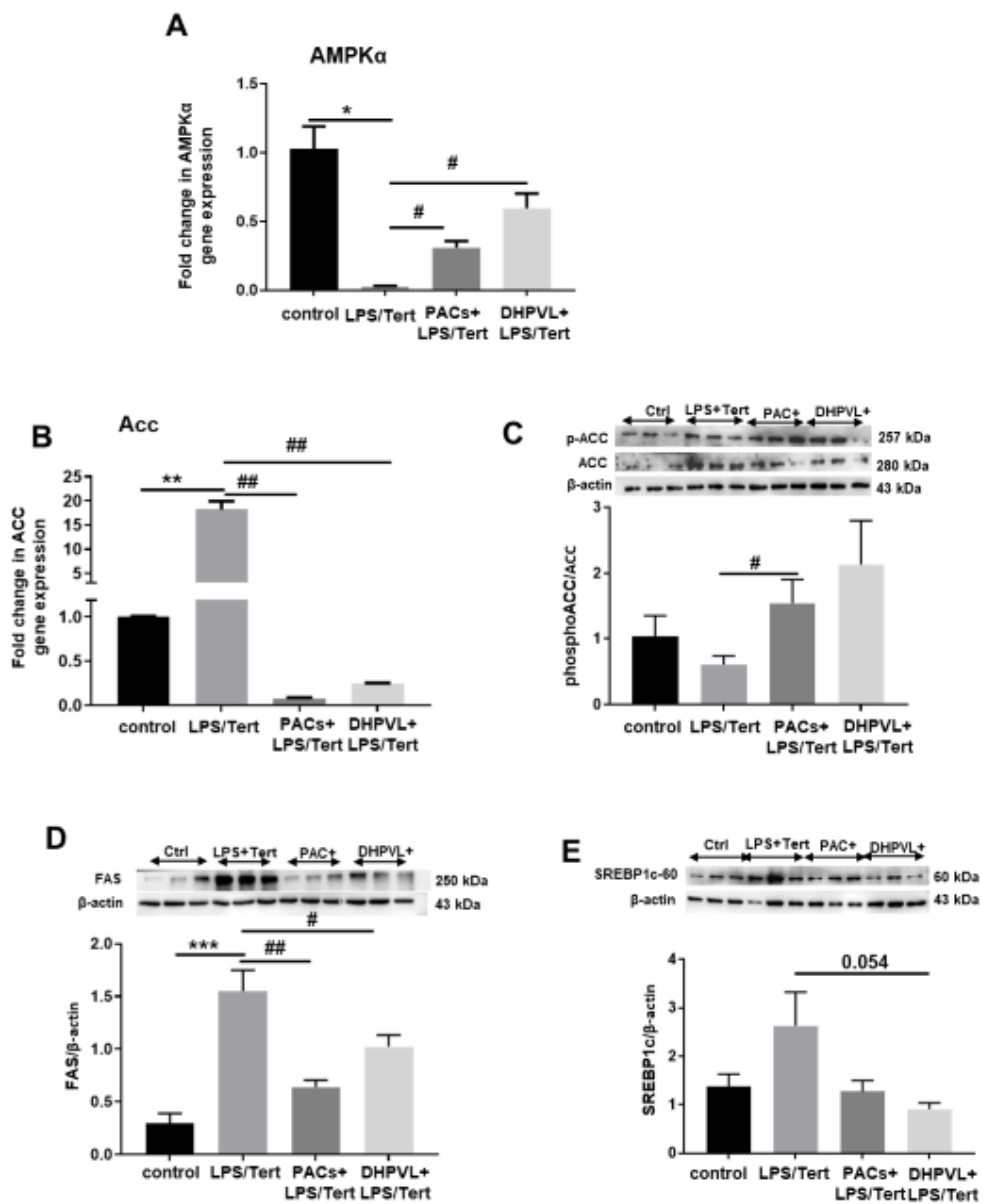


Figure 6

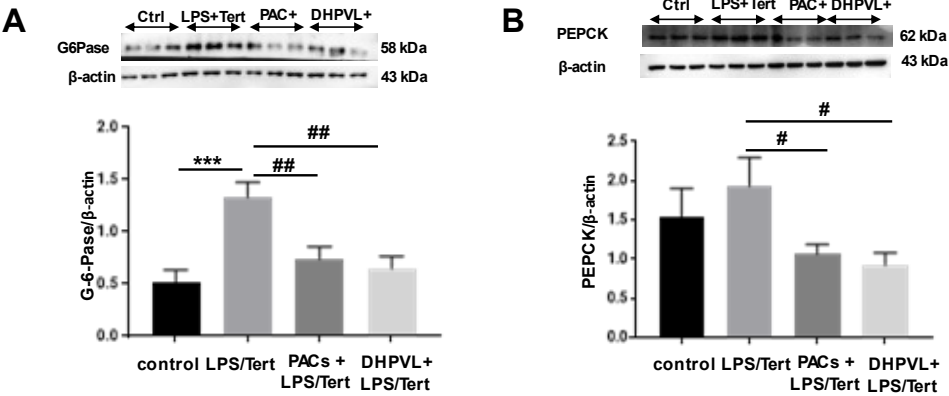
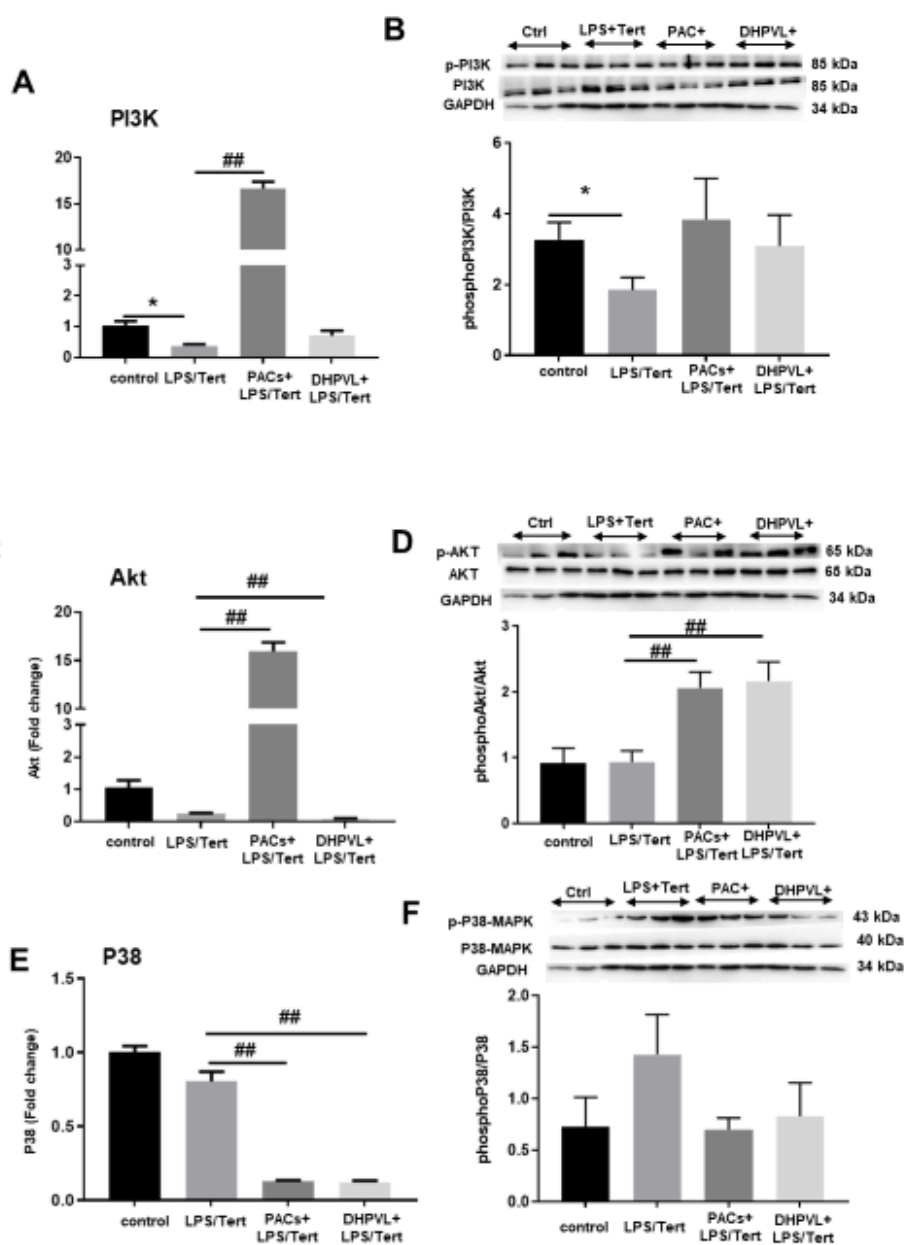


Figure 7



Chapitre 6 – Discussions et conclusions

Discussion

Les PP sont bien connus pour leurs effets biologiques et médicinaux pléiotropiques, ce qui explique l'attrait de la communauté scientifique et des industries alimentaires pour ces fascinants produits naturels d'origine végétale. Les fruits et légumes constituent des sources appréciables de composés phytochimiques exhibant des bienfaits potentiels pour la santé. Parmi les fruits riches en PP, on retrouve les canneberges, avec une teneur élevée en PACs et en procyanidines de type A qui suscitent un grand intérêt. Ce fruit rentre de plus en plus dans les habitudes de consommation des Canadiens, compte tenu des nombreuses évidences scientifiques concernant ses effets bénéfiques sur la santé, et le Canada en est le deuxième plus gros producteur au monde. Nous avons choisi d'utiliser des extraits de canneberge, comme source de PP, car leur capacité antioxydante s'est mieux classée que plusieurs fruits comme les abricots, les figues, les pruneaux et les raisins secs, ainsi que parmi les boissons riches en polyphénols telles que le thé vert et le vin rouge [673-675]. En fait, les canneberges ont le contenu antioxydant le plus élevé de tous les fruits en poids frais [673-675].

Dans le présent projet de recherche, nous avons étudié le rôle des PACs à travers une fraction purifiée et leur composition (encore mal caractérisée dans la littérature) était caractérisée par spectrométrie de masse en collaboration avec le Dr Desjardins. Une dose de 200 mg/kg est administrée quotidiennement par gavage à des souris. À noter que cette posologie a été utilisée avec succès dans nos études précédentes employant des souris C57BL/6 [672, 676, 677]. Pour obtenir la dose humaine équivalente (DHE), on fait une extrapolation allométrique simple en utilisant l'équation du guide de conversion de la FDA basé sur la surface corporelle [678].

En faisant rapidement le calcul, la quantité de 200 mg/kg correspond à 16 mg/kg chez l'humain et pour un sujet de 60 kg, il va falloir donc consommer 960 mg de PP/jour. Les quantités maximales de PACs évaluées dans certaines espèces de canneberges sont d'environ 1283 mg/100 g (espèce Howes par exemple). Ainsi, la dose est équivalente à environ 75 g de canneberges fraîches consommées quotidiennement par un sujet humain de 60 kg. Il s'agit de quantités atteignables *in*

vivo. Cependant, il faut noter que les fruits ne contiennent pas que des PP mais un amalgame de fibres, de vitamines, de minéraux, de métabolites secondaires et de sucres entre autres. Il faut donc retenir que contrairement aux extraits purifiés de PACs où il y a une spécification des effets, la consommation de canneberges pour des effets bénéfiques fera intervenir indéniablement soit une synergie, soit un antagonisme d'actions entre les PACs, d'autres PP, les vitamines, les fibres et d'autres métabolites.

Par ailleurs, dans le souci d'utiliser une dose physiologique dans les cultures cellulaires, nous avons basé nos calculs sur la consommation estimée à ~ 1g de PP/jour que l'on retrouve dans la diète occidentale [679]. Étant donné que le volume approximatif du côlon où se fait l'absorption des PACs peut aller jusqu'à 3.9 litres, nous avons estimé que les entérocytes étaient exposés à une concentration de 250 µg/mL et même une concentration plus élevée est possible. Nous pensons donc que notre choix d'utiliser une concentration de 250 µg/mL pour les études *in vitro* des volets 1 et 3 expérimentaux de ce programme scientifique est justifié et que cette concentration est physiologiquement représentative de ce qui est possiblement retrouvé au niveau intraluminal du côlon [680].

Malgré les caractéristiques remarquables des PP, il reste encore beaucoup d'inconnues sur leurs effets au niveau du tractus gastro-intestinal qui déploie des réseaux digestifs, immunologiques, neuronaux et métagénomiques. Pour cette raison, des efforts ont été consacrés dans la présente étude pour clarifier le rôle des PACs dans les désordres métaboliques, principalement en lien avec l'implication du système intestinal et de l'organe hépatique.

Notre projet vise à étudier les effets bénéfiques des PACs dans le maintien de l'homéostasie métabolique intestinale et hépatique, avec l'objectif de comprendre les mécanismes d'action sous-jacents. En outre, en raison de ses fonctions majeures et ses diverses interactions avec d'autres tissus, une perte de l'homéostasie métabolique au niveau de l'intestin entraînerait probablement des répercussions sur l'état de santé et le fonctionnement d'autres organes, notamment le foie. Cela peut conduire à l'émergence de plusieurs pathologies dont les MAFLD. Nous avons par conséquent également évalué les effets des PACs sur la prévention des MAFLD.

Impacts des PACs dans le maintien de la santé métabolique intestinale

Dans une première étape, des efforts substantiels ont été déployés à l'évaluation du rôle des PACs dans le SOx et l'inflammation, les deux processus influençant le développement de la RI qui se trouve au cœur du SM. À cette fin, une attention particulière a été accordée à l'intestin en prenant comme modèle la lignée cellulaire Caco-2/15. Dans cette partie, le projet a été conçu de manière à étudier les mécanismes qui sous-tendent les effets bénéfiques des PACs de canneberges dans le maintien de l'homéostasie métabolique intestinale.

Les cellules Caco-2/15 sont propices pour l'investigation de l'absorption et le transport intestinal de plusieurs nutriments, particulièrement les lipides, leur assemblage avec les apolipoprotéines, et leur sécrétion sous forme de lipoprotéines [681, 682]. Elles constituent également un outil de choix pour l'investigation du SOx, la défense antioxydante et l'inflammation [683] en relation directe avec nos propres objectifs. Puisque l'Intestin est finalement reconnu pour être sensible à l'insuline, le deuxième but de cette première étude consistait à scruter les effets des PACs sur la sensibilité à l'insuline et conséquemment sur l'homéostasie du glucose et des lipides dans le modèle Caco-2/15 [684-686].

Le SOx a été induit dans les cellules Caco-2/15 par une incubation avec le complexe fer/ascorbate, un système efficace pour la production de radicaux d'oxygène et de lipides peroxydés comme rapporté à de nombreuses reprises dans les travaux de notre laboratoire [683, 687-690]. L'ajout de l'acide ascorbique permet d'amplifier le potentiel oxydatif du fer [688]. Le SOx et l'inflammation ayant des relations de causalité, le traitement des cellules avec ce complexe induit également une réponse pro-inflammatoire.

Les résultats de notre étude démontrent clairement que l'application du complexe fer/ascorbate sur les cellules Caco-2/15 a bien déclenché une peroxydation lipidique considérable comme en témoigne la production notable de MDA témoignant donc de la présence de SOx. De plus, ce complexe a perturbé l'équilibre entre les antioxydants endogènes (SOD, GPx) et les pro-oxydants, conduisant à une détérioration évidente des défenses antioxydantes. Également, le traitement des cellules avec ce complexe a déclenché une réponse pro-inflammatoire, caractérisée par une augmentation de l'expression protéique de l'enzyme COX-2 et de la cytokine TNF- α , toutes deux

pro-inflammatoires. Cette réponse inflammatoire a été médiée via la modulation de la voie de signalisation majeure NF- κ B/I κ B, le facteur de transcription NF- κ B étant un des plus robustes régulateurs de nombreux gènes codant des protéines inflammatoires. Notamment, la supplémentation en PACs a significativement atténué la peroxydation lipidique en renforçant la défense antioxydante endogène.

Dans nos travaux, nous constatons que l'un des mécanismes sous-jacents associé au renforcement de la défense antioxydante a impliqué le facteur de transcription NRF2 et son régulateur Keap1 qui, généralement, coordonne la réponse antioxydante par sa liaison aux sites ARE sur le promoteur des gènes antioxydants afin d'activer leur transcription. L'ajout de PACs à notre modèle cellulaire a certainement permis au facteur NRF2 d'échapper à la dégradation protéasomique médiée par Keap-1, et de converger au noyau où il a induit l'expression génique d'une série de protéines antioxydantes et cytoprotectives comme la SOD et la GPx. Le prétraitement avec les PACs a également permis de prévenir l'inflammation avec notamment une diminution de la réponse pro-inflammatoire (diminution de l'expression protéique de COX-2 et TNF- α) en limitant le facteur de transcription NF- κ B. Étant donné que le SOx et l'inflammation sont des mécanismes clés sous-tendant plusieurs autres désordres métaboliques tels que la RI, il nous a semblé raisonnable d'évaluer l'impact potentiel des PACs sur la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie du glucose et des lipides.

Effectivement, les PACs ont amélioré la sensibilité à l'insuline en régulant la voie de signalisation de PI3k/Akt. En outre, l'ajout de PACs a réduit la lipogenèse et favorisé la β -oxydation, se traduisant par une diminution de FAS d'un côté et une prévention de l'activation de l'enzyme ACC, et une augmentation de CPT1 α de l'autre.

Les PACs ont également réduit la synthèse de novo du glucose, se manifestant par une diminution de l'expression protéique de la G6Pase et de la PEPCK.

Nos résultats s'alignent avec ceux de la littérature qui mettent en évidence les effets métaboliques bénéfiques des composés phénoliques, notamment les PACs dans des études *in vitro* [341, 691-694]. Les propriétés antioxydantes des PP de pomme ont également été documentées dans les cellules intestinales Caco-2 [695]. Erlejan et ses collaborateurs ont

rapporté les effets protecteurs des PACs dans les cellules Caco-2 dans des conditions de cytotoxicité. En effet, il a été signalé que les PACs améliorent l'intégrité membranaire des cellules, les préservant ainsi du SOx [691].

Il est incontestable que l'une des raisons motivant l'utilisation des PACs dans ce projet réside dans leur grande taille moléculaire. Cependant, une interrogation légitime pourrait émerger quant à la manière dont les PACs qui ne peuvent être absorbés par les cellules caco-2 parviennent à induire ces effets avantageux et à réguler l'expression des différents marqueurs étudiés. Les interactions entre les lipides et les protéines membranaires pourraient être à l'origine de certains effets biologiques des oligomères et polymères de PP, tels que les PACs. Cette dynamique mécanistique a été suggérée à la suite d'observations concordantes indiquant que bon nombre de ces composés déclenchent une réponse cellulaire malgré leur incapacité à être internalisés dans les cellules [691, 692, 696]. Dans ce contexte, des études ont démontré que les PACs peuvent interagir avec les membranes des cellules Caco-2, améliorant la perméabilité intestinale et assurant une protection cellulaire dans des conditions de cytotoxicité. Ces effets sont obtenus soit en piégeant directement les EROS et les radicaux libres pour les neutraliser, soit en induisant une cascade de réponses cellulaires conduisant à des défenses antioxydantes et anti-inflammatoires [691, 697]. La présence de domaines hydrophobes et hydrophiles dans la plupart des molécules de PP leur permet d'interagir à différents niveaux de la membrane, soit à la surface de la bicouche lipidique en se liant à la tête polaire des lipides, soit en s'insérant dans la bicouche pour interagir avec les chaînes hydrophobes des lipides [698-700]. Des expériences menées sur des liposomes contenant différents groupes polaires et une série de flavonoïdes, suggèrent la formation de liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyles des flavonoïdes et les groupes polaires des phospholipides, favorisant ainsi l'interaction avec la membrane [694, 701]. L'adsorption ou la pénétration d'un PP dans la bicouche lipidique dépend de ses caractéristiques structurelles. L'interaction des PP avec les groupements des têtes lipidiques est positivement corrélée avec le nombre de groupements hydroxyles des PP, tandis qu'elle est inversement corrélée avec leur degré d'hydrophobie [702, 703]. La structure tridimensionnelle adoptée par les PP peut également influencer leur interaction avec les membranes cellulaires ou leur absorption. À titre d'exemple, la structure planaire adoptée par les PP tels que certains flavan-3-ols les rend

plus aptes à interagir avec les membranes alors que les flavones adoptent une configuration inclinée [704].

Un autre mécanisme par lequel les PP pourraient influencer la fonction cellulaire consiste à modifier la structure et les caractéristiques physiques de la membrane plasmique, notamment la fluidité membranaire et les propriétés électriques [697]. Ces effets peuvent être observés lorsqu'ils sont adsorbés sur la membrane ou lorsqu'ils sont insérés dans la bicouche lipidique. Ces modifications peuvent entraîner des changements fonctionnels dans plusieurs processus liés à la membrane, tels que l'activité des enzymes associées à la membrane, les interactions ligand-récepteur, les flux d'ions et/ou de métabolites, et la modulation de la transduction des signaux cellulaires [697]. En ce qui concerne les effets antioxydants durant l'adsorption des PP à la surface de la membrane, ils pourraient former une barrière physique contre les radicaux libres hydrosolubles [694].

Lorsqu'ils sont insérés dans la bicouche lipidique, les PP seraient en proximité pour capturer les peroxydes lipidiques et d'autres radicaux solubles [693, 694]. Bien que les interactions des flavonoïdes avec les membranes puissent être considérées comme un mécanisme d'action non spécifique, des preuves récentes suggèrent une sélectivité de certains PP, tels que les catéchines/epigallocatechines, les PACs et les anthocyanines pour des zones spécialisées de la membrane, à savoir les radeaux lipidiques [705-710]. Ces interactions des PP avec les protéines et/ou les lipides du radeau lipidique constituent un site potentiel majeur dans la régulation des événements cellulaires par ces composés.

Outre les interactions avec les membranes cellulaires, l'interaction avec les protéines est apparue comme un autre mécanisme pertinent pour expliquer plusieurs effets biologiques des PP. Les interactions des PP avec les protéines sont des exemples d'actions spécifiques qui induisent des effets biologiques dépendant de la fonction de la protéine impliquée, tels que la modification des activités enzymatiques, la liaison récepteur-ligand et la liaison des facteurs de transcription à leurs sites spécifiques dans l'ADN [697]. Les PP tels que les flavan-3-ols interagissent avec les protéines riches en proline par une association hydrophobe primaire entre les résidus de proline et les cycles phénoliques aromatiques, conduisant à la formation d'agrégats de petite taille et se

terminant par la précipitation des protéines [711]. Ce mécanisme très intéressant est responsable, par exemple, de la sensation d'astringence ressentie dans la bouche lors de la consommation de vin rouge, due à la précipitation des protéines salivaires riches en proline [712]. Certains PP interagissent avec des enzymes et inhibent efficacement leur activité enzymatique [713]. On peut émettre l'hypothèse que certains PP inhibent l'activité des enzymes ATP-dépendantes, à travers une liaison compétitive au site de liaison de l'ATP de l'enzyme. Cette compétition semble reposer sur la présence de deux substitutions de groupement hydroxyle en position 5, 7 dans le cycle A du flavonoïde, et d'une insaturation en position 2,3 avec un groupement 4-céto dans l'hétérocycle C [714].

Parmi les enzymes cibles des PP, il est possible de noter des enzymes dont les substrats sont des purines, par exemple l'ATP (kinases, ATPases, nucléotide cyclique phosphodiesterase, adénylate cyclase, transcriptase inverse, xanthine oxydase, ARN et ADN polymérases, ribonucléase, ADN ligase humaine), et des enzymes ayant le NADPH comme cofacteur (aldose réductase, malate déshydrogénase, lactate déshydrogénase, oxyde nitrique synthase, glutathion réductase, 11- β -hydroxystéroïde déshydrogénase) [697].

De plus, les interactions entre les PP et les facteurs de transcription, ainsi que les récepteurs sont également connues. Des études ont démontré la capacité de catéchines et procyanidines à interagir directement avec le facteur de transcription NF- κ B, l'empêchant ainsi de jouer son rôle dans la régulation de l'expression de ses gènes cibles [692, 715-719].

En résumé, le volet expérimental de mon projet de recherche (volet 1) a permis de mettre en lumière la capacité des PACs à augmenter la défense antioxydante et anti-inflammatoire, ainsi qu'à améliorer l'homéostasie intestinale par : (i) l'activation de défenses antioxydantes, des enzymes cytoprotectives GPx, SOD2 et la régulation de la signalisation NRF2/Keap1; (ii) la diminution de l'enzyme COX2 et des cytokines pro-inflammatoires via la régulation à la baisse du facteur de transcription NF- κ B; (iii) la promotion de la sensibilité à l'insuline via la voie PI3k/Akt; (iv) l'augmentation de l'expression de CPT1 α et la diminution des expressions protéiques de FAS et ACC via la régulation de l'expression des facteurs de transcription spécifiques PGC1 α , PPAR γ et

SREBP; et (v) la dérégulation de la synthèse du glucose en modulant l'expression protéique des facteurs critiques.

Implications des PACs dans la prévention des MAFLD

Notre objectif dans ce volet consiste à évaluer les aspects préventifs et thérapeutiques des PACs dans un modèle murin dysmétabolique, tout en spécifiant leurs bénéfices cliniques et voies mécanistiques. Comme décrit précédemment dans la méthodologie, nous avons utilisé le modèle de souris C57BL6 soumises à une diète HFHS, déjà bien établi dans nos études antérieures [671], pour développer le SM et les complications cardio-métaboliques afin d'examiner l'action des PACs. Les souris ont été réparties en trois groupes : Chow (diète normale), HFHS (diète riche en matières grasses et en sucre), et HFHS + PACs. Les PACs ont été administrés par gavage à raison de 200mg/kg/j par gavage pendant 12 semaines. Le choix de la concentration de PP administrée aux souris a été basé sur la consommation moyenne par l'humain et a suivi la définition de la dose humaine équivalente (DHE) tenant compte de la surface corporelle de la souris selon l'équation des lignes directrices de la US FDA [720].

L'adiposité associée à une prise de poids importante et un indice HOMA-IR élevé a été observée chez les animaux du groupe HFHS. Étant donné que l'inflammation et le SOx sont des précurseurs de la RI, nous avons décidé d'évaluer ces deux conditions. Les taux circulants de MDA et d'isoprostanes, marqueurs de la peroxydation lipidique, étaient considérablement élevés chez les animaux sous la diète HFHS. Les expressions géniques élevées de COX-2, des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6, ainsi que du facteur de transcription NF- κ B témoignent d'un état inflammatoire au niveau intestinal. En outre, les animaux soumis à la diète HFHS présentaient des taux plasmatiques élevés de LPS, mettant en évidence une perméabilité anormalement élevée de la barrière intestinale. Cette hyperperméabilité permet le passage paracellulaire/transcellulaire des endotoxines habituellement confinées à la surface des bactéries à Gram négatif. Il semble donc que la diète HFHS a induit non seulement la perte de l'homéostasie métabolique, mais aussi une aberration de la composition du microbiote intestinal, causant des perturbations de la barrière intestinale avec libération de LPS dans la circulation sanguine et l'occurrence de l'endotoxémie. Ces dysfonctions intestinales vont donc contribuer à affecter davantage la santé

métabolique. Dans ce contexte, il faut souligner que les dérangements métaboliques au niveau d'un organe ont des répercussions sur d'autres organes métaboliques. Par exemple, le dérèglement de la barrière intestinale et le passage du LPS aggravent l'inflammation systémique et hépatique. Par conséquent, nous avons mesuré l'expression de marqueurs pro-inflammatoires au niveau hépatique. Les animaux sous la diète HFHS affichent des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6) et de COX2, avec une augmentation évidente de l'expression protéique du facteur NF- κ B. À cette condition pro-inflammatoire du foie s'ajoute un état pro-oxydant entretenu par la faible expression des enzymes cytoprotectives GPx et SOD2 ainsi que l'expression du facteur de transcription NRF2.

Pour tester l'hypothèse selon laquelle le SOx et l'inflammation, en tant que précurseurs de la RI, perturbent des voies métaboliques au niveau du foie, nous avons déterminé l'expression protéique des marqueurs de la β -oxydation, de la lipogenèse, de la néoglucogenèse et des transporteurs du cholestérol. Les résultats renforcent cette hypothèse en documentant une augmentation de lipogenèse et une diminution de la β -oxydation en réponse à la diète HFHS, contribuant ainsi à l'accumulation de graisse et à la stéatose hépatique, d'ailleurs confirmée par des analyses histologiques. De plus, il y'a une régulation à la hausse de la néoglucogenèse chez les souris sous la diète HFHS, ce qui contribue à l'augmentation de la glycémie. Le développement de l'obésité, de la RI ainsi que l'apparition d'autres dérangements métaboliques ont cependant été largement atténués par l'administration de PACs. Les mécanismes d'actions par lesquels ces effets bénéfiques sont obtenus incluent l'intervention de puissants facteurs de transcription.

Tel que décrit, l'administration des PACs de canneberges aux souris sous la diète a permis une réduction de la prise de poids et un ralentissement de l'accumulation de la graisse corporelle. Cet effet anti-obésogène n'était pas lié à l'apport énergétique total, excluant ainsi toute implication des voies centrales de l'appétit. Les mécanismes plausibles déclenchés par les PACs pourraient inclure l'interaction avec les glucides et les protéines, affectant ainsi leur absorption intestinale [530, 721] ; la diminution de la digestion des glucides et de l'absorption du glucose dans l'intestin [722]; la réduction de l'émulsion et de l'absorption des lipides dans le tractus gastro-intestinal, réduisant ainsi l'apport calorique [723]. En effet, la surconsommation alimentaire de gras et de glucides entraîne inévitablement une accumulation de TG dans le foie et les tissus adipeux,

augmentant considérablement les risques de développer une obésité, une NAFLD, une hyperlipidémie et d'autres complications.

Le processus d'absorption des lipides est contrôlé par les lipases pancréatiques qui font partie des enzymes digestives se liant spécifiquement aux graisses alimentaires puis les hydrolysent en AG absorbables [724]. Par conséquent, les composés inhibiteurs de lipases qui suppriment l'absorption des lipides sont prometteurs pour lutter contre l'obésité. De plus, les BA jouent un rôle crucial dans l'absorption des lipides et leur digestion. Les BA, composés amphiphiles, sécrétés par les hépatocytes, pourraient servir à l'émulsification des lipides et leur transport sous forme de micelles [725]. La fonction d'émulsion augmente la surface des gouttelettes lipidiques, favorisant ainsi leur digestion par les lipases [726]. En conséquence, outre l'inhibition des lipases, cibler les BA est tout autant une approche efficace pour réduire l'absorption des lipides. Evidemment, les PP et tannins provenant de fruits ont montré leurs capacités à inhiber les activités des lipases et à se lier aux BA et au cholestérol pour réduire leur absorption [727-730].

L'amélioration de la dépense énergétique et de la thermogénèse ainsi que la régulation des voies de signalisation liées au métabolisme énergétique et à l'adipogénèse [731, 732] doivent être prises en compte dans la description des actions potentiellement déployées par les PP dans la prévention de l'obésité. L'impact des PP dans la régulation de la dépense énergétique et de la thermogénèse passe par la stimulation du brunissement du tissu adipeux. Ce changement fonctionnel et métabolique du tissu adipeux par les PP implique une augmentation de l'expression et de l'activité de la protéine découplante UCP1, l'amélioration de la biogénèse et des fonctions mitochondriales par la promotion de l'AMPK phosphorylé et du facteur PGC1 α [733, 734]. Allant dans le même sens, des études ont montré que la mitochondrie, de par son compartiment hydrophobe et ses protéines héminiques, serait un site potentiellement préférentiel d'accumulation de certains PP, notamment les flavonoïdes une fois absorbés dans les cellules [414]. Outre l'activation de l'AMPK, des études ont montré la capacité des PP à stimuler la β -oxydation des AG et la diminution de leur synthèse via une diminution de l'activité de ACC et de FAS [734].

La modification du microbiote intestinal [735, 736] est une conséquence majeure qui favorise les effets bénéfiques des PP, surtout ceux de grande taille moléculaire. Les propriétés anti-obésogènes des PP passent aussi par l'inhibition de la différenciation et de la prolifération des préadipocytes [737], ainsi que l'induction de la lipolyse et du métabolisme lipidique [737]. Nos résultats concordent avec des études précédentes sur les effets anti-obésogènes des PACs de canneberges [738]. D'autres études sont évidemment nécessaires pour identifier les mécanismes précis par lesquels les PACs induisent un remodelage du tissu adipeux et contrecarrent l'obésité.

L'un des objectifs de nos études était d'examiner les effets des PACs sur la RI qui se situe au cœur du SM [739]. Bien qu'il puisse s'agir d'une réponse d'adaptation de certains tissus en condition de stress métabolique, on ne pourrait tout de même nier le fait que la RI constitue un processus clé dans l'apparition des pathologies métaboliques dont le DT 2 [740, 741]. Ainsi, dans la prise en charge thérapeutique des patients, il est essentiel de régler cette situation de RI avec des traitements adéquats afin de ne pas empirer leurs conditions métaboliques. Les mécanismes par lesquels les PACs améliorent la sensibilité à l'insuline font probablement intervenir leurs effets anti-oxydants, anti-inflammatoires et prébiotiques. Comme l'inflammation et le SOx sont des signes avant-coureurs des maladies métaboliques, l'impact bénéfique des PACs sur la RI peut s'expliquer par une prévention du dysfonctionnement du tissu adipeux [742-744]. En effet, un tissu adipeux dysmétabolique peut perturber l'homéostasie métabolique par le biais de ses produits tels que les adipokines (*i.e.* leptine, adiponectine, résistine), les AG et leurs métabolites (DAG). En concordance avec nos résultats, d'autres études ont démontré la capacité des PP à améliorer la sensibilité à l'insuline aussi bien dans des modèles murins que dans des interventions cliniques [745]. L'amélioration de la sensibilité à l'insuline par les PP, dont les PACs, passe par la réduction de la glycémie postprandiale et la régulation du transport du glucose. Ceci se fait par le biais de la modulation de la libération du glucose hépatique, la régulation des voies de signalisation de l'insuline, et la protection des cellules β du pancréas sécrétant l'insuline contre les dommages métaboliques qu'elles subissent dans les conditions de surcharge en nutriments et de stress métabolique.

Les PP jouent un rôle essentiel dans la régulation de la glycémie en stimulant la captation du glucose par le muscle et les adipocytes, favorisant la translocation du GLUT4 vers la membrane

plasmique. Ce processus est principalement réalisé par l'activation de la voie de la protéine kinase activée par l'AMP [746], ou encore les PP régulent la glycémie en réduisant l'absorption du glucose au niveau intestinal [747]. Les PP alimentaires issus de baies, par exemple, ont démontré leur capacité à inhiber l'activité de deux enzymes clés, à savoir l' α -amylase et l' α -glucosidase, impliquées dans la digestion des glucides. Cette action permet de contrôler les concentrations de glucose circulant de manière significative [748-750]. De plus, la régulation du transport du glucose au niveau intestinal par le transporteur de glucose dépendant du sodium SGLT1 constitue l'un des mécanismes par lequel les PP peuvent influencer la glycémie de manière positive [751-755]. Le processus de digestion implique la dégradation du maltose, du maltotriose et des α -dextrines, qui sont les trois principaux produits de la digestion par l' α -amylase. La digestion se poursuit dans l'intestin grêle par l' α -glucosidase, une classe d'enzymes associées à la bordure en brosse, qui hydrolysent les résidus de glucose terminaux [756, 757]. Le glucose est ensuite absorbé dans les cellules par des transporteurs, principalement le SGLT1 situé dans la membrane de la bordure en brosse du côté apical des entérocytes [758]. Dans un premier temps, les PP peuvent exercer un contrôle sur le flux de glucose en réduisant le métabolisme des glucides alimentaires et en influant sur l'absorption des produits de ce métabolisme, notamment le glucose. Par la suite, certains PP, comme les PACs, démontrent leur capacité à réguler la glycémie en améliorant la sensibilité à l'insuline et en favorisant la captation du glucose par le biais de l'activation de l'AMPK et la régulation de la signalisation du PI3K/Akt [759]. Il a été démontré que cette activation de l'AMPK s'accompagne de la stimulation de la translocation du transporteur GLUT4 dans le muscle, et la diminution de la néoglucogenèse hépatique [760].

Dans les cellules β du pancréas, la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose implique l'entrée du glucose par le transporteur de glucose GLUT2, l'augmentation de la teneur en ATP par la glycolyse et l'activité du cycle de l'acide tricarboxylique, suivi de l'inactivation des canaux KATP sur la membrane cellulaire. Cependant, l'exposition chronique des cellules β pancréatiques à des taux élevés de nutriments tels que le glucose, les AG et les TG, augmente directement la production intracellulaire d'EROS et de radicaux libres, perturbant la fonction mitochondriale et altérant la sécrétion d'insuline. De plus, l'exposition chronique à des taux élevés de glucose a supprimé l'activité de l'AMPK, entraînant une augmentation de la lipogenèse et, par conséquent

une altération du fonctionnement normal des cellules β [761]. Les PP, avec leurs propriétés antioxydantes et antiinflammatoires, jouent un rôle protecteur en préservant les cellules β pancréatiques contre l'inflammation et la glucolipotoxicité, contribuant ainsi à maintenir leur intégrité et leurs fonctions [747].

Comme décrit précédemment dans la section introduction, certains tissus se préservent du stress métabolique en résistant à l'insuline. Ceci étant reconnu, il faut donc prescrire les traitements en fonction de l'état des patients et non proposer une insulinothérapie ou favoriser la sensibilité accrue à l'insuline. Par conséquent, dans certains cas, la prise en charge thérapeutique visant à normaliser la glycémie doit faire intervenir des stratégies de décharge des cellules en nutriments. Dans notre étude, en analysant les effets des PACs contre la RI chez les souris dans les conditions d'abondance nutritionnelle, on peut remarquer que ces composés ne favorisent pas forcément une sécrétion excessive de l'insuline pour stimuler la captation du glucose car les mécanismes déployés pour prévenir la RI sont multiples. Les actions des PACs sur la RI impliquent leurs propriétés antioxydantes et antiinflammatoires, la protection contre la glucolipotoxicité et la prévention de l'endotoxémie, entre autres. Ainsi, les PACs protègent les tissus contre le SOx et l'inflammation, préservent leur intégrité et leurs fonctions et par conséquent améliorent leur sensibilité à l'insuline.

Une perte de l'homéostasie métabolique des lipides accroît le risque de nombreuses maladies chroniques. Les taux de LDL-c et de HDL-c, ainsi que les taux de lipoprotéines riches en TG, nécessitent une attention particulière en raison de leurs capacités prédictives des MCV. Ces paramètres ont ainsi été la cible de plusieurs approches thérapeutiques et diététiques visant à améliorer les profils lipidiques. Par conséquent, la normalisation des taux sanguins de cholestérol, de TG et des lipoprotéines pourrait contribuer à contrer le SM et les pathologies cardiométaboliques. Les fruits, notamment les baies, contiennent des concentrations élevées en composés bioactifs qui pourraient favoriser l'amélioration du profil lipidique sanguin. Qu'elles soient consommées sous forme de fruits entiers, de jus ou d'extraits purifiés, les baies ont démontré leur capacité à abaisser les taux de cholestérol total et de LDL-c, tout en augmentant le taux de HDL-c, selon les résultats d'études cliniques menées auprès de participants présentant des taux élevés de lipides sanguins, un DT 2 ou un SM [762]. Par ailleurs, comme le révèlent nos

données, les PACs ont des effets hypolipidémiques en soulageant l'hypertriglycéridémie et l'hypercholestérolémie induites par la diète HFHS tout en réduisant les taux de lipoprotéines de très basse densité (VLDL). Étant donné que les souris présentent généralement de faibles concentrations de lipoprotéines de basse densité (LDL), nous avons calculé la valeur du non-HDL-cholestérol, qui offre une représentation plus précise et plus fiable du risque d'athérosclérose. Cette mesure englobe toutes les lipoprotéines contenant de l'apolipoprotéine B, tout en constituant un paramètre plus stable et un prédicteur du LDL-cholestérol [763, 764]. Nos expériences ont révélé le potentiel des PACs de normaliser les concentrations élevées de non-HDL-cholestérol induites par la diète HFHS. Bien que la validation de nos observations nécessite des essais sur des souris génétiquement modifiées (knock-out du récepteur du LDL ou de l'apolipoprotéine E, reconnues pour développer l'athérosclérose), nos résultats ont clairement mis en évidence la capacité des PACs à prévenir l'hyperlipidémie. En accord avec nos observations, des rapports indiquent qu'une supplémentation de 100 mg/jour d'extrait de mûrier noir pendant 4 à 8 semaines peut contribuer à améliorer le profil lipidique. Des réductions significatives ont été notées dans les taux sanguins de cholestérol total, de TG, ainsi que dans les taux de LDL-c, avec une tendance à l'augmentation du HDL-c chez les patients atteints du SM [765]. L'administration d'extraits de canneberges a également produit des effets bénéfiques en améliorant du profil lipidique chez des patients [762].

Nos expériences confirment l'action directe des PACs sur au moins trois facteurs de risque du SM tels que l'obésité, la RI et les dyslipidémies, ainsi que sur le SOx et l'inflammation, deux mécanismes bien définis qui sous-tendent le SM et la pathogenèse des MCV [766]. Les MAFLD, reconnues comme des dysfonctionnements métaboliques associées au SM [767, 768], ont été ciblées pour évaluer la capacité des PACs à prévenir/atténuer les risques de leur développement dans notre modèle murin dysmétabolique. En parallèle, à l'amélioration de l'ipITT, reflétant la sensibilité à l'insuline générale, nous avons remarqué une réduction des dépôts de gras induits par la diète HFHS ainsi qu'une diminution des taux de TG et de cholestérol total en réponse aux PACs.

Compte tenu de la relation entre la stéatose hépatique et l'augmentation de la lipogenèse au détriment de la β -oxydation des AG, nous avons exploré le rôle des PACs sur ces voies en ciblant

leurs enzymes régulatrices cruciales, notamment ACC, FAS et CPT1 α . Par ailleurs, nous avons observé que l'administration des PACs conduisait à la baisse de la lipogenèse et à une activation de la β -oxydation. L'énergie excédentaire provenant de l'alimentation est stockée sous forme de graisse conduisant à l'hypertrophie du tissu adipeux, à l'hyperlipidémie et à d'autres pathologies. Lorsque l'organisme a besoin d'énergie, les graisses précédemment stockées sont hydrolysées en AG, qui sont ensuite oxydés pour fournir de l'énergie. Par conséquent, la modulation des processus de β -oxydation, de lipogenèse et de lipolyse pourrait être une stratégie prometteuse pour lutter contre le SM. Quant aux mécanismes par lesquels l'expression du gène lié à la β -oxydation des AG (CPT1 α) a été augmentée et l'expression protéique des marqueurs lipogéniques (ACC et FAS) atténuée dans le foie, nos résultats suggèrent que les PACs ont réduit l'activité des facteurs de transcription, SREBP1c et ChREBP, nécessaires à l'induction des gènes lipogéniques et au développement du foie gras sous hyperinsulinémie et un régime riche en glucides [769-771].

Il est intéressant de noter que les PACs ont également démontré leur capacité à activer l'AMPK α , un senseur métabolique de l'homéostasie énergétique, qui exerce une influence simultanée sur la lipogenèse et la β -oxydation des AG. L'activation de l'AMPK α par les PACs a probablement entraîné l'inhibition de l'ACC et la stimulation de la CPT1 α par leur phosphorylation respective dans le foie.

Pour approfondir la compréhension des mécanismes sous-jacents aux effets des PACs dans la prévention des dépôts de graisse dans le foie, nous avons analysé l'expression protéique des marqueurs PPAR α et PGC1 α , deux protéines majeures qui régulent la biogenèse et la fonction mitochondriales [772]. En fait, les PACs ont renforcé l'expression de PPAR α , qui est intrinsèquement impliqué dans l'absorption et l'oxydation des AG via la régulation à la hausse de CPT1 α , une protéine critique pour l'importation des acyles gras dans les mitochondries. Les PACs ont également augmenté l'expression de la protéine nucléaire PGC1 α connue comme coactivateur transcriptionnel de PPAR α et régulatrice de la stimulation de la biogenèse mitochondriale et de la capacité oxydative. Par conséquent, il est raisonnable de proposer que les PACs diminuent l'abondance des lipides intrahépatiques en orchestrant le déclin de la lipogenèse *de novo* et l'augmentation de la β -oxydation des AG par la modulation des voies de signalisation AMPK α /SREBP1c, ChREBP/ACC/FAS/CPT1A et PGC1 α /PPAR α /CPT1 α .

Des investigations plus poussées dans le foie ont révélé que les PACs réduisaient l'expression des protéines PEPCK et G6Pase, limitant ainsi la gluconéogenèse et la libération de glucose. Cet effet peut résulter de la modulation par ChREBP, un régulateur métabolique qui contrôle à la fois le métabolisme des lipides et du glucose [773-775], principalement exprimé dans les sites actifs de la lipogenèse de novo tels que le foie et les tissus adipeux blancs et bruns [776].

Le traitement par les PACs a entraîné une réduction de l'expression protéique du TNF- α pro-inflammatoire, connu comme modulateur du système immunitaire car il facilite la communication intercellulaire, la prolifération, la survie, la différenciation et l'apoptose des leucocytes. La validation a été obtenue par la diminution de l'expression de COX-2, considérée comme un déterminant crucial des médiateurs en aval, qui nuisent à l'intégrité des tissus et contribuent aux lésions hépatiques [777]. La diminution de ces agents inflammatoires par les PACs est probablement due à leur action sur l'activation/suppression de NF- κ B, le facteur de transcription le plus important de l'inflammation hépatique [237].

En réponse à l'administration de PACs, nous avons observé une augmentation des niveaux endogènes de GPx et de SOD2, témoignant d'une amélioration de la défense antioxydante. Les PACs ont également accru l'expression de NRF2, le facteur de transcription central qui initie l'expression des gènes cytoprotecteurs en se liant à des sites spécifiques de l'ADN appelés éléments de réponse aux antioxydants [778]. En accord avec cette observation, le traitement par les PACs a augmenté de l'expression protéique du co-activateur transcriptionnel PGC1 α , favorisant l'induction de NRF2, ce qui pourrait mieux promouvoir les défenses hépatiques endogènes par la protection antioxydante et la biogénèse mitochondriale [779, 780]. Ces données apportent la preuve de l'effet protecteur des PACs via la régulation de PGC-1 α -NRF2.

En tant qu'antioxydants et agents anti-inflammatoires, les PP peuvent éliminer l'excès de radicaux libres de l'oxygène et réduire l'expression des facteurs pro-inflammatoires dans l'organisme. Ainsi, ils contribuent à maintenir une homéostasie cellulaire, à assurer une transmission de signaux dans l'organisme, et à prévenir les dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides [260,261].

On peut noter l'importance des propriétés prébiotiques des PP, notamment ceux de grande taille moléculaire, dans leurs mécanismes d'actions préventifs vis-à-vis de chacune des composantes majeures du SM. Sachant que seulement 5 à 10 % des PP ingérés sont directement absorbés au niveau de l'estomac et du petit intestin, la question de savoir si l'interaction synergique entre les PP et le microbiote intestinal, favorisant la production de métabolites absorbables et la modulation de la composition du microbiote, ne gouvernerait pas les effets métaboliques bénéfiques des PP doit être soulevée. En effet, des études ont montré que le traitement avec les PACs de canneberges entraîne des modifications du microbiote intestinal semblables à celles obtenues suite à une chirurgie bariatrique avec une augmentation des *Bacteroidetes* et de *Akkermansia*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* [672].

Dans une étude randomisée, contrôlée, en double aveugle et croisée portant sur 22 volontaires [781], la consommation quotidienne de 494 mg de flavan-3-ols de cacao pendant 4 semaines a significativement augmenté la prolifération de *Lactobacillus spp.* ($p < 0,001$) et de *Bifidobacterium spp.* ($p < 0,01$) en comparaison à celle d'une boisson contenant seulement 29 mg de flavan-3-ols et appariée à des fibres et à d'autres prébiotiques potentiels. Par ailleurs, une augmentation du taux de bifidobactéries a été associée à une meilleure tolérance au glucose et à une diminution des marqueurs inflammatoires tels que les interleukines IL-6, IL-1 α et IL-1 β , le TNF- α et la protéine MCP-1 [782-784]. Les améliorations des taux de cholestérol et de CRP ont été également associées à des changements dans la composition et la diversité du microbiote intestinal [785].

En résumé, le volet 2 expérimental de mon projet de recherche a confirmé les effets bénéfiques des PACs démontrés dans les cellules intestinales. Ce volet a surtout permis de confirmer la capacité des PACs à prévenir l'installation de plusieurs conditions de risques métaboliques qui augmentent le pronostic de développer des pathologies cardio-métaboliques notamment les MAFLD. Il a également éclairé certains mécanismes d'action dans la prévention des désordres métaboliques hépatiques. En particulier, les PACs ont exhibé leurs capacités à prévenir les dérangements associés au SM en : (i) évitant l'accumulation de lipides, l'adiposité et l'obésité; (ii) prévenant l'établissement de conditions pro-inflammatoires et pro-oxydantes par l'activation de défenses antioxydantes à travers la régulation du facteur NRF2, en réduisant les facteurs pro-inflammatoires et en diminuant le facteur de transcription NF- κ B; (iii) améliorant l'homéostasie

intestinale en vue de la diminution de l'endotoxine circulante; et (iv) prévenant l'état hyperglycémique et la RI qui sont au cœur du SM.

Effets bénéfiques métaboliques du DHPVL

Les PACs sont mal absorbés dans le tractus gastro-intestinal et leur difficulté à franchir la barrière intestinale provient de leur structure chimique complexe, de leur association étroite avec les macromolécules, de leur poids moléculaire élevé, de leur degré élevé de polymérisation et de leur insolubilité relative. La découverte des propriétés des PP a ensuite conduit la communauté scientifique à réaliser l'importance primordiale de leur interaction avec les micro-organismes intestinaux. Plusieurs études métabolomiques ont identifié les voies métaboliques potentielles responsables du catabolisme microbien des PACs, et les métabolites correspondants ont été retrouvés dans les fluides biologiques humains.

Ces nouvelles preuves soulèvent des questions sérieuses sur la pertinence physiologique des études antérieures et indiquent que des métabolites tels que les phényl- γ -valérolactones sont les candidats plausibles des effets métaboliques bénéfiques attribués aux PACs. Néanmoins, bien que de nombreuses informations aient souligné les avantages des PACs pour le maintien de l'homéostasie métabolique en général suite à des recherches intensives, il en va autrement des métabolites des PACs, en raison de leur faible disponibilité. Quelques études ont examiné l'impact des valérolactones sur la lignée cellulaire LNCaP, les adipocytes bruns, et les cellules myotubulaires L6 dérivées du muscle squelettique du rat mais leurs effets métaboliques au niveau intestinal sont très peu étudiés. En grande partie et pour ces raisons, la présente étude a été entreprise pour estimer l'efficacité du DHPVL pour lutter contre le SOx, l'inflammation et le maintien de l'homéostasie métabolique intestinale dans la lignée cellulaire Caco-2/15 immortalisée d'origine humaine.

Le DHPVL, principal métabolite microbien dérivé du métabolisme des PACs, est généré à partir de la fission et de la lactonisation du cycle C des flavan-3-ols en réponse aux actions de la microflore colique. Le SOx, l'inflammation et les dommages métaboliques subséquents ont été induits dans les cellules Caco-2/15 par une incubation O/N avec le LPS puis un traitement de 2h le lendemain avec le tert-butyl.

Les résultats de notre étude indiquent clairement que le DHPVL, à l'image de ses précurseurs, les PACs, améliore l'intégrité de la barrière intestinale et normalise la peroxydation lipidique induite par le LPS + Tert, comme le révèlent la diminution concomitante du biomarqueur MDA et l'augmentation de l'expression protéique et des niveaux de transcription des enzymes antioxydantes (SOD2 et GPx) par la stimulation du facteur de transcription NRF2. De plus, un effet anti-inflammatoire évident a été observé compte tenu du déclin du TNF- α et de la COX2, probablement dû à la régulation à la baisse du facteur de transcription NF- κ B. Tout comme les PACs, le DHPVL a montré une grande efficacité dans la préservation de l'homéostasie des lipides cellulaires et du glucose, comme en témoignent l'amélioration de la β -oxydation des AG, l'atténuation de la lipogenèse et la gluconéogenèse résultant de la régulation des facteurs de transcription associés (PPAR α , PGC1 α , PPAR γ et SREBP1c). Étant donné que ces voies métaboliques sont étroitement contrôlées par la sensibilité à l'insuline, nous avons exploré la voie de signalisation de l'insuline et détecté une régulation positive de la voie PI3K / Akt et une tendance à la compression des expressions de p38-MAPK, révélant l'impact favorable du métabolite.

Les études sur le DHPVL sont encore à un stade préliminaire, bien qu'un certain nombre d'entre elles, basées sur différents modèles (cellulaire et animal) évaluant la biodisponibilité et la bioactivité des hydroxy-phényl- γ -valérolactones, métabolites des flavan-3-ols, aient été rapportées au cours de la dernière décennie [341]. Beaucoup de ces études font plutôt référence à la présence de métabolites après l'ingestion de suppléments ou de boissons/aliments riches en PP d'une part, et d'autre part établissent le lien entre les effets bénéfiques attribués à ces PP et la présence ou l'absence des métabolites/PP, respectivement [583]. Les processus inflammatoires et de SOx ont été particulièrement étudiés [341]. Quelques études ont examiné l'impact des valérolactones sur la lignée cellulaire LNCaP du cancer de la prostate [786], les cellules HepG2, les adipocytes bruns [787], les cellules myotubes L6 dérivées du muscle squelettique du rat [788], les cellules neuronales [789, 790] et les cellules épithéliales intestinales IEC-6 [791]. Par exemple, le DHPVL a significativement diminué l'activité transcriptionnelle NF- κ B induite par le TNF- α dans les cellules HepG2 [341]. L'accumulation de lymphocytes T et de macrophages producteurs de cytokines pro-inflammatoires avec la sécrétion concomitante de la molécule d'adhésion des

cellules vasculaires-1 par l'endothélium est un élément clé du développement précoce de la plaque d'athérosclérose [792]. L'inhibition de ce processus a été observée après incubation de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine traitées avec la DHPVL [793], apportant ainsi la preuve que ce composé a le potentiel d'être une cible thérapeutique.

Aucune étude complète n'a encore été réalisée dans le but de mesurer l'influence du DHPVL sur le tractus gastro-intestinal. Nos résultats apportent cependant la preuve de la capacité du DHPVL à préserver l'intégrité intestinale et, d'autant plus, à réduire le SOx et l'inflammation, deux processus pivots impliqués dans les dérèglements métaboliques intestinaux et extra-intestinaux, même à une concentration très inférieure à celle de leurs précurseurs métaboliques, les PACs. Il est intéressant de noter qu'à des concentrations de l'ordre du microgramme par millilitre, les valérolactones inhibent les métalloprotéinases matricielles [794, 795], qui contribuent de manière significative à la pathogenèse de diverses maladies inflammatoires et dégénératives chroniques [796]. Les valérolactones pourraient même prévenir la libération de métalloprotéinases par les monocytes [795] et contrecarrer le SOx causé par le H₂O₂ dans les préadipocytes bruns immortalisés [787]. Dans notre étude, nous avons élucidé les mécanismes sous-jacents aux effets antioxydants et anti-inflammatoires des molécules DHPVL et avons montré qu'ils sont liés à leurs actions sur les facteurs de transcription NRF2 et NF-κB. Conformément à nos conclusions, les valérolactones ont supprimé l'activation transcriptionnelle de NF-κB stimulée par le TNF-α dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine [797]. Des études précédentes ont décelé de faibles concentrations de l'ordre du micromolaire dans la circulation sanguine suite à la consommation de flavan-3-ols [542, 583, 798]. De même, les concentrations observées de valérolactones associées à des effets bénéfiques variaient du micromolaire au nanomolaire [583, 799]. Dans l'ensemble des études disponibles, seules de faibles concentrations du DHPVL et de ses formes conjuguées ont été détectées en réponse à la consommation d'aliments riches en PACs [799-801].

Les effets de la DHPVL sur le métabolisme des lipides intracellulaires ne peuvent être comparés aux données de la littérature. Dans une étude sur les cellules du tissu adipeux, le DHPVL agit en inhibant la lipogenèse, réduisant ainsi la teneur en lipides intracellulaires [802]. De même, les métabolites du resvératrol et l'urolithine, un métabolite microbien d'ellagitannins, se sont avérés

être des molécules anti-stéatose avec des effets hypolipémiants dans les hépatocytes murins AML12 et en cas d'obésité induite chez un modèle de rat [803, 804]. Bien qu'il n'ait pas été déterminé si le DHPVL se lie principalement à la membrane cellulaire externe ou s'il est absorbé par les cellules, on peut suggérer que le DHPVL sera plus facilement et rapidement absorbé par les cellules ou qu'elle aura une grande capacité de liaison aux cellules grâce à son faible poids moléculaire par rapport aux PACs polymériques. Cela peut expliquer l'efficacité préventive élevée du métabolite à une concentration significativement faible par rapport au précurseur.

L'une des principales limites de ces études réside dans la reproductibilité des résultats, leur transférabilité chez l'humain et la détermination d'une dose exacte permettant d'obtenir les effets métaboliques bénéfiques observés dans les études *in vitro*.

En résumé, ce volet expérimental de mon projet de recherche a mis en lumière le potentiel du DHPVL, même à très faibles doses, par rapport à ses précurseurs PACs, à : (i) améliorer l'intégrité membranaire intestinale en favorisant les marqueurs des jonctions serrées; (ii) renforcer la défense antioxydante endogène et atténuer le SOx par la régulation de la signalisation NRF2/Keap-1; (iii) diminuer l'inflammation au travers de la régulation du facteur NF-κB; (iv) restaurer la sensibilité à l'insuline grâce à la voie PI3K/Akt, contribuant ainsi à réduire les perturbations intracellulaires des voies métaboliques lipidiques et du glucose en impliquant des facteurs de transcription critiques tels que PPARα, PGC1α, PPARγ et SREBP1c.

Conclusion

Dans le cadre de ce programme de doctorat, nous avons élucidé les mécanismes sous-jacents aux effets bénéfiques métaboliques des PACs de canneberges, contribuant au maintien de l'homéostasie métabolique intestinal et hépatique. Nos investigations ont révélé que les PACs sont capables de réguler plusieurs voies majeures de signalisation dont l'altération contribue au développement des TCM particulièrement dans le modèle murin. Les résultats issus de ces études ont fait l'objet de trois publications scientifiques. Par ailleurs, notre analyse critique des données disponibles dans la littérature, présentée dans un article de revue, met en évidence que les effets physiologiques des PP, en particulier des oligomères et polymères tels que les PACs, pourraient résulter des métabolites générés par leur métabolisme préalable par le microbiote intestinal.

Notre revue met en avant les effets prébiotiques des PACs, soulignant l'interaction avec le microbiote et la production de métabolites agissant localement (par exemple la barrière intestinale et la perméabilité) ainsi que sur le foie, d'autres organes et la circulation sanguine.

Chapitre 7 – Limites des études et Perspectives

Ce programme scientifique s'est avéré hautement pertinent pour le domaine de recherche, apportant des réponses significatives à plusieurs questions cruciales. Les résultats obtenus ont contribué à approfondir nos connaissances sur les actions des PACs et leur impact sur le métabolisme intestinal et hépatique. Au stade actuel, il est indiscutable que les PACs jouent un rôle bénéfique en atténuant les perturbations de plusieurs sentiers métaboliques associées au SM.

Cependant, avant de considérer leur application chez l'humain, il est impératif de confirmer les résultats à travers des études cliniques, étant donné que nos expériences ont été réalisées *in vitro* et *in vivo*, mais chez les souris. Il est nécessaire de valider les cibles des PACs chez l'humain, notamment leurs effets sur les protéines clés impliquées dans le SOx et la défense antioxydante, l'inflammation, les marqueurs de la signalisation cellulaire de l'insuline, la barrière intestinale, et bien sûr le microbiote intestinal. De plus, il convient également de déterminer toute interaction potentielle des PACs avec d'autres molécules et structures cellulaires pour mieux comprendre comment ils exercent leurs effets bénéfiques sur la santé. Il est évident que nos études présentent certaines limites.

Nous n'avons pas pu explorer les interactions entre différents types de cellules pour examiner l'effet des PACs sur de nombreux processus biologiques. Il est essentiel de rappeler que les cellules ont des fonctions différentes et complémentaires, et leur communication permet de coordonner et de moduler les voies métaboliques au niveau de divers tissus et organes, assurant le fonctionnement harmonieux de l'organisme. À l'instar des Caco-2/15, nous aurions souhaité étudier les mécanismes d'actions du métabolite DHPVL dans un modèle de coculture (Caco-2 x macrophages ou Caco-2 x HepG2), ce qui aurait permis de mieux comprendre la contribution

propre et la synergie des cellules dans la lutte contre les effets oxydatifs et inflammatoires, ainsi que le développement de la RI.

Il aurait été également avantageux de réaliser une étude cinétique pour évaluer les taux et les temps d'absorption du métabolite, afin de confirmer l'hypothèse d'une absorption entérocytaire rapide et efficace du DHPVL, et de comparer son sort métabolique à celui des PACs. Même dans le modèle murin, des études supplémentaires sont encore nécessaires pour mieux cerner les mécanismes sous-jacents au rôle du DHPVL en tant que médiateur des effets bénéfiques des PACs. De plus, nous n'avons examiné qu'un des métabolites importants des PACs, mais des efforts supplémentaires doivent être déployés pour évaluer d'autres molécules.

En résumé, l'étude des effets métaboliques bénéfiques du DHPVL en est encore à ses débuts, et des efforts sont requis pour confirmer les effets prophylactiques des PACs sur les troubles métaboliques, que ce soit à partir de l'extrait de canneberges ou de suppléments riches en flavan-3-ols, médiés par leurs métabolites.

Les polyphénols en tant qu'agents thérapeutiques : une alternative aux médicaments?

Les PACs présentent d'importantes activités antioxydantes et anti-inflammatoires élargissant ainsi leurs perspectives d'applications pharmaceutiques et thérapeutiques contre le SM, une maladie caractérisée par un SOx et une inflammation chronique de bas niveau. Malgré ces effets bénéfiques et les avantages d'un faible coût d'investissement, il est indéniable que reproduire à grande échelle les effets bénéfiques des PP et des acides phénoliques dans un contexte clinique demeure difficile en comparaison avec les médicaments et molécules pharmaceutiques, et cela peut être attribué à plusieurs raisons. Tout d'abord, la teneur en composés phénoliques des différentes sources végétales varie considérablement, ce qui augmente la complexité et le coût en temps du processus d'extraction, de purification et de préparation [805]. Les canneberges ne font exception à cette première limite, car la teneur en PACs de ces fruits varie significativement en fonction des cultivars, de l'emplacement géographique, du niveau d'ensoleillement et du stade de maturation. En outre, la standardisation des extraits pour assurer une concentration constante en composés actifs représente un défi supplémentaire. Les variations naturelles des conditions de croissance des plantes peuvent entraîner des variations dans la composition chimique des

extraits, ce qui rend difficile la garantie d'une efficacité constante du produit final. Par conséquent, bien que les PACs offrent des perspectives prometteuses, il est impératif de résoudre ces défis liés à la variabilité des sources végétales et à la standardisation des extraits pour maximiser leur potentiel thérapeutique dans un contexte clinique.

Deuxièmement, les différentes méthodes d'extraction, de purification, et les voies d'administration des molécules *in vivo* peuvent influencer leur biodisponibilité et leur métabolisme, limitant ainsi la reproductibilité expérimentale et la transformation clinique [806, 807].

Enfin, la génétique et les habitudes alimentaires et de vie contribuent aux variabilités interindividuelles observées pour les effets pharmaceutiques des PP, et la durée de suivi peut également influencer l'efficacité des molécules thérapeutiques dans une certaine mesure [808].

Pour résoudre ces problèmes et réduire fondamentalement les erreurs systématiques, il est nécessaire que la communauté scientifique établisse de façon consensuelle des sources végétales relativement fiables et se mette d'accord pour statuer sur les étapes d'extraction et d'analyses, plutôt que de disposer des centaines d'études portant sur les PP provenant de différentes sources végétales avec des concentrations variées [809, 810].

Par ailleurs, il est essentiel de mener un nombre suffisant d'études animales et de recherches de suivi prolongé sur les êtres humains pour évaluer la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des PP mais aussi les interactions médicamenteuses potentielles *in vivo* [811, 812]. Naturellement, pour atténuer les variabilités interindividuelles, il est nécessaire que les analystes des données effectuent une analyse de régression multivariée afin d'évaluer les effets des molécules thérapeutiques envisagées [813]. Cette approche pourrait permettre de modéliser et éventuellement prédire les effets que pourraient avoir les PACs chez une personne, en prenant en compte divers facteurs tels que ses habitudes alimentaires, son mode de vie, son IMC et son historique de santé, entre autres. Cela serait préférable à une simple généralisation des impacts cliniques des PACs. Ainsi, en dépit de tous les effets potentiellement bénéfiques, il demeure actuellement impossible de formuler des recommandations de consommation en PP en comparaison avec les molécules pharmaceutiques et médicaments.

Il est vivement recommandé de consulter des professionnels de la santé avant d'initier la prise de suppléments nutritionnels riches en PP en raison de leurs possibles effets délétères à des doses élevées, même si une consommation d'aliments provenant de diverses sources est encouragée. Pour toutes ces raisons, l'acceptation des PP extraits de sources végétales comme traitement thérapeutique à grande échelle contre les pathologies métaboliques, en remplacement des médicaments, reste actuellement "chimérique". À ce jour, les PP tels que les PACs extraits de canneberges, sont proposés en suppléments et/ou peuvent être utilisés à des fins préventives, tout comme les conseils relatifs aux changements des habitudes alimentaires et de mode de vie. Il faut préciser que ces composés ne visent pas pour l'instant à remplacer les médicaments et les molécules pharmaceutiques couramment utilisés.

Néanmoins, pour approfondir la compréhension des mécanismes d'actions et renforcer la légitimité des PACs de canneberges en tant que molécule thérapeutique, une étude clinique débutera prochainement afin d'évaluer si tous les bienfaits de la consommation de PACs de canneberges sont transposables à des individus atteints de MAFLD. Cette démarche permettra d'identifier le rôle spécifique de ces PACs chez l'humain. De manière plus générale, cette initiative ouvrira la voie à de nouvelles stratégies préventives et thérapeutiques, mettant en lumière l'association entre la consommation des PACs, issus de la canneberge, et la protection de l'organisme.

Références bibliographiques

1. Cameron, A.J., J.E. Shaw, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2004. **33**(2): p. 351-75, table of contents.
2. Magliano, D., et al., *Epidemiology of metabolic syndrome*, in *THE EPIDEMIOLOGY of DIABETES MELLITUS*, J. Ekoe, et al., Editors. 2008, Wiley-Blackwell: Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK. p. 31-49.
3. Bonora, E., et al., *The Metabolic Syndrome is an independent predictor of cardiovascular disease in Type 2 diabetic subjects. Prospective data from the Verona Diabetes Complications Study*. Diabet Med, 2004. **21**(1): p. 52-8.
4. Morgan, M.W., N.E. Zamora, and M.F. Hindmarsh, *An inconvenient truth: a sustainable healthcare system requires chronic disease prevention and management transformation*. Healthc Pap, 2007. **7**(4): p. 6-23.
5. Rao, D., et al., *Syndrome métabolique et maladies chroniques*. 2014. **34**.
6. M, M., *The cost of chronic disease in Canada. Ottawa (ON): The Chronic Disease Prevention Alliance of Canada*. 2004.
7. Rapoport, J., et al., *Pour une mesure plus précise du fardeau économique associé aux maladies chroniques au Canada. Maladies chroniques au Canada*. 2004. **25**: p. 15-23.
8. Deen, D., *Metabolic syndrome: time for action*. American family physician, 2004. **69**(12): p. 2875-2882.
9. Rask Larsen, J., et al., *The pharmacological management of metabolic syndrome*. Expert Review of Clinical Pharmacology, 2018. **11**(4): p. 397-410.
10. Finicelli, M., et al., *Metabolic syndrome, Mediterranean diet, and polyphenols: Evidence and perspectives*. J Cell Physiol, 2019. **234**(5): p. 5807-5826.
11. Liu, K., M. Luo, and S. Wei, *The Bioprotective Effects of Polyphenols on Metabolic Syndrome against Oxidative Stress: Evidences and Perspectives*. Oxid Med Cell Longev, 2019. **2019**: p. 6713194.
12. Amiot, M.J., C. Riva, and A. Vinet, *Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review*. Obes Rev, 2016. **17**(7): p. 573-86.

13. Perez-Cano, F.J. and M. Castell, *Flavonoids, Inflammation and Immune System*. *Nutrients*, 2016. **8**(10).
14. Gil-Cardoso, K., et al., *Effects of flavonoids on intestinal inflammation, barrier integrity and changes in gut microbiota during diet-induced obesity*. *Nutr Res Rev*, 2016. **29**(2): p. 234-248.
15. Xia, H.M., et al., *Green tea polyphenols attenuate hepatic steatosis, and reduce insulin resistance and inflammation in high-fat diet-induced rats*. *Int J Mol Med*, 2019.
16. Serino, A. and G. Salazar, *Protective Role of Polyphenols against Vascular Inflammation, Aging and Cardiovascular Disease*. *Nutrients*, 2018. **11**(1).
17. Gormaz, J.G., et al., *Potential Role of Polyphenols in the Prevention of Cardiovascular Diseases: Molecular Bases*. *Curr Med Chem*, 2016. **23**(2): p. 115-28.
18. Rezzani, R. and C. Franco, *Liver, Oxidative Stress and Metabolic Syndromes*. *Nutrients*, 2021. **13**(2).
19. Rani, V., et al., *Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies*. *Life Sci*, 2016. **148**: p. 183-93.
20. Varghese, J.F., R. Patel, and U.C.S. Yadav, *Novel Insights in the Metabolic Syndrome-induced Oxidative Stress and Inflammation-mediated Atherosclerosis*. *Curr Cardiol Rev*, 2018. **14**(1): p. 4-14.
21. Monteiro, R. and I. Azevedo, *Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome*. *Mediators Inflamm*, 2010. **2010**.
22. Sandoval, V., et al., *Metabolic Impact of Flavonoids Consumption in Obesity: From Central to Peripheral*. *Nutrients*, 2020. **12**(8).
23. Salazar, J., et al., *Role of Dietary Polyphenols in Adipose Tissue Browning: A Narrative Review*. *Curr Pharm Des*, 2020. **26**(35): p. 4444-4460.
24. Kishimoto, Y., M. Tani, and K. Kondo, *Pleiotropic preventive effects of dietary polyphenols in cardiovascular diseases*. *Eur J Clin Nutr*, 2013. **67**(5): p. 532-5.
25. Cheng, L.K., et al., *Gastrointestinal system*. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2010. **2**(1): p. 65-79.

26. Shimizu, M., *Interaction between food substances and the intestinal epithelium*. Biosci Biotechnol Biochem, 2010. **74**(2): p. 232-41.
27. Shimizu, M. and D.O. Son, *Food-derived peptides and intestinal functions*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(9): p. 885-95.
28. Sarna, S.K. and M.F. Otterson, *Small intestinal physiology and pathophysiology*. Gastroenterol Clin North Am, 1989. **18**(2): p. 375-404.
29. Boulangé, C.L., et al., *Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease*. Genome Med, 2016. **8**(1): p. 42.
30. Galland, L., *The gut microbiome and the brain*. Journal of Medicinal Food, 2014. **17**(12): p. 1261-72.
31. Neuman, H., et al., *Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system*. FEMS Microbiol Rev, 2015. **39**(4): p. 509-21.
32. Hur, K. and M. Lee, *Gut Microbiota and Metabolic Disorders*. Diabetes & metabolism journal, 2015. **39**(3): p. 198-203.
33. Tang, W.H., T. Kitai, and S.L. Hazen, *Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease*. Circ Res, 2017. **120**(7): p. 1183-1196.
34. Biswas, K., et al., *A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical*. J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 10993-1001.
35. Sánchez, S., et al., *Effects of dipyron on inflammatory infiltration and oxidative metabolism in gastric mucosa: comparison with acetaminophen and diclofenac*. Dig Dis Sci, 2002. **47**(6): p. 1389-98.
36. Parks, D.A., T.K. Williams, and J.S. Beckman, *Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation*. Am J Physiol, 1988. **254**(5 Pt 1): p. G768-74.
37. Kruidenier, L. and H.W. Verspaget, *Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous?* Aliment Pharmacol Ther, 2002. **16**(12): p. 1997-2015.
38. Fiocchi, C., *Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis*. Gastroenterology, 1998. **115**(1): p. 182-205.

39. Nishikawa, M., et al., *Accumulation of mitochondrial DNA mutation with colorectal carcinogenesis in ulcerative colitis*. Br J Cancer, 2005. **93**(3): p. 331-7.
40. Rezaie, A., R.D. Parker, and M. Abdollahi, *Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause?* Dig Dis Sci, 2007. **52**(9): p. 2015-21.
41. Pravda, J., *Radical induction theory of ulcerative colitis*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(16): p. 2371-84.
42. Rius-Pérez, S., et al., *PGC-1 α , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism*. Oxid Med Cell Longev, 2020. **2020**: p. 1452696.
43. Mansouri, A., C.H. Gattolliat, and T. Asselah, *Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases*. Gastroenterology, 2018. **155**(3): p. 629-647.
44. Tomas-Barberan, F.A., M.V. Selma, and J.C. Espin, *Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2016. **19**(6): p. 471-476.
45. Faria, A., et al., *Interplay between anthocyanins and gut microbiota*. J Agric Food Chem, 2014. **62**(29): p. 6898-902.
46. Schlienger, J.L. and L. Monnier, *Le syndrome métabolique a déjà une histoire*. Médecine des Maladies Métaboliques, 2016. **10**(1): p. 75-80.
47. Sarafidis, P.A. and P.M. Nilsson, *The metabolic syndrome: a glance at its history*. J Hypertens, 2006. **24**(4): p. 621-6.
48. Lemieux, I. and J.P. Després, *Metabolic Syndrome: Past, Present and Future*. Nutrients, 2020. **12**(11).
49. Huang, P.L., *A comprehensive definition for metabolic syndrome*. Disease models & mechanisms, 2009. **2**(5-6): p. 231-237.
50. Rochlani, Y., et al., *Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds*. Therapeutic advances in cardiovascular disease, 2017. **11**(8): p. 215-225.
51. Heindel, J.J., et al., *Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders*. Reprod Toxicol, 2017. **68**: p. 3-33.

52. Gluvic, Z., et al., *Link between Metabolic Syndrome and Insulin Resistance*. Curr Vasc Pharmacol, 2017. **15**(1): p. 30-39.
53. Carrier, A., *Metabolic Syndrome and Oxidative Stress: A Complex Relationship*. Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(9): p. 429-431.
54. Canada, M.s. *Metabolic syndrome is a health crisis hiding in plain sight*. Available from: <https://www.metabolicsyndromecanada.ca/mets>.
55. Cheng, Z., L. Zheng, and F.A. Almeida, *Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: nutritional factors and beyond*. J Nutr Biochem, 2018. **54**: p. 1-10.
56. Marotz, C.A. and A. Zarrinpar, *Treating Obesity and Metabolic Syndrome with Fecal Microbiota Transplantation*. Yale J Biol Med, 2016. **89**(3): p. 383-388.
57. Rani, V., et al., *Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies*. Life Sciences, 2016. **148**: p. 183-193.
58. Mousavi, S.M., et al., *Effect of Nigella sativa supplementation on obesity indices: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Complement Ther Med, 2018. **38**: p. 48-57.
59. Mohammed, M.S., et al., *Systems and WBANs for Controlling Obesity*. J Healthc Eng, 2018. **2018**: p. 1564748.
60. Fitzgerald, F.T., *The problem of obesity*. Annu Rev Med, 1981. **32**: p. 221-31.
61. Schetz, M., et al., *Obesity in the critically ill: a narrative review*. Intensive Care Med, 2019. **45**(6): p. 757-769.
62. Blüher, M., *Obesity: global epidemiology and pathogenesis*. Nat Rev Endocrinol, 2019. **15**(5): p. 288-298.
63. Caballero, B., *Humans against Obesity: Who Will Win?* Adv Nutr, 2019. **10**(suppl_1): p. S4-s9.
64. Bessesen, D.H., *Update on obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(6): p. 2027-34.
65. Hruby, A. and F.B. Hu, *The Epidemiology of Obesity: A Big Picture*. Pharmacoeconomics, 2015. **33**(7): p. 673-89.
66. Matta, J., et al., *[French and worldwide epidemiology of obesity]*. Presse Med, 2018. **47**(5): p. 434-438.

67. <obes-fra.pdf>.
68. Dietz, W.H., *Obesity*. J Am Coll Nutr, 1989. **8 Suppl**: p. 13s-21s.
69. Després, J.P. and I. Lemieux, *Abdominal obesity and metabolic syndrome*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 881-7.
70. Engin, A., *The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome*. Adv Exp Med Biol, 2017. **960**: p. 1-17.
71. Saltiel, A.R. and J.M. Olefsky, *Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease*. J Clin Invest, 2017. **127**(1): p. 1-4.
72. Malone, J.I. and B.C. Hansen, *Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (T2DM)? Or is it the opposite?* Pediatr Diabetes, 2019. **20**(1): p. 5-9.
73. Gadde, K.M., et al., *Obesity: Pathophysiology and Management*. J Am Coll Cardiol, 2018. **71**(1): p. 69-84.
74. Gallagher, E.J. and D. LeRoith, *Obesity and Diabetes: The Increased Risk of Cancer and Cancer-Related Mortality*. Physiol Rev, 2015. **95**(3): p. 727-48.
75. Bray, G.A., *Medical consequences of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2583-9.
76. Haslam, D.W. and W.P. James, *Obesity*. Lancet, 2005. **366**(9492): p. 1197-209.
77. Barness, L.A., J.M. Opitz, and E. Gilbert-Barness, *Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects*. Am J Med Genet A, 2007. **143a**(24): p. 3016-34.
78. Allison, D.B., et al., *Annual deaths attributable to obesity in the United States*. Jama, 1999. **282**(16): p. 1530-8.
79. Boucher, J., A. Kleinridders, and C.R. Kahn, *Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(1).
80. Rask-Madsen, C. and C.R. Kahn, *Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2012. **32**(9): p. 2052-2059.
81. Lauterbach, M.A.R. and F.T. Wunderlich, *Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance*. Pflugers Archiv : European journal of physiology, 2017. **469**(3-4): p. 385-396.

82. Lebovitz, H.E., *Insulin resistance: definition and consequences*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2001. **109 Suppl 2**: p. S135-48.
83. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
84. Posner, B.I., *Insulin Signalling: The Inside Story*. Can J Diabetes, 2017. **41**(1): p. 108-113.
85. Kido, Y., J. Nakae, and D. Accili, *The Insulin Receptor and Its Cellular Targets1*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001. **86**(3): p. 972-979.
86. Gutmann, T., et al., *Visualization of ligand-induced transmembrane signaling in the full-length human insulin receptor*. The Journal of cell biology, 2018. **217**(5): p. 1643-1649.
87. Gutmann, T., et al., *Cryo-EM structure of the complete and ligand-saturated insulin receptor ectodomain*. J Cell Biol, 2020. **219**(1).
88. Cusabio. *Insulin signaling pathway*. Available from: <https://www.cusabio.com/pathway/Insulin-signaling-pathway.html>.
89. Le Roith, D. and Y. Zick, *Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance*. Diabetes care, 2001. **24**(3): p. 588-597.
90. Gürol, T., C. Lufen, and Z.G. Cem, *A central role for JNK in obesity and insulin resistance*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 333-336.
91. White, M.F., *IRS proteins and the common path to diabetes*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 2002. **283**(3): p. E413-E422.
92. Rui, L., et al., *Insulin/IGF-1 and TNF- α stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser 307 via distinct pathways*. The Journal of clinical investigation, 2001. **107**(2): p. 181-189.
93. Lee, Y.H., et al., *c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(5): p. 2896-2902.
94. Eugene, F.d.T. and G.D. Daniel, *Myocardial Insulin Resistance: An Overview of Its Causes, Effects, and Potential Therapy*, in *Insulin Resistance*, A. Sarika, Editor. 2012, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 8.
95. Rhodes, C.J., et al., *Direct autocrine action of insulin on β -cells: does it make physiological sense?* Diabetes, 2013. **62**(7): p. 2157-63.

96. Petersen, K.F. and G.I. Shulman, *Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus*. The American journal of cardiology, 2002. **90**(5): p. 11-18.
97. Minokoshi, Y., et al., *Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nature, 2002. **415**(6869): p. 339-343.
98. Minokoshi, Y., et al., *AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus*. Nature, 2004. **428**(6982): p. 569-574.
99. Thomas, D.D., et al., *Hyperinsulinemia: an early indicator of metabolic dysfunction*. Journal of the Endocrine Society, 2019. **3**(9): p. 1727-1747.
100. Nolan, C.J. and M. Prentki, *Insulin resistance and insulin hypersecretion in the metabolic syndrome and type 2 diabetes: Time for a conceptual framework shift*. Diabetes and Vascular Disease Research, 2019. **16**(2): p. 118-127.
101. Gavin, J.R., 3rd, et al., *Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(1): p. 84-8.
102. Le Marchand, Y., et al., *Effect of fasting and streptozotocin in the obese-hyperglycemic (ob/ob) mouse. Apparent lack of a direct relationship between insulin binding and insulin effects*. Diabetes, 1977. **26**(6): p. 582-90.
103. Zick, Y., *Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003. **27 Suppl 3**: p. S56-60.
104. Rizza, R.A., et al., *Production of insulin resistance by hyperinsulinaemia in man*. Diabetologia, 1985. **28**(2): p. 70-5.
105. Matthews, D.R., et al., *Pulsatile insulin has greater hypoglycemic effect than continuous delivery*. Diabetes, 1983. **32**(7): p. 617-21.
106. Schmitz, O., et al., *Glucose uptake and pulsatile insulin infusion: euglycaemic clamp and [3-3H]glucose studies in healthy subjects*. Acta Endocrinol (Copenh), 1986. **113**(4): p. 559-63.
107. Paolisso, G., et al., *Pulsatile insulin delivery is more efficient than continuous infusion in modulating islet cell function in normal subjects and patients with type 1 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 1988. **66**(6): p. 1220-6.

108. Paolisso, G., et al., *Pulsatile insulin delivery has greater metabolic effects than continuous hormone administration in man: importance of pulse frequency*. J Clin Endocrinol Metab, 1991. **72**(3): p. 607-15.
109. Paolisso, G., et al., *Pulsatile glucagon has greater hyperglycaemic, lipolytic and ketogenic effects than continuous hormone delivery in man: effect of age*. Diabetologia, 1990. **33**(5): p. 272-7.
110. Paolisso, G., et al., *Greater efficacy of pulsatile insulin in type I diabetics critically depends on plasma glucagon levels*. Diabetes, 1987. **36**(5): p. 566-70.
111. Bratusch-Marrain, P.R., M. Komjati, and W.K. Waldhäusl, *Efficacy of pulsatile versus continuous insulin administration on hepatic glucose production and glucose utilization in type I diabetic humans*. Diabetes, 1986. **35**(8): p. 922-6.
112. Koopmans, S.J., et al., *Pulsatile intravenous insulin replacement in streptozotocin diabetic rats is more efficient than continuous delivery: effects on glycaemic control, insulin-mediated glucose metabolism and lipolysis*. Diabetologia, 1996. **39**(4): p. 391-400.
113. Shanik, M.H., et al., *Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse?* Diabetes Care, 2008. **31 Suppl 2**: p. S262-8.
114. Lang, D.A., et al., *Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings*. N Engl J Med, 1979. **301**(19): p. 1023-7.
115. Hansen, B.C., et al., *Rapid oscillations in plasma insulin, glucagon, and glucose in obese and normal weight humans*. J Clin Endocrinol Metab, 1982. **54**(4): p. 785-92.
116. Simon, C., M. Follenius, and G. Brandenberger, *Postprandial oscillations of plasma glucose, insulin and C-peptide in man*. Diabetologia, 1987. **30**(10): p. 769-73.
117. Polonsky, K.S., B.D. Given, and E. Van Cauter, *Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects*. J Clin Invest, 1988. **81**(2): p. 442-8.
118. Xing, J. and C. Chen, *Hyperinsulinemia: beneficial or harmful or both on glucose homeostasis*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2022. **323**(1): p. E2-E7.

119. Lu, H., et al., *Combined hyperglycemia-and hyperinsulinemia-induced insulin resistance in adipocytes is associated with dual signaling defects mediated by PKC- ζ* . *Endocrinology*, 2018. **159**(4): p. 1658-1677.
120. Walker, R.E., et al., *Trafficking of nonesterified fatty acids in insulin resistance and relationship to dysglycemia*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2020. **318**(3): p. E392-E404.
121. Xiao, Y., et al., *Deficiency of PRKD2 triggers hyperinsulinemia and metabolic disorders*. *Nature Communications*, 2018. **9**(1): p. 2015.
122. Kolb, H., et al., *Insulin: too much of a good thing is bad*. *BMC medicine*, 2020. **18**: p. 1-12.
123. Chen, X.-Y., et al., *Brain-selective kinase 2 (BRSK2) phosphorylation on PCTAIRE1 negatively regulates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 2012. **287**(36): p. 30368-30375.
124. Gradel, A.K.J., et al., *Factors affecting the absorption of subcutaneously administered insulin: effect on variability*. *Journal of diabetes research*, 2018. **2018**.
125. DeMeyts, P., A.R. Bainco, and J. Roth, *Site-site interactions among insulin receptors. Characterization of the negative cooperativity*. *J Biol Chem*, 1976. **251**(7): p. 1877-88.
126. Whittaker, J., et al., *Transmembrane domain interactions are necessary for negative cooperativity of the insulin receptor*. *Mol Endocrinol*, 1994. **8**(11): p. 1521-7.
127. de Meyts, P., et al., *Insulin interactions with its receptors: experimental evidence for negative cooperativity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1973. **55**(1): p. 154-61.
128. Seino, S. and G.I. Bell, *Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **159**(1): p. 312-6.
129. Zick, Y., et al., *Insulin stimulates phosphorylation of serine residues in soluble insulin receptors*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983. **116**(3): p. 1129-35.
130. Kusari, J., et al., *Skeletal muscle protein tyrosine phosphatase activity and tyrosine phosphatase 1B protein content are associated with insulin action and resistance*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(3): p. 1156-62.
131. Krebs, D.L. and D.J. Hilton, *A new role for SOCS in insulin action. Suppressor of cytokine signaling*. *Sci STKE*, 2003. **2003**(169): p. Pe6.

132. Zick, Y., *Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(11): p. 437-41.
133. Paz, K., 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. **272**(47): p. 29911-8.
134. Dandona, P., A. Aljada, and A. Bandyopadhyay, *Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes*. Trends Immunol, 2004. **25**(1): p. 4-7.
135. Roth, J., et al., *The obesity pandemic: where have we been and where are we going?* Obes Res, 2004. **12 Suppl 2**: p. 88s-101s.
136. Andrali, S.S., et al., *Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic β -cells*. Biochemical Journal, 2008. **415**(1): p. 1-10.
137. Artner, I. and R. Stein, *Transcriptional regulation of insulin gene expression*. Pancreatic Beta Cell in Health and Disease, 2008: p. 13-30.
138. Ashcroft, F.M. and P. Rorsman, *Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years*. Cell, 2012. **148**(6): p. 1160-1171.
139. Skovsø, S., et al., *Beta-cell specific *Insr* deletion promotes insulin hypersecretion and improves glucose tolerance prior to global insulin resistance*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 735.
140. Campbell, J.E. and C.B. Newgard, *Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. **22**(2): p. 142-158.
141. Nolan, C.J. and M. Prentki, *Insulin resistance and insulin hypersecretion in the metabolic syndrome and type 2 diabetes: Time for a conceptual framework shift*. Diab Vasc Dis Res, 2019. **16**(2): p. 118-127.
142. Poitout, V., et al., *Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2010. **1801**(3): p. 289-298.
143. Thumelin, S., et al., *Fatty acids rapidly induce the carnitine palmitoyltransferase I gene in the pancreatic β -cell line INS-1*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(3): p. 1659-1664.

144. Boucher, A., et al., *Biochemical mechanism of lipid-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion and reversal with a malate analogue*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(26): p. 27263-27271.
145. Jensen, M.V., et al., *Compensatory responses to pyruvate carboxylase suppression in islet β -cells: Preservation of glucose-stimulated insulin secretion*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(31): p. 22342-22351.
146. Yan, Z., et al., *High-fat-diet-induced remission of diabetes in a subset of KATP-GOF insulin-secretory-deficient mice*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2018. **20**(11): p. 2574-2584.
147. Srivastava, S., et al., *Regulation of KATP channel trafficking in pancreatic β -cells by protein histidine phosphorylation*. Diabetes, 2018. **67**(5): p. 849-860.
148. Song, S.H., et al., *Direct measurement of pulsatile insulin secretion from the portal vein in human subjects*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2000. **85**(12): p. 4491-4499.
149. Porksen, N., et al., *Pulsatile insulin secretion accounts for 70% of total insulin secretion during fasting*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 1995. **269**(3): p. E478-E488.
150. Matveyenko, A.V., et al., *Pulsatile portal vein insulin delivery enhances hepatic insulin action and signaling*. Diabetes, 2012. **61**(9): p. 2269-2279.
151. Meier, J.J., J.D. Veldhuis, and P.C. Butler, *Pulsatile insulin secretion dictates systemic insulin delivery by regulating hepatic insulin extraction in humans*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1649-1656.
152. Stevenson, R., A. Cherrington, and K. Steiner, *The relationship between plasma concentration and disappearance rate of immunoreactive insulin in the conscious dog*. Hormone and metabolic research, 1985. **17**(11): p. 551-553.
153. Ader, M., et al., *Hepatic insulin clearance is the primary determinant of insulin sensitivity in the normal dog*. Obesity, 2014. **22**(5): p. 1238-1245.
154. Jung, S.-H., et al., *Adapting to insulin resistance in obesity: role of insulin secretion and clearance*. Diabetologia, 2018. **61**(3): p. 681-687.

155. Kurauti, M.A., et al., *Interleukin-6 increases the expression and activity of insulin-degrading enzyme*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 46750.
156. Gregory, J.M., et al., *Aerobic exercise training improves hepatic and muscle insulin sensitivity, but reduces splanchnic glucose uptake in obese humans with type 2 diabetes*. Nutrition & diabetes, 2019. **9**(1): p. 25.
157. DeFronzo, R.A. and D. Tripathy, *Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes*. Diabetes care, 2009. **32**(suppl_2): p. S157-S163.
158. Michael, M.D., et al., *Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction*. Molecular cell, 2000. **6**(1): p. 87-97.
159. Shimomura, I., et al., *Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice*. Molecular cell, 2000. **6**(1): p. 77-86.
160. Biddinger, S.B., et al., *Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis*. Cell metabolism, 2008. **7**(2): p. 125-134.
161. Wu, H. and C.M. Ballantyne, *Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity*. The Journal of clinical investigation, 2017. **127**(1): p. 43-54.
162. Bruning, J., et al., *D., Goodyear, LJ & Kahn, CR (1998) A muscle specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance*. Mol. Cell. **2**: p. 559-569.
163. Banks, W.A., J.B. Owen, and M.A. Erickson, *Insulin in the brain: there and back again*. Pharmacol Ther, 2012. **136**(1): p. 82-93.
164. Pocai, A., et al., *Hypothalamic KATP channels control hepatic glucose production*. Nature, 2005. **434**(7036): p. 1026-1031.
165. Benoit, S.C., et al., *The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins*. Journal of Neuroscience, 2002. **22**(20): p. 9048-9052.
166. Dash, S., et al., *Is Insulin Action in the Brain Relevant in Regulating Blood Glucose in Humans?* J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(7): p. 2525-31.
167. Luiken, J.J., et al., *Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 3113-9.

168. Rask-Madsen, C., et al., *Loss of insulin signaling in vascular endothelial cells accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E null mice*. Cell metabolism, 2010. **11**(5): p. 379-389.
169. Soeters, M.R. and P.B. Soeters, *The evolutionary benefit of insulin resistance*. Clin Nutr, 2012. **31**(6): p. 1002-7.
170. Soeters, M.R., et al., *Muscle adaptation to short-term fasting in healthy lean humans*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2008. **93**(7): p. 2900-2903.
171. Vendelbo, M.H., et al., *Insulin resistance after a 72-h fast is associated with impaired AS160 phosphorylation and accumulation of lipid and glycogen in human skeletal muscle*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2012. **302**(2): p. E190-E200.
172. Rodríguez-Mañás, L., et al., *Dual effects of insulin resistance on mortality and function in non-diabetic older adults: findings from the Toledo Study of Healthy Aging*. Geroscience, 2022. **44**(2): p. 1095-1108.
173. Sharples, A.P., et al., *Longevity and skeletal muscle mass: the role of IGF signalling, the sirtuins, dietary restriction and protein intake*. Aging cell, 2015. **14**(4): p. 511-523.
174. Johnson, S.C., P.S. Rabinovitch, and M. Kaeberlein, *mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease*. Nature, 2013. **493**(7432): p. 338-345.
175. DiLoreto, R. and C.T. Murphy, *The cell biology of aging*. Molecular biology of the cell, 2015. **26**(25): p. 4524-4531.
176. Roth, G.S., et al., *Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans*. Science, 2002. **297**(5582): p. 811-811.
177. Erol, A., *Insulin resistance is an evolutionarily conserved physiological mechanism at the cellular level for protection against increased oxidative stress*. Bioessays, 2007. **29**(8): p. 811-8.
178. Choe, S.S., et al., *Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders*. Front Endocrinol (Lausanne), 2016. **7**: p. 30.
179. Stöhr, O., et al., *FoxO1 suppresses Fgf21 during hepatic insulin resistance to impair peripheral glucose utilization and acute cold tolerance*. Cell Rep, 2021. **34**(12): p. 108893.

180. Barzilai, N. and L. Ferrucci, *Insulin Resistance and Aging: A Cause or a Protective Response?* The Journals of Gerontology: Series A, 2012. **67**(12): p. 1329-1331.
181. Fernández-Real, J.M. and W. Ricart, *Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness.* Diabetologia, 1999. **42**(11): p. 1367-74.
182. Li, L. and J.L. Messina, *Acute insulin resistance following injury.* Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(9): p. 429-35.
183. Nolan, C.J., N.B. Ruderman, and M. Prentki, *Intensive insulin for type 2 diabetes: the risk of causing harm.* The Lancet Diabetes & Endocrinology, 2013. **1**(1): p. 9-10.
184. Nolan, C.J., et al., *Insulin resistance as a physiological defense against metabolic stress: implications for the management of subsets of type 2 diabetes.* Diabetes, 2015. **64**(3): p. 673-686.
185. Taegtmeyer, H., et al., *Insulin resistance protects the heart from fuel overload in dysregulated metabolic states.* American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2013. **305**(12): p. H1693-H1697.
186. Prentki, M. and C.J. Nolan, *Islet β cell failure in type 2 diabetes.* The Journal of clinical investigation, 2006. **116**(7): p. 1802-1812.
187. Chess, D.J. and W.C. Stanley, *Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure.* Cardiovascular research, 2008. **79**(2): p. 269-278.
188. Brownlee, M., *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism.* diabetes, 2005. **54**(6): p. 1615-1625.
189. El-Assaad, W., et al., *Glucolipotoxicity alters lipid partitioning and causes mitochondrial dysfunction, cholesterol, and ceramide deposition and reactive oxygen species production in INS832/13 ss-cells.* Endocrinology, 2010. **151**(7): p. 3061-3073.
190. Ruderman, N. and M. Prentki, *AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome.* Nature reviews Drug discovery, 2004. **3**(4): p. 340-351.
191. Hoehn, K.L., et al., *Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(42): p. 17787-17792.

192. Savini, I., et al., *Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(5): p. 10497-538.
193. Codoñer-Franch, P., et al., *Elevated advanced oxidation protein products (AOPPs) indicate metabolic risk in severely obese children*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2012. **22**(3): p. 237-43.
194. Sies, H., W. Stahl, and A. Sevanian, *Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress*. J Nutr, 2005. **135**(5): p. 969-72.
195. Dandona, P., et al., *Macronutrient intake induces oxidative and inflammatory stress: potential relevance to atherosclerosis and insulin resistance*. Exp Mol Med, 2010. **42**(4): p. 245-53.
196. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 813-20.
197. Maddux, B.A., et al., *Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid*. Diabetes, 2001. **50**(2): p. 404-10.
198. Matsuoka, T., et al., *Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells*. J Clin Invest, 1997. **99**(1): p. 144-50.
199. Nakazono, K., et al., *Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(22): p. 10045-8.
200. Ohara, Y., T.E. Peterson, and D.G. Harrison, *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2546-51.
201. Lee, H., et al., *Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion*. J Biol Chem, 2009. **284**(16): p. 10601-9.
202. Tormos, K.V., et al., *Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation*. Cell Metab, 2011. **14**(4): p. 537-44.
203. Henriksen, E.J., M.K. Diamond-Stanic, and E.M. Marchionne, *Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(5): p. 993-9.

204. Furukawa, S., et al., *Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome*. The Journal of clinical investigation, 2004. **114**(12): p. 1752-1761.
205. Furukawa, S., et al., *Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome*. J Clin Invest, 2004. **114**(12): p. 1752-61.
206. Fortuño, A., et al., *Phagocytic NADPH oxidase overactivity underlies oxidative stress in metabolic syndrome*. Diabetes, 2006. **55**(1): p. 209-15.
207. Yaribeygi, H., et al., *Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms*. J Cell Physiol, 2019. **234**(6): p. 8152-8161.
208. Ziolkowska, S., et al., *The Interplay between Insulin Resistance, Inflammation, Oxidative Stress, Base Excision Repair and Metabolic Syndrome in Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. International journal of molecular sciences, 2021. **22**(20): p. 11128.
209. Schieber, M. and N.S. Chandel, *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. Curr Biol, 2014. **24**(10): p. R453-62.
210. Marinho, H.S., et al., *Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors*. Redox Biol, 2014. **2**: p. 535-62.
211. Rezzani, R. and C. Franco, *Liver, Oxidative Stress and Metabolic Syndromes*. Nutrients, 2021. **13**(2): p. 301.
212. Bitar, M.S., E. Al-Saleh, and F. Al-Mulla, *Oxidative stress--mediated alterations in glucose dynamics in a genetic animal model of type II diabetes*. Life Sci, 2005. **77**(20): p. 2552-73.
213. Hançer, N.J., et al., *Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation*. The Journal of biological chemistry, 2014. **289**(18): p. 12467-12484.
214. Tun, S., et al., *Therapeutic Efficacy of Antioxidants in Ameliorating Obesity Phenotype and Associated Comorbidities*. Frontiers in Pharmacology, 2020. **11**.
215. Blaser, H., et al., *TNF and ROS Crosstalk in Inflammation*. Trends Cell Biol, 2016. **26**(4): p. 249-261.
216. Morgan, M.J. and Z.-g. Liu, *Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling*. Cell research, 2011. **21**(1): p. 103-115.

217. Liu, G.H., J. Qu, and X. Shen, *NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(5): p. 713-27.
218. Wardyn, J.D., A.H. Ponsford, and C.M. Sanderson, *Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF-kB response pathways*. *Biochemical society transactions*, 2015. **43**(4): p. 621-626.
219. Liu, G.-H., J. Qu, and X. Shen, *NF-kB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2008. **1783**(5): p. 713-727.
220. Yu, M., et al., *Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway*. *Cellular signalling*, 2011. **23**(5): p. 883-892.
221. Esser, N., et al., *Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014. **105**(2): p. 141-50.
222. Nijhuis, J., et al., *Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation*. *Obesity (Silver Spring)*, 2009. **17**(11): p. 2014-8.
223. Qatanani, M. and M.A. Lazar, *Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu*. *Genes Dev*, 2007. **21**(12): p. 1443-55.
224. Serhan, C.N., *Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 101-37.
225. Lawrence, T. and D.W. Gilroy, *Chronic inflammation: a failure of resolution?* *Int J Exp Pathol*, 2007. **88**(2): p. 85-94.
226. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. *Nature*, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
227. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
228. Hotamisligil, G.S., et al., *Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1995. **95**(5): p. 2409-2415.

229. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
230. O'Rourke, R.W., et al., *Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells*. Diabetologia, 2011. **54**(6): p. 1480-1490.
231. Skurk, T., et al., *Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007. **92**(3): p. 1023-1033.
232. Esser, N., et al., *Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue*. Diabetologia, 2013. **56**(11): p. 2487-2497.
233. Wolowczuk, I., et al., *Feeding our immune system: impact on metabolism*. Clin Dev Immunol, 2008. **2008**: p. 639803.
234. Raetz, C.R., *Biochemistry of endotoxins*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 129-70.
235. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(9): p. 372-7.
236. Gregor, M.F. and G.S. Hotamisligil, *Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease*. J Lipid Res, 2007. **48**(9): p. 1905-14.
237. Cai, D., et al., *Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B*. Nature medicine, 2005. **11**(2): p. 183-190.
238. Fink, L.N., et al., *Expression of anti-inflammatory macrophage genes within skeletal muscle correlates with insulin sensitivity in human obesity and type 2 diabetes*. Diabetologia, 2013. **56**(7): p. 1623-1628.
239. Donath, M.Y. and S.E. Shoelson, *Type 2 diabetes as an inflammatory disease*. Nature Reviews Immunology, 2011. **11**(2): p. 98-107.
240. Maedler, K., et al., *Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets*. J Clin Invest, 2002. **110**(6): p. 851-60.
241. Dinarello, C.A., *Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family*. Annual Review of Immunology, 2009. **27**(1): p. 519-550.

242. Kopp, H.P., et al., *Impact of Weight Loss on Inflammatory Proteins and Their Association With the Insulin Resistance Syndrome in Morbidly Obese Patients*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2003. **23**(6): p. 1042-1047.
243. Fahed, G., et al., *Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021*. *International journal of molecular sciences*, 2022. **23**(2): p. 786.
244. Pickup, J.C., et al., *NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X*. *Diabetologia*, 1997. **40**(11): p. 1286-92.
245. Yudkin, J.S., et al., *C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(4): p. 972-8.
246. Bastard, J.P., et al., *Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(9): p. 3338-42.
247. Haffner, S., et al., *Diabetes Prevention Program Research Group Intensive lifestyle intervention or metformin on inflammation and coagulation in participants with impaired glucose tolerance*. *Diabetes*, 2005. **54**(5): p. 1566-1572.
248. Bruun, J.M., et al., *Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2006. **290**(5): p. E961-E967.
249. Belalcazar, L.M., et al., *Lifestyle intervention and/or statins for the reduction of C-reactive protein in type 2 diabetes: From the look AHEAD study*. *Obesity*, 2013. **21**(5): p. 944-950.
250. Jager, A., et al., *von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(12): p. 3071-8.
251. Saito, I., et al., *Nontraditional Risk Factors for Coronary Heart Disease Incidence among Persons with Diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. *Annals of Internal Medicine*, 2000. **133**(2): p. 81-91.

252. Best, L.G., et al., *C-reactive protein as a predictor of cardiovascular risk in a population with a high prevalence of diabetes: the Strong Heart Study*. *Circulation*, 2005. **112**(9): p. 1289-95.
253. Kengne, A.P., et al., *Association of C-Reactive Protein With Cardiovascular Disease Mortality According to Diabetes Status: Pooled analyses of 25,979 participants from four U.K. prospective cohort studies*. *Diabetes Care*, 2012. **35**(2): p. 396-403.
254. Lowe, G., et al., *Circulating Inflammatory Markers and the Risk of Vascular Complications and Mortality in People With Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease or Risk Factors: The ADVANCE Study*. *Diabetes*, 2014. **63**(3): p. 1115-1123.
255. Bigornia, S.J., et al., *Long-term successful weight loss improves vascular endothelial function in severely obese individuals*. *Obesity (Silver Spring)*, 2010. **18**(4): p. 754-9.
256. Divajeva, D., et al., *Economics of chronic diseases protocol: cost-effectiveness modelling and the future burden of non-communicable disease in Europe*. *BMC Public Health*, 2014. **14**: p. 456.
257. Li, Y., et al., *Agent-Based Modeling of Chronic Diseases: A Narrative Review and Future Research Directions*. *Prev Chronic Dis*, 2016. **13**: p. E69.
258. van Zwieten, P.A. and G. Mancia, *Background and treatment of metabolic syndrome: a therapeutic challenge*. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*, 2006. **10**(3): p. 206-14.
259. Castro-Barquero, S., et al., *Dietary Strategies for Metabolic Syndrome: A Comprehensive Review*. *Nutrients*, 2020. **12**(10).
260. Ryan, K.K., et al., *FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy*. *Nature*, 2014. **509**(7499): p. 183-8.
261. Ginsberg, H.N., *Treatment for patients with the metabolic syndrome*. *Am J Cardiol*, 2003. **91**(7a): p. 29e-39e.
262. Tak, Y.J. and S.Y. Lee, *Long-Term Efficacy and Safety of Anti-Obesity Treatment: Where Do We Stand?* *Curr Obes Rep*, 2021. **10**(1): p. 14-30.
263. Quinn, K.J. and N.H. Shah, *A dataset quantifying polypharmacy in the United States*. *Scientific data*, 2017. **4**: p. 170167-170167.

264. Grundy, S.M., *Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy*. Nature Reviews Drug Discovery, 2006. **5**(4): p. 295-309.
265. McKeown, N.M., et al., *Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort*. Diabetes Care, 2004. **27**(2): p. 538-46.
266. Spahis, S., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease severity and metabolic complications in obese children: impact of omega-3 fatty acids*. J Nutr Biochem, 2018. **58**: p. 28-36.
267. Sabaté, J. and M. Wien, *A perspective on vegetarian dietary patterns and risk of metabolic syndrome*. Br J Nutr, 2015. **113 Suppl 2**: p. S136-43.
268. Esmailzadeh, A., P. Mirmiran, and F. Azizi, *Whole-grain consumption and the metabolic syndrome: a favorable association in Tehranian adults*. European Journal of Clinical Nutrition, 2005. **59**(3): p. 353-362.
269. Mallappa, R.H., et al., *Management of metabolic syndrome through probiotic and prebiotic interventions*. Indian journal of endocrinology and metabolism, 2012. **16**(1): p. 20-27.
270. Martinez-Gonzalez, M.A., A. Gea, and M. Ruiz-Canela, *The Mediterranean Diet and Cardiovascular Health*. Circ Res, 2019. **124**(5): p. 779-798.
271. Zarrinpar, A., A. Chaix, and S. Panda, *Daily Eating Patterns and Their Impact on Health and Disease*. Trends Endocrinol Metab, 2016. **27**(2): p. 69-83.
272. Thompson, H.J., *It Is Really Simple: Foods and Human Health, The Whole Story*. Nutrients, 2020. **12**(7).
273. Tremblay, A. and F. Bellisle, *Nutrients, satiety, and control of energy intake*. Appl Physiol Nutr Metab, 2015. **40**(10): p. 971-9.
274. Mathers, J.C., *Nutrigenomics in the modern era*. Proc Nutr Soc, 2017. **76**(3): p. 265-275.
275. Ronis, M.J.J., K.B. Pedersen, and J. Watt, *Adverse Effects of Nutraceuticals and Dietary Supplements*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2018. **58**: p. 583-601.
276. Aronson, J.K., *Defining 'nutraceuticals': neither nutritious nor pharmaceutical*. Br J Clin Pharmacol, 2017. **83**(1): p. 8-19.

277. Elia, M., *Defining, Recognizing, and Reporting Malnutrition*. Int J Low Extrem Wounds, 2017. **16**(4): p. 230-237.
278. Birlouez, I., et al., *[Vitamin deficiency and malnutrition]*. Ann Biol Clin (Paris), 2002. **60**(4): p. 443-50.
279. Moulas, A.N. and M. Vaiou, *Vitamin D fortification of foods and prospective health outcomes*. J Biotechnol, 2018. **285**: p. 91-101.
280. Bouga, M., M.E.J. Lean, and E. Combet, *Contemporary challenges to iodine status and nutrition: the role of foods, dietary recommendations, fortification and supplementation*. Proc Nutr Soc, 2018. **77**(3): p. 302-313.
281. Shah, D., et al., *Fortification of staple foods with zinc for improving zinc status and other health outcomes in the general population*. Cochrane Database Syst Rev, 2016(6): p. Cd010697.
282. Wiggins, A.K.A., A. Grantham, and G.H. Anderson, *Optimizing foods for special dietary use in Canada: key outcomes and recommendations from a tripartite workshop*. Appl Physiol Nutr Metab, 2019. **44**(11): p. 1258-1265.
283. Kim, M., et al., *Reuniting overnutrition and undernutrition, macronutrients, and micronutrients*. Diabetes Metab Res Rev, 2019. **35**(1): p. e3072.
284. Min, J., et al., *Double burden of diseases worldwide: coexistence of undernutrition and overnutrition-related non-communicable chronic diseases*. Obes Rev, 2018. **19**(1): p. 49-61.
285. Kopp, W., *How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2019. **12**: p. 2221-2236.
286. Zinöcker, M.K. and I.A. Lindseth, *The Western Diet-Microbiome-Host Interaction and Its Role in Metabolic Disease*. Nutrients, 2018. **10**(3).
287. Christ, A., M. Lauterbach, and E. Latz, *Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection*. Immunity, 2019. **51**(5): p. 794-811.
288. Christ, A., et al., *Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming*. Cell, 2018. **172**(1-2): p. 162-175.e14.

289. Zulet, M.A., et al., *The reduction of the metabolic syndrome in Navarra-Spain (RESMENA-S) study: a multidisciplinary strategy based on chrononutrition and nutritional education, together with dietetic and psychological control.* Nutr Hosp, 2011. **26**(1): p. 16-26.
290. Singh, R.K., et al., *Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health.* J Transl Med, 2017. **15**(1): p. 73.
291. Pérez-Martínez, P., et al., *Lifestyle recommendations for the prevention and management of metabolic syndrome: an international panel recommendation.* Nutr Rev, 2017. **75**(5): p. 307-326.
292. Maltais, A., et al., *One-Year Lifestyle Intervention, Muscle Lipids, and Cardiometabolic Risk.* Med Sci Sports Exerc, 2019. **51**(10): p. 2156-2165.
293. Bernabé García, J., et al., *Biochemical and nutritional markers and antioxidant activity in metabolic syndrome.* Endocrinol Nutr, 2014. **61**(6): p. 302-8.
294. Lian, Z., et al., *Replacing Saturated Fat With Unsaturated Fat in Western Diet Reduces Foamy Monocytes and Atherosclerosis in Male Ldlr(-/-) Mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020. **40**(1): p. 72-85.
295. Calton, E.K., et al., *Certain dietary patterns are beneficial for the metabolic syndrome: reviewing the evidence.* Nutr Res, 2014. **34**(7): p. 559-68.
296. Razquin, C., et al., *A 3 years follow-up of a Mediterranean diet rich in virgin olive oil is associated with high plasma antioxidant capacity and reduced body weight gain.* Eur J Clin Nutr, 2009. **63**(12): p. 1387-93.
297. Urpi-Sarda, M., et al., *Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis.* Pharmacol Res, 2012. **65**(6): p. 577-83.
298. Mitjavila, M.T., et al., *The Mediterranean diet improves the systemic lipid and DNA oxidative damage in metabolic syndrome individuals. A randomized, controlled, trial.* Clin Nutr, 2013. **32**(2): p. 172-8.
299. Bekkouche, L., et al., *The Mediterranean diet adoption improves metabolic, oxidative, and inflammatory abnormalities in Algerian metabolic syndrome patients.* Horm Metab Res, 2014. **46**(4): p. 274-82.

300. Leenen, R., et al., *Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: influence on LDL oxidation*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(5): p. 1290-7.
301. Giugliano, D. and K. Esposito, *Mediterranean diet and metabolic diseases*. Curr Opin Lipidol, 2008. **19**(1): p. 63-8.
302. Dai, J., et al., *Adherence to the mediterranean diet is inversely associated with circulating interleukin-6 among middle-aged men: a twin study*. Circulation, 2008. **117**(2): p. 169-75.
303. Babio, N., et al., *Adherence to the Mediterranean diet and risk of metabolic syndrome and its components*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009. **19**(8): p. 563-70.
304. Babio, N., M. Bulló, and J. Salas-Salvadó, *Mediterranean diet and metabolic syndrome: the evidence*. Public Health Nutr, 2009. **12**(9a): p. 1607-17.
305. Ahluwalia, N., et al., *Dietary patterns, inflammation and the metabolic syndrome*. Diabetes Metab, 2013. **39**(2): p. 99-110.
306. Salas-Salvadó, J., et al., *Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease*. Eur J Clin Nutr, 2008. **62**(5): p. 651-9.
307. Richard, C., et al., *Effect of the Mediterranean diet with and without weight loss on markers of inflammation in men with metabolic syndrome*. Obesity (Silver Spring), 2013. **21**(1): p. 51-7.
308. Viscogliosi, G., et al., *Mediterranean dietary pattern adherence: associations with prediabetes, metabolic syndrome, and related microinflammation*. Metab Syndr Relat Disord, 2013. **11**(3): p. 210-6.
309. Esposito, K., et al., *Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial*. Jama, 2004. **292**(12): p. 1440-6.
310. Esposito, K., et al., *Mediterranean diet and metabolic syndrome: an updated systematic review*. Rev Endocr Metab Disord, 2013. **14**(3): p. 255-63.
311. Pérez-Martínez, P., et al., *Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus*. Curr Pharm Des, 2011. **17**(8): p. 769-77.

312. Kastorini, C.M., et al., *The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals*. J Am Coll Cardiol, 2011. **57**(11): p. 1299-313.
313. Gotsis, E., et al., *Health benefits of the Mediterranean Diet: an update of research over the last 5 years*. Angiology, 2015. **66**(4): p. 304-18.
314. Grosso, G., et al., *A Mediterranean-type diet is associated with better metabolic profile in urban Polish adults: Results from the HAPIEE study*. Metabolism, 2015. **64**(6): p. 738-46.
315. Smidowicz, A. and J. Regula, *Effect of nutritional status and dietary patterns on human serum C-reactive protein and interleukin-6 concentrations*. Adv Nutr, 2015. **6**(6): p. 738-47.
316. Velázquez-López, L., et al., *Mediterranean-style diet reduces metabolic syndrome components in obese children and adolescents with obesity*. BMC Pediatr, 2014. **14**: p. 175.
317. Venturini, D., et al., *Effects of extra virgin olive oil and fish oil on lipid profile and oxidative stress in patients with metabolic syndrome*. Nutrition, 2015. **31**(6): p. 834-40.
318. Azzini, E., et al., *Mediterranean Diet Effect: an Italian picture*. Nutr J, 2011. **10**: p. 125.
319. Salas-Salvadó, J., et al., *Nuts in the prevention and treatment of metabolic syndrome*. Am J Clin Nutr, 2014. **100 Suppl 1**: p. 399s-407s.
320. Schwingshackl, L. and G. Hoffmann, *Mediterranean dietary pattern, inflammation and endothelial function: a systematic review and meta-analysis of intervention trials*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2014. **24**(9): p. 929-39.
321. De Biase, S.G., et al., *Vegetarian diet and cholesterol and triglycerides levels*. Arq Bras Cardiol, 2007. **88**(1): p. 35-9.
322. Huang, Y.W., et al., *Vegan diet and blood lipid profiles: a cross-sectional study of pre and postmenopausal women*. BMC Womens Health, 2014. **14**: p. 55.
323. Jian, Z.H., et al., *Vegetarian diet and cholesterol and TAG levels by gender*. Public Health Nutr, 2015. **18**(4): p. 721-6.
324. Craig, W.J., et al., *The Safe and Effective Use of Plant-Based Diets with Guidelines for Health Professionals*. Nutrients, 2021. **13**(11).

325. Mattison, J.A., et al., *Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14063.
326. Fontana, L., L. Partridge, and V.D. Longo, *Extending healthy life span--from yeast to humans*. Science, 2010. **328**(5976): p. 321-6.
327. Colman, R.J., et al., *Attenuation of sarcopenia by dietary restriction in rhesus monkeys*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2008. **63**(6): p. 556-9.
328. Chen, C.N., et al., *Late-onset caloric restriction alters skeletal muscle metabolism by modulating pyruvate metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2015. **308**(11): p. E942-9.
329. Gyorkos, A., et al., *Carbohydrate-restricted Diet and High-intensity Interval Training Exercise Improve Cardio-metabolic and Inflammatory Profiles in Metabolic Syndrome: A Randomized Crossover Trial*. Cureus, 2019. **11**(9): p. e5596.
330. Hofer, S.J., et al., *The ups and downs of caloric restriction and fasting: from molecular effects to clinical application*. EMBO Mol Med, 2022. **14**(1): p. e14418.
331. Isaak, C.K. and Y.L. Siow, *The evolution of nutrition research*. Can J Physiol Pharmacol, 2013. **91**(4): p. 257-67.
332. de Almeida Andrade, F. and C.F. Schlechta Portella, *Research methods in complementary and alternative medicine: an integrative review*. J Integr Med, 2018. **16**(1): p. 6-13.
333. Harvey, A.L., R. Edrada-Ebel, and R.J. Quinn, *The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era*. Nat Rev Drug Discov, 2015. **14**(2): p. 111-29.
334. Kooti, W., et al., *Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (Nigella sativa)*. Chin J Nat Med, 2016. **14**(10): p. 732-745.
335. Dam, V., et al., *Association Between Vitamin K and the Metabolic Syndrome: A 10-Year Follow-Up Study in Adults*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(6): p. 2472-9.
336. Rees, K., et al., *Is vitamin K consumption associated with cardio-metabolic disorders? A systematic review*. Maturitas, 2010. **67**(2): p. 121-8.
337. Bjelakovic, G., et al., *Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases*. Cochrane Database Syst Rev, 2012. **2012**(3): p. Cd007176.

338. Lin, J., et al., *Vitamins C and E and beta carotene supplementation and cancer risk: a randomized controlled trial*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(1): p. 14-23.
339. Gopalakrishna Pillai, G.K., et al., *Antidiabetic potential of polyherbal formulation DB14201: Preclinical development, safety and efficacy studies*. J Ethnopharmacol, 2017. **197**: p. 218-230.
340. Tsao, R., *Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols*. Nutrients, 2010. **2**(12): p. 1231-46.
341. Koudoufio, M., et al., *Insight into Polyphenol and Gut Microbiota Crosstalk: Are Their Metabolites the Key to Understand Protective Effects against Metabolic Disorders? Antioxidants (Basel)*, 2020. **9**(10).
342. Moreno-Indias, I., et al., *Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients*. Food Funct, 2016. **7**(4): p. 1775-87.
343. Paquette, M., et al., *Strawberry and cranberry polyphenols improve insulin sensitivity in insulin-resistant, non-diabetic adults: a parallel, double-blind, controlled and randomised clinical trial*. Br J Nutr, 2017. **117**(4): p. 519-531.
344. Joseph, S.V., I. Edirisinghe, and B.M. Burton-Freeman, *Fruit Polyphenols: A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2016. **56**(3): p. 419-44.
345. Yahfoufi, N., et al., *The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols*. Nutrients, 2018. **10**(11).
346. Basu, A., et al., *Antiatherogenic Roles of Dietary Flavonoids Chrysin, Quercetin, and Luteolin*. J Cardiovasc Pharmacol, 2016. **68**(1): p. 89-96.
347. Scalbert, A. and G.J.T.J.o.n. Williamson, *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. 2000. **130**(8): p. 2073S-2085S.
348. Pinto, P. and C.N. Santos, *Worldwide (poly)phenol intake: assessment methods and identified gaps*. Eur J Nutr, 2017. **56**(4): p. 1393-1408.
349. Zamora-Ros, R., et al., *Estimation of dietary sources and flavonoid intake in a Spanish adult population (EPIC-Spain)*. J Am Diet Assoc, 2010. **110**(3): p. 390-8.
350. Beking, K. and A. Vieira, *An assessment of dietary flavonoid intake in the UK and Ireland*. Int J Food Sci Nutr, 2011. **62**(1): p. 17-9.

351. Johannot, L. and S.M. Somerset, *Age-related variations in flavonoid intake and sources in the Australian population*. Public Health Nutr, 2006. **9**(8): p. 1045-54.
352. Chun, O.K., S.J. Chung, and W.O. Song, *Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults*. J Nutr, 2007. **137**(5): p. 1244-52.
353. Jacques, P.F., et al., *Higher dietary flavonol intake is associated with lower incidence of type 2 diabetes*. J Nutr, 2013. **143**(9): p. 1474-80.
354. Bai, W., C. Wang, and C. Ren, *Intakes of total and individual flavonoids by US adults*. Int J Food Sci Nutr, 2014. **65**(1): p. 9-20.
355. Grosso, G., et al., *Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the Polish arm of the HAPIEE study*. Nutrition, 2014. **30**(11-12): p. 1398-403.
356. Pérez-Jiménez, J., et al., *Dietary intake of 337 polyphenols in French adults*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(6): p. 1220-8.
357. Tresserra-Rimbau, A., et al., *Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: the PREDIMED study*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2013. **23**(10): p. 953-9.
358. Miranda, A.M., et al., *Dietary intake and food contributors of polyphenols in adults and elderly adults of Sao Paulo: a population-based study*. Br J Nutr, 2016. **115**(6): p. 1061-70.
359. Zamora-Ros, R., et al., *Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study*. Eur J Nutr, 2016. **55**(4): p. 1359-75.
360. Vogiatzoglou, A., et al., *Flavonoid intake in European adults (18 to 64 years)*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0128132.
361. Ovaskainen, M.L., et al., *Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults*. J Nutr, 2008. **138**(3): p. 562-6.
362. Kühnau, J., *The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition*. World Rev Nutr Diet, 1976. **24**: p. 117-91.
363. Nemzer, B.V., et al., *Cranberry: Chemical Composition, Antioxidant Activity and Impact on Human Health: Overview*. Molecules, 2022. **27**(5): p. 1503.
364. <FruitReport_2021_FRA.pdf>.

365. Québec, G.d., *Productions agricoles et culture de la canneberge*, e.e.r.n. Agriculture, Editor. 2023.
366. Česonienė, L. and R. Daubaras, *Chapter 8 - Phytochemical Composition of the Large Cranberry (Vaccinium macrocarpon) and the Small Cranberry (Vaccinium oxycoccos)*, in *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*, M.S.J. Simmonds and V.R. Preedy, Editors. 2016, Academic Press: San Diego. p. 173-194.
367. Oszmiański, J., et al., *The effect of different maturity stages on phytochemical composition and antioxidant capacity of cranberry cultivars*. European Food Research and Technology, 2018. **244**(4): p. 705-719.
368. Blumberg, J.B., et al., *Cranberries and their bioactive constituents in human health*. Adv Nutr, 2013. **4**(6): p. 618-32.
369. Nemzer, B.V., et al., *Cranberry: Chemical Composition, Antioxidant Activity and Impact on Human Health: Overview*. Molecules (Basel, Switzerland), 2022. **27**(5): p. 1503.
370. Zhao, S., H. Liu, and L. Gu, *American cranberries and health benefits—an evolving story of 25 years*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020. **100**(14): p. 5111-5116.
371. Pappas, E. and K.M. Schaich, *Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects, and processing stability*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2009. **49**(9): p. 741-81.
372. Pedersen, C.B., et al., *Effects of blueberry and cranberry juice consumption on the plasma antioxidant capacity of healthy female volunteers*. Eur J Clin Nutr, 2000. **54**(5): p. 405-8.
373. Basu, A., et al., *Low-energy cranberry juice decreases lipid oxidation and increases plasma antioxidant capacity in women with metabolic syndrome*. Nutrition Research, 2011. **31**(3): p. 190-196.
374. Schell, J., et al., *Cranberries improve postprandial glucose excursions in type 2 diabetes*. Food & Function, 2017. **8**(9): p. 3083-3090.
375. Ruel, G. and C. Couillard, *Evidences of the cardioprotective potential of fruits: the case of cranberries*. Molecular Nutrition & Food Research, 2007. **51**(6): p. 692-701.
376. Chu, Y.-F. and R.H. Liu, *Cranberries inhibit LDL oxidation and induce LDL receptor expression in hepatocytes*. Life sciences, 2005. **77**(15): p. 1892-1901.

377. McKay, D.L. and J.B. Blumberg, *Cranberries (Vaccinium macrocarpon) and cardiovascular disease risk factors*. Nutrition reviews, 2007. **65**(11): p. 490-502.
378. Novotny, J.A., et al., *Cranberry juice consumption lowers markers of cardiometabolic risk, including blood pressure and circulating C-reactive protein, triglyceride, and glucose concentrations in adults*. The Journal of nutrition, 2015. **145**(6): p. 1185-1193.
379. Reed, J., *Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2002. **42**(S3): p. 301-316.
380. Dohadwala, M.M., et al., *Effects of cranberry juice consumption on vascular function in patients with coronary artery disease*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2011. **93**(5): p. 934-940.
381. Thimóteo, N.S.B., et al., *The impact of cranberry (Vaccinium macrocarpon) and cranberry products on each component of the metabolic syndrome: a review*. Nutrire, 2017. **42**: p. 1-12.
382. Kowalska, K. and A. Olejnik, *Beneficial effects of cranberry in the prevention of obesity and related complications: Metabolic syndrome and diabetes—A review*. Journal of functional foods, 2016. **20**: p. 171-181.
383. D'Archivio, M., et al., *Polyphenols, dietary sources and bioavailability*. Annali dell'Istituto superiore di sanità, 2007. **43**: p. 348-61.
384. Manach, C., et al., *Polyphenols: Food source and bioavailability*. The American journal of clinical nutrition, 2004. **79**: p. 727-47.
385. Jaganath, I.B., et al., *Dietary flavonoids and phenolic compounds*. 2010. **1**: p. 1-50.
386. Goszcz, K., et al., *Antioxidants in Cardiovascular Therapy: Panacea or False Hope?* Front Cardiovasc Med, 2015. **2**: p. 29.
387. Fraga, C.G., et al., *Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols*. Molecular Aspects of Medicine, 2010. **31**(6): p. 435-445.
388. Crozier, A., I.B. Jaganath, and M.N. Clifford, *Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health*. Natural Product Reports, 2009. **26**(8): p. 1001-1043.

389. Marinova, K., et al., *Flavonoid Biosynthesis in Barley Primary Leaves Requires the Presence of the Vacuole and Controls the Activity of Vacuolar Flavonoid Transport*. 2007. **144**(1): p. 432-444.
390. Pourcel, L., et al., *The formation of Anthocyanic Vacuolar Inclusions in Arabidopsis thaliana and implications for the sequestration of anthocyanin pigments*. Mol Plant, 2010. **3**(1): p. 78-90.
391. Raab, T., et al., *Catechin Glucosides: Occurrence, Synthesis, and Stability*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(4): p. 2138-2149.
392. Hollman, P.C.H., et al., *The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man*. Free Radical Research, 1999. **31**(6): p. 569-573.
393. Lewandowska, U., et al., *Overview of Metabolism and Bioavailability Enhancement of Polyphenols*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(50): p. 12183-12199.
394. D'Archivio, M., et al., *Bioavailability of the polyphenols: status and controversies*. Int J Mol Sci, 2010. **11**(4): p. 1321-42.
395. Harborne, J.B. and C.A. Williams, *Advances in flavonoid research since 1992*. Phytochemistry, 2000. **55**(6): p. 481-504.
396. Marc, F., et al., *[Studies of several analytical methods for antioxidant potential evaluation in food]*. Med Sci (Paris), 2004. **20**(4): p. 458-63.
397. Pietta, P.G., *Flavonoids as antioxidants*. J Nat Prod, 2000. **63**(7): p. 1035-42.
398. Higdon, J.V. and B. Frei, *Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2003. **43**(1): p. 89-143.
399. Cos, P., et al., *Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers*. J Nat Prod, 1998. **61**(1): p. 71-6.
400. van Acker, S.A., et al., *Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids*. Free Radic Biol Med, 1996. **20**(3): p. 331-42.
401. Halliwell, B., *Free radicals and antioxidants: a personal view*. Nutr Rev, 1994. **52**(8 Pt 1): p. 253-65.
402. Denis, M.C., et al., *Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53725.

403. Haleng, J., et al., *[Oxidative stress]*. Rev Med Liege, 2007. **62**(10): p. 628-38.
404. Hollman, P.C., et al., *The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established*. J Nutr, 2011. **141**(5): p. 989s-1009s.
405. Holst, B. and G. Williamson, *Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants*. Curr Opin Biotechnol, 2008. **19**(2): p. 73-82.
406. Petermann, A., et al., *GSTT2, a phase II gene induced by apple polyphenols, protects colon epithelial cells against genotoxic damage*. Mol Nutr Food Res, 2009. **53**(10): p. 1245-53.
407. Soyalan, B., et al., *Apple juice intervention modulates expression of ARE-dependent genes in rat colon and liver*. Eur J Nutr, 2011. **50**(2): p. 135-43.
408. Carrasco-Pozo, C., M. Gotteland, and H. Speisky, *Apple peel polyphenol extract protects against indomethacin-induced damage in Caco-2 cells by preventing mitochondrial complex I inhibition*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(21): p. 11501-8.
409. Chattopadhyay, I., et al., *Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen*. Free Radic Biol Med, 2006. **40**(8): p. 1397-408.
410. Jakešević, M., et al., *Antioxidative protection of dietary bilberry, chokeberry and Lactobacillus plantarum HEAL19 in mice subjected to intestinal oxidative stress by ischemia-reperfusion*. BMC Complement Altern Med, 2011. **11**: p. 8.
411. Maestre, R., et al., *Alterations in the intestinal assimilation of oxidized PUFAs are ameliorated by a polyphenol-rich grape seed extract in an in vitro model and Caco-2 cells*. J Nutr, 2013. **143**(3): p. 295-301.
412. Carrasco-Pozo, C., et al., *Stimulation of cytosolic and mitochondrial calcium mobilization by indomethacin in Caco-2 cells: modulation by the polyphenols quercetin, resveratrol and rutin*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(12): p. 2052-61.
413. Carrasco-Pozo, C., P. Morales, and M. Gotteland, *Polyphenols protect the epithelial barrier function of Caco-2 cells exposed to indomethacin through the modulation of occludin and zonula occludens-1 expression*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(22): p. 5291-7.

414. Fiorani, M., et al., *Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: prevention of mitochondrial damage and release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid*. J Nutr Biochem, 2010. **21**(5): p. 397-404.
415. Vreeburg, R.A., et al., *Apple extract induces increased epithelial resistance and claudin 4 expression in Caco-2 cells*. J Sci Food Agric, 2012. **92**(2): p. 439-44.
416. Hennig, P., et al., *The Crosstalk between Nrf2 and Inflammasomes*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(2).
417. Thimmulappa, R.K., et al., *Preclinical evaluation of targeting the Nrf2 pathway by triterpenoids (CDDO-Im and CDDO-Me) for protection from LPS-induced inflammatory response and reactive oxygen species in human peripheral blood mononuclear cells and neutrophils*. Antioxidants & redox signaling, 2007. **9**(11): p. 1963-1970.
418. Khor, T.O., et al., *Nrf2-Deficient Mice Have an Increased Susceptibility to Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis*. Cancer Research, 2006. **66**(24): p. 11580-11584.
419. Khor, T.O., et al., *Increased Susceptibility of Nrf2 Knockout Mice to Colitis-Associated Colorectal Cancer*. Cancer Prevention Research, 2008. **1**(3): p. 187-191.
420. Hussain, T., et al., *Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?* Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 7432797.
421. Zhang, H. and R. Tsao, *Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects*. Current Opinion in Food Science, 2016. **8**: p. 33-42.
422. Cheon, B.S., et al., *Effects of prenylated flavonoids and biflavonoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production from the mouse macrophage cell line RAW 264.7*. Planta Med, 2000. **66**(7): p. 596-600.
423. Romier, B., et al., *Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response*. Nutr Rev, 2009. **67**(7): p. 363-78.
424. Sergent, T., et al., *Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium*. Chem Biol Interact, 2010. **188**(3): p. 659-67.

425. Barnett, M.P., et al., *Modulation of colonic inflammation in Mdr1a(-/-) mice by green tea polyphenols and their effects on the colon transcriptome and proteome*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(10): p. 1678-90.
426. Comalada, M., et al., *Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(8): p. 1010-21.
427. Crouvezier, S., et al., *The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes in vitro*. Cytokine, 2001. **13**(5): p. 280-6.
428. Essafi-Benkhadir, K., et al., *Quince (Cydonia oblonga Miller) peel polyphenols modulate LPS-induced inflammation in human THP-1-derived macrophages through NF- κ B, p38MAPK and Akt inhibition*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **418**(1): p. 180-5.
429. Biesalski, H.K., *Polyphenols and inflammation: basic interactions*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007. **10**(6): p. 724-8.
430. Carpi, S., et al., *The Extra-Virgin Olive Oil Polyphenols Oleocanthal and Oleacein Counteract Inflammation-Related Gene and miRNA Expression in Adipocytes by Attenuating NF- κ B Activation*. Nutrients, 2019. **11**(12).
431. Michan, S. and D. Sinclair, *Sirtuins in mammals: insights into their biological function*. Biochem J, 2007. **404**(1): p. 1-13.
432. Lavu, S., et al., *Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(10): p. 841-53.
433. Finkel, T., C.X. Deng, and R. Mostoslavsky, *Recent progress in the biology and physiology of sirtuins*. Nature, 2009. **460**(7255): p. 587-91.
434. Bladé, C., et al., *miRNAs, polyphenols, and chronic disease*. Mol Nutr Food Res, 2013. **57**(1): p. 58-70.
435. Reiche, E., et al., *Genetic Polymorphisms and Gene–Nutrient Interaction in Metabolic Syndrome*. 2015. p. 69-1114.

436. Hoda, E.M., et al., *Ameliorative effect of grape seed extract on metabolic disorders caused by high fat diet induced obesity in rats by reversing the increase in hepatic miR-33a and miR-122*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2016. **10**(34): p. 699-708.
437. Scoditti, E., et al., *Hydroxytyrosol Modulates Adipocyte Gene and miRNA Expression Under Inflammatory Condition*. Nutrients, 2019. **11**(10).
438. Boesch-Saadatmandi, C., et al., *Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(3): p. 293-9.
439. Fang, M.Z., et al., *Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines*. Cancer Res, 2003. **63**(22): p. 7563-70.
440. Huang, Y.W., et al., *An overview of epigenetics and chemoprevention*. FEBS Lett, 2011. **585**(13): p. 2129-36.
441. Lee, W.J., J.Y. Shim, and B.T. Zhu, *Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids*. Mol Pharmacol, 2005. **68**(4): p. 1018-30.
442. Lee, W.J. and B.T. Zhu, *Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols*. Carcinogenesis, 2006. **27**(2): p. 269-77.
443. Van Duynhoven, J., et al., *Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism*. 2011. **108**(Supplement 1): p. 4531-4538.
444. Han, X., T. Shen, and H. Lou, *Dietary Polyphenols and Their Biological Significance*. 2007. **8**(9): p. 950-988.
445. Gonthier, M.-P., et al., *Metabolism of dietary procyanidins in rats*. Free Radical Biology and Medicine, 2003. **35**(8): p. 837-844.
446. Day, A.J., et al., *Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase*. FEBS Letters, 2000. **468**(2): p. 166-170.
447. Day, A.J., et al., *Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity*. 1998. **436**(1): p. 71-75.

448. Gee, J.M., et al., *Intestinal Transport of Quercetin Glycosides in Rats Involves Both Deglycosylation and Interaction with the Hexose Transport Pathway*. *The Journal of Nutrition*, 2000. **130**(11): p. 2765-2771.
449. Bang, S.-H., et al., *Metabolism of Rutin and Poncirin by Human Intestinal Microbiota and Cloning of Their Metabolizing α -L-Rhamnosidase from *Bifidobacterium dentium**. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2014. **25**.
450. Nakagawa, K., S. Okuda, and T. Miyazawa, *Dose-dependent Incorporation of Tea Catechins, (-)-Epigallocatechin-3-gallate and (-)-Epigallocatechin, into Human Plasma*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1997. **61**(12): p. 1981-1985.
451. Deprez, S., et al., *Transport of Proanthocyanidin Dimer, Trimer, and Polymer Across Monolayers of Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells*. 2001. **3**(6): p. 957-967.
452. Aura, A.-M., *Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon*. *Phytochemistry Reviews*, 2008. **7**(3): p. 407-429.
453. Clifford, M.N., *Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism*. 2000. **80**(7): p. 1033-1043.
454. Olthof, M.R., P.C.H. Hollman, and M.B. Katan, *Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans*. *The Journal of Nutrition*, 2001. **131**(1): p. 66-71.
455. Borges, G., et al., *Bioavailability of dietary (poly)phenols: a study with ileostomists to discriminate between absorption in small and large intestine*. *Food & Function*, 2013. **4**(5): p. 754-762.
456. Erk, T., et al., *Structure– and dose–absorption relationships of coffee polyphenols*. 2014. **40**(1): p. 103-112.
457. Landete, J.M., *Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health*. *Food Research International*, 2011. **44**(5): p. 1150-1160.
458. Jaganath, I.B., et al., *The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man*. *Free Radical Research*, 2006. **40**(10): p. 1035-1046.

459. Celep, G.S., R. Rastmanesh, and F. Marotta, *Chapter 43 - Microbial Metabolism of Polyphenols and Health*, in *Polyphenols in Human Health and Disease*, R.R. Watson, V.R. Preedy, and S. Zibadi, Editors. 2014, Academic Press: San Diego. p. 577-589.
460. Monagas, M., et al., *Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and bioactivity of their metabolites*. *Food & function*, 2010. **1**: p. 233-53.
461. Selma, M., J.C. Espín, and F. Tomás-Barberán, *Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2009. **57**: p. 6485-501.
462. Ouzzine, M., et al., *The Human UDP-Glucuronosyltransferases: Structural Aspects and Drug Glucuronidation*. *Drug metabolism reviews*, 2003. **35**: p. 287-303.
463. Rechner, A.R., et al., *Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004. **36**(2): p. 212-225.
464. Cardona, F., et al., *Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health*. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2013. **24**(8): p. 1415-1422.
465. Ley, R.E., *Obesity and the human microbiome*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2010. **26**(1): p. 5-11.
466. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. *Nature*, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
467. Qin, J., et al., *A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes*. *Nature*, 2012. **490**(7418): p. 55-60.
468. Kleessen, E.B., Jaana Mättö, Brigitta %J *Microbial ecology in health and disease, Culture-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microflora*. 2000. **12**(2): p. 53-63.
469. Sekirov, I., et al., *Gut microbiota in health and disease*. *Physiol Rev*, 2010. **90**(3): p. 859-904.

470. Larsson, E., et al., *Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88*. *Gut*, 2012. **61**(8): p. 1124-31.
471. Wang, Z., et al., *Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease*. *Nature*, 2011. **472**(7341): p. 57-63.
472. Pluznick, J.L., et al., *Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(11): p. 4410-5.
473. Kimura, I., et al., *The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 1829.
474. De Vadder, F., et al., *Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits*. *Cell*, 2014. **156**(1-2): p. 84-96.
475. Gao, Z., et al., *Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice*. *Diabetes*, 2009. **58**(7): p. 1509-17.
476. Watanabe, M., et al., *Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation*. *Nature*, 2006. **439**(7075): p. 484-9.
477. Thomas, C., et al., *TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis*. *Cell Metab*, 2009. **10**(3): p. 167-77.
478. Pols, T.W., et al., *TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading*. *Cell Metab*, 2011. **14**(6): p. 747-57.
479. Downes, M., et al., *A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR*. *Mol Cell*, 2003. **11**(4): p. 1079-92.
480. Tang, W.H., et al., *Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(17): p. 1575-84.
481. Tremaroli, V., et al., *Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation*. *Cell Metab*, 2015. **22**(2): p. 228-38.
482. Perry, R.J., et al., *Acetate mediates a microbiome-brain-beta-cell axis to promote metabolic syndrome*. *Nature*, 2016. **534**(7606): p. 213-7.

483. Brown, J.M. and S.L. Hazen, *The gut microbial endocrine organ: bacterially derived signals driving cardiometabolic diseases*. *Annu Rev Med*, 2015. **66**: p. 343-59.
484. Tang, W.H. and S.L. Hazen, *The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(10): p. 4204-11.
485. Tang, W.H., et al., *Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease*. *Circ Res*, 2015. **116**(3): p. 448-55.
486. Tang, W.H., et al., *Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. **64**(18): p. 1908-14.
487. Tang, W.H., et al., *Intestinal microbiota-dependent phosphatidylcholine metabolites, diastolic dysfunction, and adverse clinical outcomes in chronic systolic heart failure*. *J Card Fail*, 2015. **21**(2): p. 91-6.
488. Senthong, V., et al., *Trimethylamine N-Oxide and Mortality Risk in Patients With Peripheral Artery Disease*. *J Am Heart Assoc*, 2016. **5**(10).
489. Maslowski, K.M., et al., *Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43*. *Nature*, 2009. **461**(7268): p. 1282-6.
490. Samuel, B.S., et al., *Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(43): p. 16767-72.
491. Tolhurst, G., et al., *Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2*. *Diabetes*, 2012. **61**(2): p. 364-71.
492. Fava, S., *Glucagon-like peptide 1 and the cardiovascular system*. *Curr Diabetes Rev*, 2014. **10**(5): p. 302-10.
493. Chambers, E.S., et al., *Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults*. *Gut*, 2015. **64**(11): p. 1744-54.

494. Freeland, K.R. and T.M. Wolever, *Acute effects of intravenous and rectal acetate on glucagon-like peptide-1, peptide YY, ghrelin, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha*. Br J Nutr, 2010. **103**(3): p. 460-6.
495. Islam, K.B., et al., *Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats*. Gastroenterology, 2011. **141**(5): p. 1773-81.
496. Kurdi, P., et al., *Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria*. J Bacteriol, 2006. **188**(5): p. 1979-86.
497. Fu, J., et al., *The Gut Microbiome Contributes to a Substantial Proportion of the Variation in Blood Lipids*. Circ Res, 2015. **117**(9): p. 817-24.
498. Guinane, C.M. and P.D. Cotter, *Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ*. Therap Adv Gastroenterol, 2013. **6**(4): p. 295-308.
499. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
500. Tamburini, S., et al., *The microbiome in early life: implications for health outcomes*. Nat Med, 2016. **22**(7): p. 713-22.
501. Carmody, R.N., et al., *Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota*. Cell Host Microbe, 2015. **17**(1): p. 72-84.
502. Ryan, P.M. and N.M. Delzenne, *Chapter 18 - Gut Microbiota and Metabolism*, in *The Gut-Brain Axis*, N. Hyland and C. Stanton, Editors. 2016, Academic Press. p. 391-401.
503. Yamashiro, K., et al., *Correction: Gut dysbiosis is associated with metabolism and systemic inflammation in patients with ischemic stroke*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0176062.
504. Karlsson, F.H., et al., *Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1245.
505. Koren, O., et al., *Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108** Suppl 1: p. 4592-8.
506. Ott, S.J., et al., *Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease*. Circulation, 2006. **113**(7): p. 929-37.

507. Yang, T., et al., *Gut dysbiosis is linked to hypertension*. Hypertension, 2015. **65**(6): p. 1331-40.
508. Lam, V., et al., *Intestinal microbiota determine severity of myocardial infarction in rats*. FASEB J, 2012. **26**(4): p. 1727-35.
509. Lam, V., et al., *Intestinal Microbial Metabolites Are Linked to Severity of Myocardial Infarction in Rats*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0160840.
510. Druart, C., et al., *Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic and probiotic properties*. Adv Nutr, 2014. **5**(5): p. 624s-633s.
511. Wu, G.D., et al., *Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes*. Science, 2011. **334**(6052): p. 105-8.
512. Luca, S.V., et al., *Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020. **60**(4): p. 626-659.
513. Burgos-Edwards, A., et al., *Colonic fermentation of polyphenols from Chilean currants (*Ribes spp.*) and its effect on antioxidant capacity and metabolic syndrome-associated enzymes*. Food Chem, 2018. **258**: p. 144-155.
514. Kawabata, K., Y. Yoshioka, and J. Terao, *Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols*. Molecules, 2019. **24**(2).
515. Gläßer, G., et al., *Comparison of antioxidative capacities and inhibitory effects on cholesterol biosynthesis of quercetin and potential metabolites*. Phytomedicine, 2002. **9**(1): p. 33-40.
516. Merfort, I., et al., *Radical scavenger activity of three flavonoid metabolites studied by inhibition of chemiluminescence in human PMNs*. Planta Med, 1996. **62**(4): p. 289-92.
517. Tang, Y., et al., *3,4-Dihydroxyphenylacetic acid is a predominant biologically-active catabolite of quercetin glycosides*. Food Res Int, 2016. **89**(Pt 1): p. 716-723.
518. Liu, Y., et al., *3,4-Dihydroxyphenylacetic acid is a potential aldehyde dehydrogenase inducer in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells*. Biosci Biotechnol Biochem, 2017. **81**(10): p. 1978-1983.

519. Monagas, M., et al., *Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells*. Br J Nutr, 2009. **102**(2): p. 201-6.
520. Rechner, A.R. and C. Kroner, *Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function*. Thromb Res, 2005. **116**(4): p. 327-34.
521. Larrosa, M., et al., *Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models*. Mol Nutr Food Res, 2009. **53**(8): p. 1044-54.
522. Álvarez-Cilleros, D., et al., *Colonic metabolites from flavanols stimulate nitric oxide production in human endothelial cells and protect against oxidative stress-induced toxicity and endothelial dysfunction*. Food and Chemical Toxicology, 2018. **115**: p. 88-97.
523. Fernandez-Millan, E., et al., *Microbial phenolic metabolites improve glucose-stimulated insulin secretion and protect pancreatic beta cells against tert-butyl hydroperoxide-induced toxicity via ERKs and PKC pathways*. Food Chem Toxicol, 2014. **66**: p. 245-53.
524. Carrasco-Pozo, C., et al., *3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, protects against pancreatic beta-cells dysfunction induced by high cholesterol*. Exp Cell Res, 2015. **334**(2): p. 270-82.
525. Winter, J., et al., *C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria*. Appl Environ Microbiol, 1989. **55**(5): p. 1203-8.
526. Schneider, H., et al., *Degradation of quercetin-3-glucoside in gnotobiotic rats associated with human intestinal bacteria*. 2000. **89**(6): p. 1027-1037.
527. Feng, X., et al., *Insights into the intestinal bacterial metabolism of flavonoids and the bioactivities of their microbe-derived ring cleavage metabolites*. Drug Metabolism Reviews, 2018. **50**(3): p. 343-356.
528. Álvarez-Cilleros, D., et al., *Colonic metabolites from flavanols stimulate nitric oxide production in human endothelial cells and protect against oxidative stress-induced toxicity and endothelial dysfunction*. Food Chem Toxicol, 2018. **115**: p. 88-97.
529. Hanske, L., et al., *The Bioavailability of Apigenin-7-Glucoside Is Influenced by Human Intestinal Microbiota in Rats*. The Journal of Nutrition, 2009. **139**(6): p. 1095-1102.

530. Manach, C., et al., *Polyphenols: food sources and bioavailability*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2004. **79**(5): p. 727-747.
531. Rechner, A.R., et al., *The metabolic fate of dietary polyphenols in humans*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **33**(2): p. 220-235.
532. Labib, S., et al., *The pig caecum model: A suitable tool to study the intestinal metabolism of flavonoids*. 2004. **48**(4): p. 326-332.
533. Zou, W., et al., *Human intestinal microbial metabolism of naringin*. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2015. **40**(3): p. 363-367.
534. Yuan, J.-P., J.-H. Wang, and X. Liu, *Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora – implications for health*. Molecular Nutrition & Food Research, 2007. **51**(7): p. 765-781.
535. Sekikawa, A., et al., *Effect of S-equol and Soy Isoflavones on Heart and Brain*. Curr Cardiol Rev, 2019. **15**(2): p. 114-135.
536. Choi, E.J. and G.H. Kim, *The antioxidant activity of daidzein metabolites, Odesmethylangolensin and equol, in HepG2 cells*. Mol Med Rep, 2014. **9**(1): p. 328-32.
537. Schneider, H. and M.J.A.o.M. Blaut, *Anaerobic degradation of flavonoids by Eubacterium ramulus*. 2000. **173**(1): p. 71-75.
538. Tzounis, X., et al., *Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora*. British Journal of Nutrition, 2008. **99**(4): p. 782-792.
539. Yamakoshi, J., et al., *Effect of Proanthocyanidin-Rich Extract from Grape Seeds on Human Fecal Flora and Fecal Odor*. Microbial Ecology in Health and Disease, 2001. **13**(1): p. 25-31.
540. Borges, G., et al., *Absorption, metabolism, distribution and excretion of (-)-epicatechin: A review of recent findings*. Molecular Aspects of Medicine, 2018. **61**: p. 18-30.
541. Mena, P., et al., *Phenyl- γ -valerolactones and phenylvaleric acids, the main colonic metabolites of flavan-3-ols: Synthesis, analysis, bioavailability, and bioactivity*. Natural Product Reports, 2019. **36**.
542. Ottaviani, J.I., et al., *The metabolome of [2-¹⁴C](-)-epicatechin in humans: implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 29034.

543. Mele, L., et al., *Phenyl-gamma-valerolactones, flavan-3-ol colonic metabolites, protect brown adipocytes from oxidative stress without affecting their differentiation or function.* Mol Nutr Food Res, 2017. **61**(9).
544. Lambert, J.D., et al., *Synthesis and biological activity of the tea catechin metabolites, M4 and M6 and their methoxy-derivatives.* Bioorg Med Chem Lett, 2005. **15**(4): p. 873-6.
545. Uhlenhut, K. and P. Hogger, *Facilitated cellular uptake and suppression of inducible nitric oxide synthase by a metabolite of maritime pine bark extract (Pycnogenol).* Free Radic Biol Med, 2012. **53**(2): p. 305-13.
546. Sun, Y.N., et al., *A new phenolic derivative with soluble epoxide hydrolase and nuclear factor-kappaB inhibitory activity from the aqueous extract of Acacia catechu.* Nat Prod Res, 2016. **30**(18): p. 2085-92.
547. Lee, C.C., et al., *5-(3',4'-Dihydroxyphenyl-gamma-valerolactone), a Major Microbial Metabolite of Proanthocyanidin, Attenuates THP-1 Monocyte-Endothelial Adhesion.* Int J Mol Sci, 2017. **18**(7).
548. Takagaki, A. and F. Nanjo, *Effects of Metabolites Produced from (-)-Epigallocatechin Gallate by Rat Intestinal Bacteria on Angiotensin I-Converting Enzyme Activity and Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats.* J Agric Food Chem, 2015. **63**(37): p. 8262-6.
549. Van Rymenant, E., et al., *Vasorelaxant activity of twenty-one physiologically relevant (poly)phenolic metabolites on isolated mouse arteries.* Food Funct, 2017. **8**(12): p. 4331-4335.
550. Miladinović, B., et al., *Chemical Profile and Antioxidative and Antimicrobial Activity of Juices and Extracts of 4 Black Currants Varieties (Ribes nigrum L.).* 2014. **79**(3): p. C301-C309.
551. Aura, A.M., et al., *In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora.* European Journal of Nutrition, 2005. **44**(3): p. 133-142.
552. Vitaglione, P., et al., *Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides.* J Nutr, 2007. **137**(9): p. 2043-8.
553. Williamson, G. and M.N. Clifford, *Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity?* Br J Nutr, 2010. **104** Suppl 3: p. S48-66.

554. Gowd, V., et al., *Antioxidant and antidiabetic activity of blackberry after gastrointestinal digestion and human gut microbiota fermentation*. Food Chem, 2018. **269**: p. 618-627.
555. Ho, G.T., et al., *Phenolic Elderberry Extracts, Anthocyanins, Procyanidins, and Metabolites Influence Glucose and Fatty Acid Uptake in Human Skeletal Muscle Cells*. J Agric Food Chem, 2017. **65**(13): p. 2677-2685.
556. Andreasen, M.F., et al., *Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(11): p. 5679-84.
557. Couteau, D., et al., *Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid*. 2001. **90**(6): p. 873-881.
558. Cerdá, B., et al., *Identification of Urolithin A as a Metabolite Produced by Human Colon Microflora from Ellagic Acid and Related Compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(14): p. 5571-5576.
559. González-Barrio, R., et al., *Bioavailability of Anthocyanins and Ellagitannins Following Consumption of Raspberries by Healthy Humans and Subjects with an Ileostomy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(7): p. 3933-3939.
560. Iino, T., et al., *Effect of ellagic acid on gastric damage induced in ischemic rat stomachs following ammonia or reperfusion*. Life Sci, 2002. **70**(10): p. 1139-50.
561. Yu, Y.M., et al., *Ellagic acid inhibits IL-1beta-induced cell adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cells*. Br J Nutr, 2007. **97**(4): p. 692-8.
562. Chang, W.C., et al., *Ellagic acid suppresses oxidised low-density lipoprotein-induced aortic smooth muscle cell proliferation: studies on the activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and proliferating cell nuclear antigen expression*. Br J Nutr, 2008. **99**(4): p. 709-14.
563. Ishimoto, H., et al., *Antioxidative properties of functional polyphenols and their metabolites assessed by an ORAC assay*. Biosci Biotechnol Biochem, 2012. **76**(2): p. 395-9.
564. Bialonska, D., et al., *Urolithins, Intestinal Microbial Metabolites of Pomegranate Ellagitannins, Exhibit Potent Antioxidant Activity in a Cell-Based Assay*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(21): p. 10181-10186.

565. Verzelloni, E., et al., *Antiglycative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites*. *Molecular nutrition & food research*, 2011. **55 Suppl 1**: p. S35-43.
566. Komatsu, W., et al., *Urolithin A attenuates pro-inflammatory mediator production by suppressing PI3-K/Akt/NF- κ B and JNK/AP-1 signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264 macrophages: Possible involvement of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species*. *European Journal of Pharmacology*, 2018. **833**: p. 411-424.
567. Singh, R., et al., *Enhancement of the gut barrier integrity by a microbial metabolite through the Nrf2 pathway*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 89.
568. Tang, L., et al., *Urolithin A alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **486**(3): p. 774-780.
569. González-Sarrías, A., et al., *NF- κ B-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts*. 2010. **104**(4): p. 503-512.
570. Gimenez-Bastida, J.A., et al., *Ellagitannin metabolites, urolithin A glucuronide and its aglycone urolithin A, ameliorate TNF- α -induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endothelial cells*. *Mol Nutr Food Res*, 2012. **56**(5): p. 784-96.
571. Corsini, E., et al., *Enterodiol and enterolactone modulate the immune response by acting on nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) signaling*. *J Agric Food Chem*, 2010. **58**(11): p. 6678-84.
572. Prasad, K., *Antioxidant Activity of Secoisolariciresinol Diglucoside-derived Metabolites, Secoisolariciresinol, Enterodiol, and Enterolactone*. *Int J Angiol*, 2000. **9**(4): p. 220-225.
573. Kitts, D.D., et al., *Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone*. *Mol Cell Biochem*, 1999. **202**(1-2): p. 91-100.
574. Heinonen, S., et al., *In Vitro Metabolism of Plant Lignans: New Precursors of Mammalian Lignans Enterolactone and Enterodiol*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49**(7): p. 3178-3186.

575. Springer, M. and S. Moco, *Resveratrol and Its Human Metabolites-Effects on Metabolic Health and Obesity*. *Nutrients*, 2019. **11**(1).
576. Lu, D.-L., et al., *Influence of Glucuronidation and Reduction Modifications of Resveratrol on its Biological Activities*. 2013. **14**(9): p. 1094-1104.
577. Bode, L.M., et al., *In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota*. *Am J Clin Nutr*, 2013. **97**(2): p. 295-309.
578. Zhao, X.J., et al., *Polydatin prevents fructose-induced liver inflammation and lipid deposition through increasing miR-200a to regulate Keap1/Nrf2 pathway*. *Redox Biol*, 2018. **18**: p. 124-137.
579. Wang, Y., et al., *Polydatin ameliorates lipid and glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus by downregulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)*. *Cardiovasc Diabetol*, 2016. **15**: p. 19.
580. Hao, J., et al., *Polydatin improves glucose and lipid metabolism in experimental diabetes through activating the Akt signaling pathway*. *Eur J Pharmacol*, 2014. **745**: p. 152-65.
581. Margalef, M., et al., *Flavanol plasma bioavailability is affected by metabolic syndrome in rats*. *Food Chem*, 2017. **231**: p. 287-294.
582. Sasaki, G.Y., et al., *Green Tea Extract Treatment in Obese Mice with Nonalcoholic Steatohepatitis Restores the Hepatic Metabolome in Association with Limiting Endotoxemia-TLR4-NFκB-Mediated Inflammation*. *Mol Nutr Food Res*, 2019. **63**(24): p. e1900811.
583. Rodriguez-Mateos, A., et al., *Cranberry (poly)phenol metabolites correlate with improvements in vascular function: A double-blind, randomized, controlled, dose-response, crossover study*. *Mol Nutr Food Res*, 2016. **60**(10): p. 2130-2140.
584. Sobolev, A.P., et al., *Blueberry-Based Meals for Obese Patients with Metabolic Syndrome: A Multidisciplinary Metabolomic Pilot Study*. *Metabolites*, 2019. **9**(7).
585. Selma, M.V., et al., *The gut microbiota metabolism of pomegranate or walnut ellagitannins yields two urolithin-metabotypes that correlate with cardiometabolic risk biomarkers: Comparison between normoweight, overweight-obesity and metabolic syndrome*. *Clin Nutr*, 2018. **37**(3): p. 897-905.

586. Mora-Cubillos, X., et al., *Plasma metabolomic biomarkers of mixed nuts exposure inversely correlate with severity of metabolic syndrome*. Mol Nutr Food Res, 2015. **59**(12): p. 2480-90.
587. Hou, C.Y., et al., *The Effects of Resveratrol in the Treatment of Metabolic Syndrome*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(3).
588. Chaplin, A., C. Carpéné, and J. Mercader, *Resveratrol, Metabolic Syndrome, and Gut Microbiota*. Nutrients, 2018. **10**(11).
589. Kim, T.T., et al., *Fecal transplant from resveratrol-fed donors improves glycaemia and cardiovascular features of the metabolic syndrome in mice*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2018. **315**(4): p. E511-E519.
590. Wang, H.L., et al., *Comparative studies of polydatin and resveratrol on mutual transformation and antioxidative effect in vivo*. Phytomedicine, 2015. **22**(5): p. 553-9.
591. Frankenfeld, C.L., et al., *High concordance of daidzein-metabolizing phenotypes in individuals measured 1 to 3 years apart*. Br J Nutr, 2005. **94**(6): p. 873-6.
592. Frankenfeld, C.L., et al., *Obesity prevalence in relation to gut microbial environments capable of producing equol or O-desmethylangolensin from the isoflavone daidzein*. Eur J Clin Nutr, 2014. **68**(4): p. 526-30.
593. Hazim, S., et al., *Acute benefits of the microbial-derived isoflavone metabolite equol on arterial stiffness in men prospectively recruited according to equol producer phenotype: a double-blind randomized controlled trial*. Am J Clin Nutr, 2016. **103**(3): p. 694-702.
594. Ley, R.E., et al., *Obesity alters gut microbial ecology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11070-5.
595. Karlsson, F.H., et al., *Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control*. Nature, 2013. **498**(7452): p. 99-103.
596. Larsen, N., et al., *Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9085.
597. Vrieze, A., et al., *Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity*. J Hepatol, 2014. **60**(4): p. 824-31.

598. Sharma, M., R.B. Thandassery, and N. Bhargava, *Double pylorus: an optical illusion or reality?* Gastroenterology, 2012. **143**(2): p. e7-8.
599. Duenas, M., et al., *A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols.* Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 850902.
600. Moco, S., F.P. Martin, and S. Rezzi, *Metabolomics view on gut microbiome modulation by polyphenol-rich foods.* J Proteome Res, 2012. **11**(10): p. 4781-90.
601. Duda-Chodak, A., et al., *Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review.* Eur J Nutr, 2015. **54**(3): p. 325-41.
602. Braune, A. and M. Blaut, *Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut.* Gut Microbes, 2016. **7**(3): p. 216-34.
603. Anhe, F.F., et al., *A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice.* Gut, 2015. **64**(6): p. 872-83.
604. Roopchand, D.E., et al., *Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium Akkermansia muciniphila and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome.* Diabetes, 2015. **64**(8): p. 2847-58.
605. Li, Z., et al., *Pomegranate extract induces ellagitannin metabolite formation and changes stool microbiota in healthy volunteers.* Food Funct, 2015. **6**(8): p. 2487-95.
606. Song, H., et al., *Red pitaya betacyanins protects from diet-induced obesity, liver steatosis and insulin resistance in association with modulation of gut microbiota in mice.* 2016. **31**(8): p. 1462-1469.
607. Zhang, Z., et al., *Caffeic acid ameliorates colitis in association with increased Akkermansia population in the gut microbiota of mice.* Oncotarget, 2016. **7**(22): p. 31790-31799.
608. Neyrinck, A.M., et al., *Rhubarb extract prevents hepatic inflammation induced by acute alcohol intake, an effect related to the modulation of the gut microbiota.* 2017. **61**(1): p. 1500899.
609. Cuervo, A., et al., *Association of polyphenols from oranges and apples with specific intestinal microorganisms in systemic lupus erythematosus patients.* Nutrients, 2015. **7**(2): p. 1301-17.

610. Ahn, Y.J., et al., *Growth-inhibitory effects of Gallia Rhois-derived tannins on intestinal bacteria*. J Appl Microbiol, 1998. **84**(3): p. 439-43.
611. Lee, H.C., et al., *Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota*. Research in Microbiology, 2006. **157**(9): p. 876-884.
612. Dolara, P., et al., *Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2005. **591**(1): p. 237-246.
613. Massot-Cladera, M., et al., *Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2012. **527**(2): p. 105-112.
614. Rastmanesh, R., *High polyphenol, low probiotic diet for weight loss because of intestinal microbiota interaction*. Chemico-Biological Interactions, 2011. **189**(1): p. 1-8.
615. Tzounis, X., et al., *Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(1): p. 62-72.
616. Mayta-Apaza, A.C., et al., *Impact of tart cherries polyphenols on the human gut microbiota and phenolic metabolites in vitro and in vivo*. J Nutr Biochem, 2018. **59**: p. 160-172.
617. Boto-Ordóñez, M., et al., *High levels of Bifidobacteria are associated with increased levels of anthocyanin microbial metabolites: a randomized clinical trial*. Food Funct, 2014. **5**(8): p. 1932-8.
618. Queipo-Ortuño, M.I., et al., *Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers*. Am J Clin Nutr, 2012. **95**(6): p. 1323-34.
619. Gelberg, H.B., *Comparative anatomy, physiology, and mechanisms of disease production of the esophagus, stomach, and small intestine*. Toxicol Pathol, 2014. **42**(1): p. 54-66.
620. Cancer, S.C.d. *Stades du cancer de l'intestin grêle*. Available from: <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/small-intestine/staging>.
621. McGuckin, M.A., et al., *Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(1): p. 100-13.

622. Sheng, Y.H., et al., *Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer*. J Gastroenterol Hepatol, 2012. **27**(1): p. 28-38.
623. Gribble, F.M. and F. Reimann, *Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium*. Annu Rev Physiol, 2016. **78**: p. 277-99.
624. Näslund, E. and P.M. Hellström, *Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain*. Physiol Behav, 2007. **92**(1-2): p. 256-62.
625. Date, Y., et al., *Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans*. Endocrinology, 2000. **141**(11): p. 4255-61.
626. Cummings, D.E., et al., *A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans*. Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1714-9.
627. Nagaya, N., et al., *Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **280**(5): p. R1483-7.
628. Chu, J.Y., et al., *Vagal afferent mediates the anorectic effect of peripheral secretin*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64859.
629. Gutniak, M., et al., *Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1992. **326**(20): p. 1316-22.
630. Farilla, L., et al., *Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets*. Endocrinology, 2003. **144**(12): p. 5149-58.
631. Batterham, R.L. and S.R. Bloom, *The gut hormone peptide YY regulates appetite*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **994**: p. 162-8.
632. Mabbott, N.A., et al., *Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(4): p. 666-77.
633. Bel, S., et al., *Paneth cells secrete lysozyme via secretory autophagy during bacterial infection of the intestine*. Science, 2017. **357**(6355): p. 1047-1052.
634. Crosnier, C., D. Stamatakis, and J. Lewis, *Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(5): p. 349-59.

635. Vaishnava, S., et al., *Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20858-63.
636. Beaulieu, J.F., *Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation*. Prog Histochem Cytochem, 1997. **31**(4): p. 1-78.
637. Garrett, W.S., J.I. Gordon, and L.H. Glimcher, *Homeostasis and inflammation in the intestine*. Cell, 2010. **140**(6): p. 859-70.
638. Walker, J.A., J.L. Barlow, and A.N. McKenzie, *Innate lymphoid cells--how did we miss them?* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 75-87.
639. Sonnenberg, G.F., et al., *Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria*. Science, 2012. **336**(6086): p. 1321-5.
640. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
641. Gassler, N., et al., *Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(1): p. G216-28.
642. Gladden, A.B., et al., *The NF2 tumor suppressor, Merlin, regulates epidermal development through the establishment of a junctional polarity complex*. Dev Cell, 2010. **19**(5): p. 727-39.
643. Everard, A., et al., *Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity*. Proceedings of the national academy of sciences, 2013. **110**(22): p. 9066-9071.
644. Obrenovich, M.E., *Leaky gut, leaky brain?* Microorganisms, 2018. **6**(4): p. 107.
645. Portincasa, P., et al., *Intestinal Barrier and Permeability in Health, Obesity and NAFLD*. Biomedicines, 2021. **10**(1).
646. Odenwald, M.A. and J.R. Turner, *The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target?* Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 2017. **14**(1): p. 9-21.
647. Genser, L., et al., *Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes*. The Journal of pathology, 2018. **246**(2): p. 217-230.

648. Chakaroun, R.M., L. Massier, and P. Kovacs, *Gut microbiome, intestinal permeability, and tissue bacteria in metabolic disease: perpetrators or bystanders?* *Nutrients*, 2020. **12**(4): p. 1082.
649. Vetrano, S., et al., *Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease.* *Gastroenterology*, 2008. **135**(1): p. 173-84.
650. Albillos, A., A. de Gottardi, and M. Rescigno, *The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy.* *J Hepatol*, 2020. **72**(3): p. 558-577.
651. Tilg, H., T.E. Adolph, and M. Trauner, *Gut-liver axis: Pathophysiological concepts and clinical implications.* *Cell Metab*, 2022. **34**(11): p. 1700-1718.
652. Volta, U., et al., *IgA antibodies to dietary antigens in liver cirrhosis.* *Ric Clin Lab*, 1987. **17**(3): p. 235-42.
653. Spadoni, I., et al., *A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria.* *Science*, 2015. **350**(6262): p. 830-4.
654. Ohtani, N. and E. Hara, *Gut-liver axis-mediated mechanism of liver cancer: A special focus on the role of gut microbiota.* *Cancer science*, 2021. **112**(11): p. 4433-4443.
655. Racanelli, V. and B. Rehermann, *The liver as an immunological organ.* *Hepatology*, 2006. **43**(S1): p. S54-S62.
656. Li, L. and Z. Zeng, *Live imaging of innate and adaptive immune responses in the liver.* *Frontiers in Immunology*, 2020. **11**: p. 564768.
657. Caussy, C. and R. Loomba, *Gut microbiome, microbial metabolites and the development of NAFLD.* *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2018. **15**(12): p. 719-720.
658. Liu, Q., et al., *Role and effective therapeutic target of gut microbiota in NAFLD/NASH.* *Experimental and therapeutic medicine*, 2019. **18**(3): p. 1935-1944.
659. Augustyn, M., I. Grys, and M. Kukla, *Small intestinal bacterial overgrowth and nonalcoholic fatty liver disease.* *Clinical and experimental hepatology*, 2019. **5**(1): p. 1-10.
660. Ohtani, N. and N. Kawada, *Role of the gut–liver axis in liver inflammation, fibrosis, and cancer: a special focus on the gut microbiota relationship.* *Hepatology Communications*, 2019. **3**(4): p. 456-470.

661. Chu, H., B. Williams, and B. Schnabl, *Gut microbiota, fatty liver disease, and hepatocellular carcinoma*. Liver research, 2018. **2**(1): p. 43-51.
662. Ghosh, G. and A.B. Jesudian, *Small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis*. Journal of clinical and experimental hepatology, 2019. **9**(2): p. 257-267.
663. Lunia, M.K., B.C. Sharma, and S. Sachdeva, *Small intestinal bacterial overgrowth and delayed orocecal transit time in patients with cirrhosis and low-grade hepatic encephalopathy*. Hepatology international, 2013. **7**(1): p. 268-273.
664. Hellström, P.M., I. Nilsson, and T. Svenberg, *Role of bile in regulation of gut motility*. J Intern Med, 1995. **237**(4): p. 395-402.
665. Roopchand, D.E., et al., *Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium Akkermansia muciniphila and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome*. Diabetes, 2015. **64**(8): p. 2847-2858.
666. Ding, S., et al., *High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12191.
667. Lam, Y.Y., et al., *Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e34233.
668. Ussar, S., et al., *Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome*. Cell Metab, 2015. **22**(3): p. 516-530.
669. Hidalgo, I.J., T.J. Raub, and R.T. Borchardt, *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability*. Gastroenterology, 1989. **96**(3): p. 736-49.
670. Lea, T., *Caco-2 Cell Line*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015, Springer

Copyright 2015, The Author(s). Cham (CH). p. 103-11.

671. Anhê, F.F., et al., *A polyphenol-rich cranberry extract reverses insulin resistance and hepatic steatosis independently of body weight loss*. *Molecular metabolism*, 2017. **6**(12): p. 1563-1573.
672. Anhê, F.F., et al., *A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice*. *Gut*, 2015. **64**(6): p. 872-83.
673. Vinson, J.A., et al., *Cranberries and cranberry products: powerful in vitro, ex vivo, and in vivo sources of antioxidants*. *J Agric Food Chem*, 2008. **56**(14): p. 5884-91.
674. McKay, D.L. and J.B. Blumberg, *Cranberries (Vaccinium macrocarpon) and cardiovascular disease risk factors*. *Nutr Rev*, 2007. **65**(11): p. 490-502.
675. Lee, I.T., et al., *Effect of cranberry extracts on lipid profiles in subjects with Type 2 diabetes*. *Diabet Med*, 2008. **25**(12): p. 1473-7.
676. Medina-Larqué, A.S., et al., *Cranberry polyphenols and agave agavins impact gut immune response and microbiota composition while improving gut barrier function, inflammation, and glucose metabolism in mice fed an obesogenic diet*. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 871080.
677. Anhê, F.F., et al., *A polyphenol-rich cranberry extract reverses insulin resistance and hepatic steatosis independently of body weight loss*. *Mol Metab*, 2017. **6**(12): p. 1563-1573.
678. <Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers _ FDA.pdf>.
679. Scalbert, A. and G. Williamson, *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. *J Nutr*, 2000. **130**(8S Suppl): p. 2073s-85s.
680. Farrell, T.L., et al., *Predicting phenolic acid absorption in Caco-2 cells: a theoretical permeability model and mechanistic study*. *Drug Metab Dispos*, 2012. **40**(2): p. 397-406.
681. Mehran, M., et al., *Lipid, apolipoprotein, and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1997. **33**(2): p. 118-28.
682. Mehran, M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha inhibits lipid and lipoprotein transport by Caco-2 cells*. *Am J Physiol*, 1995. **269**(6 Pt 1): p. G953-60.

683. Courtois, F., et al., *Membrane peroxidation by lipopolysaccharide and iron-ascorbate adversely affects Caco-2 cell function: beneficial role of butyric acid*. *Am J Clin Nutr*, 2003. **77**(3): p. 744-50.
684. Harmel, E., et al., *AMPK in the small intestine in normal and pathophysiological conditions*. *Endocrinology*, 2014. **155**(3): p. 873-88.
685. Cencic, A. and T. Langerholc, *Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology--a review*. *Int J Food Microbiol*, 2010. **141 Suppl 1**: p. S4-14.
686. Li, Y., et al., *Increasing the throughput and productivity of Caco-2 cell permeability assays using liquid chromatography-mass spectrometry: application to resveratrol absorption and metabolism*. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2003. **6**(8): p. 757-67.
687. Taha, R., et al., *Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line*. *PLoS One*, 2010. **5**(7): p. e11817.
688. Bernotti, S., et al., *Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003. **285**(5): p. G898-906.
689. Marcil, V., et al., *Modification in oxidative stress, inflammation, and lipoprotein assembly in response to hepatocyte nuclear factor 4alpha knockdown in intestinal epithelial cells*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(52): p. 40448-60.
690. Precourt, L.P., et al., *Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(7): p. 1628-37.
691. Erlejman, A.G., C.G. Fraga, and P.I. Oteiza, *Procyanidins protect Caco-2 cells from bile acid- and oxidant-induced damage*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **41**(8): p. 1247-56.
692. Erlejman, A.G., et al., *TNFalpha-induced NF-kappaB activation and cell oxidant production are modulated by hexameric procyanidins in Caco-2 cells*. *Arch Biochem Biophys*, 2008. **476**(2): p. 186-95.
693. Verstraeten, S.V., et al., *Antioxidant and membrane effects of procyanidin dimers and trimers isolated from peanut and cocoa*. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(12): p. 5041-8.

694. Verstraeten, S.V., et al., *Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(1): p. 84-92.
695. Miao, T., G. Song, and J. Yang, *Protective Effect of Apple Polyphenols on H₂O₂-Induced Oxidative Stress Damage in Human Colon Adenocarcinoma Caco-2 Cells*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2023. **71**(4): p. 262-268.
696. Verstraeten, S.V., et al., *(-)-Epicatechin and related procyanidins modulate intracellular calcium and prevent oxidation in Jurkat T cells*. Free Radic Res, 2008. **42**(10): p. 864-72.
697. Fraga, C.G., et al., *Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols*. Mol Aspects Med, 2010. **31**(6): p. 435-45.
698. Hendrich, A.B., et al., *Differential interaction of Sophora isoflavonoids with lipid bilayers*. Eur J Pharm Sci, 2002. **16**(3): p. 201-8.
699. Yoshioka, H., et al., *Interaction of (+)-catechin with a lipid bilayer studied by the spin probe method*. Biosci Biotechnol Biochem, 2006. **70**(2): p. 395-400.
700. Sirk, T.W., et al., *Molecular binding of catechins to biomembranes: relationship to biological activity*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(15): p. 6720-8.
701. Oteiza, P.I., et al., *Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface?* Clin Dev Immunol, 2005. **12**(1): p. 19-25.
702. Ollila, F., et al., *Characterization of flavonoid--biomembrane interactions*. Arch Biochem Biophys, 2002. **399**(1): p. 103-8.
703. Sanver, D., et al., *Experimental Modeling of Flavonoid-Biomembrane Interactions*. Langmuir, 2016. **32**(49): p. 13234-13243.
704. van Dijk, C., A.J. Driessen, and K. Recourt, *The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles*. Biochem Pharmacol, 2000. **60**(11): p. 1593-600.
705. Fujimura, Y., et al., *A difference between epigallocatechin-3-gallate and epicatechin-3-gallate on anti-allergic effect is dependent on their distinct distribution to lipid rafts*. Biofactors, 2004. **21**(1-4): p. 133-5.

706. Fujimura, Y., H. Tachibana, and K. Yamada, *Lipid raft-associated catechin suppresses the FcepsilonRI expression by inhibiting phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase1/2*. FEBS Lett, 2004. **556**(1-3): p. 204-10.
707. Maldonado-Celis, M.E., et al., *Apple procyanidins activate apoptotic signaling pathway in human colon adenocarcinoma cells by a lipid-raft independent mechanism*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **388**(2): p. 372-6.
708. Xia, M., et al., *Anthocyanin prevents CD40-activated proinflammatory signaling in endothelial cells by regulating cholesterol distribution*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(3): p. 519-24.
709. Adachi, S., et al., *The inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on activation of the epidermal growth factor receptor is associated with altered lipid order in HT29 colon cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(13): p. 6493-501.
710. Annaba, F., et al., *Green tea catechin EGCG inhibits ileal apical sodium bile acid transporter ASBT*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **298**(3): p. G467-73.
711. Poncet-Legrand, C., et al., *Interactions between flavan-3-ols and poly(L-proline) studied by isothermal titration calorimetry: effect of the tannin structure*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(22): p. 9235-40.
712. Baxter, N.J., et al., *Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation*. Biochemistry, 1997. **36**(18): p. 5566-77.
713. Middleton, E., Jr., C. Kandaswami, and T.C. Theoharides, *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(4): p. 673-751.
714. Lotito, S.B. and B. Frei, *Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. Structure-function relationships and activity after first pass metabolism*. J Biol Chem, 2006. **281**(48): p. 37102-10.

715. Mackenzie, G.G., et al., *Dimeric procyanidin B2 inhibits constitutively active NF-kappaB in Hodgkin's lymphoma cells independently of the presence of IkappaB mutations*. *Biochem Pharmacol*, 2008. **75**(7): p. 1461-71.
716. Mackenzie, G.G., et al., *Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells*. *Faseb j*, 2004. **18**(1): p. 167-9.
717. Mackenzie, G.G., et al., *Dimeric procyanidins are inhibitors of NF-kappaB-DNA binding*. *Biochem Pharmacol*, 2009. **78**(9): p. 1252-62.
718. Mackenzie, G.G. and P.I. Oteiza, *Modulation of transcription factor NF-kappaB in Hodgkin's lymphoma cell lines: effect of (-)-epicatechin*. *Free Radic Res*, 2006. **40**(10): p. 1086-94.
719. Park, Y.C., et al., *Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF-alpha secretion, and NF-kappaB-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages*. *FEBS Lett*, 2000. **465**(2-3): p. 93-7.
720. Reagan-Shaw, S., M. Nihal, and N. Ahmad, *Dose translation from animal to human studies revisited*. *Faseb j*, 2008. **22**(3): p. 659-61.
721. Rasmussen, S.E., et al., *Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease*. *Molecular nutrition & food research*, 2005. **49**(2): p. 159-174.
722. Franco, E.P.D.d., et al., *Enzyme-assisted modification of flavonoids from *Matricaria chamomilla*: antioxidant activity and inhibitory effect on digestive enzymes*. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2020. **35**(1): p. 42-49.
723. Huang, J., et al., *The anti-obesity effects of green tea in human intervention and basic molecular studies*. *European journal of clinical nutrition*, 2014. **68**(10): p. 1075-1087.
724. Jiang, H., et al., *The anti-obesogenic effects of dietary berry fruits: A review*. *Food Research International*, 2021. **147**: p. 110539.
725. Maldonado-Valderrama, J., et al., *The role of bile salts in digestion*. *Adv Colloid Interface Sci*, 2011. **165**(1): p. 36-46.

726. Macierzanka, A., et al., *Bile salts in digestion and transport of lipids*. Adv Colloid Interface Sci, 2019. **274**: p. 102045.
727. Birari, R.B. and K.K. Bhutani, *Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential*. Drug Discov Today, 2007. **12**(19-20): p. 879-89.
728. de la Garza, A.L., et al., *Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment*. Planta Med, 2011. **77**(8): p. 773-85.
729. Zeng, X., et al., *Characterization of the direct interaction between apple condensed tannins and cholesterol in vitro*. Food Chem, 2020. **309**: p. 125762.
730. Li, X., et al., *Characterizing the Interactions of Dietary Condensed Tannins with Bile Salts*. J Agric Food Chem, 2019. **67**(34): p. 9543-9550.
731. Moseti, D., A. Regassa, and W.-K. Kim, *Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules*. International journal of molecular sciences, 2016. **17**(1): p. 124.
732. Tamura, Y., et al., *Apple polyphenols induce browning of white adipose tissue*. The Journal of nutritional biochemistry, 2020. **77**: p. 108299.
733. Hu, J., et al., *Dietary polyphenols turn fat "brown": A narrative review of the possible mechanisms*. Trends in Food Science & Technology, 2020. **97**: p. 221-232.
734. Smith, B.K., et al., *Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2016. **311**(4): p. E730-E740.
735. Anhê, F.F., et al., *Treatment with camu camu (Myrciaria dubia) prevents obesity by altering the gut microbiota and increasing energy expenditure in diet-induced obese mice*. Gut, 2019. **68**(3): p. 453-464.
736. Anhê, F.F., et al., *Host-microbe interplay in the cardiometabolic benefits of dietary polyphenols*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2019. **30**(6): p. 384-395.
737. Yang, C.S., et al., *Mechanisms of body weight reduction and metabolic syndrome alleviation by tea*. Molecular Nutrition & Food Research, 2016. **60**(1): p. 160-174.
738. Anhê, F.F., et al., *A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice*. Gut, 2015. **64**(6): p. 872-883.

739. Reaven, G.M., *Why Syndrome X? From Harold Himsworth to the insulin resistance syndrome*. Cell metabolism, 2005. **1**(1): p. 9-14.
740. Brüning, J.C., et al., *Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles*. Cell, 1997. **88**(4): p. 561-572.
741. Muoio, D.M. and C.B. Newgard, *Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes*. Nature reviews Molecular cell biology, 2008. **9**(3): p. 193-205.
742. Guo, S., *Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models to disease mechanisms*. The Journal of endocrinology, 2014. **220**(2): p. T1.
743. Qatanani, M. and M.A. Lazar, *Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu*. Genes & development, 2007. **21**(12): p. 1443-1455.
744. Guilherme, A., et al., *Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. Nature reviews Molecular cell biology, 2008. **9**(5): p. 367-377.
745. Jiang, H., et al., *The anti-obesogenic effects of dietary berry fruits: A review*. Food Res Int, 2021. **147**: p. 110539.
746. Shahwan, M., et al., *Role of polyphenols in combating Type 2 Diabetes and insulin resistance*. International Journal of Biological Macromolecules, 2022. **206**: p. 567-579.
747. Kim, Y., J.B. Keogh, and P.M. Clifton, *Polyphenols and Glycemic Control*. Nutrients, 2016. **8**(1).
748. McDougall, G.J., et al., *Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase*. Journal of agricultural and food chemistry, 2005. **53**(7): p. 2760-2766.
749. Ademiluyi, A.O. and G. Oboh, *Phenolic-rich extracts from selected tropical underutilized legumes inhibit α -amylase, α -glucosidase, and angiotensin I converting enzyme in vitro*. 2012.
750. Hara, Y. and M. Honda, *The inhibition of α -amylase by tea polyphenols*. Agricultural and Biological Chemistry, 1990. **54**(8): p. 1939-1945.
751. Hanamura, T., et al., *Antihyperglycemic effect of polyphenols from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2006. **70**(8): p. 1813-1820.

752. Welsch, C.A., P.A. Lachance, and B.P. Wasserman, *Dietary phenolic compounds: inhibition of Na⁺-dependent D-glucose uptake in rat intestinal brush border membrane vesicles*. The Journal of nutrition, 1989. **119**(11): p. 1698-1704.
753. Cermak, R., S. Landgraf, and S. Wolfram, *Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum*. British Journal of Nutrition, 2004. **91**(6): p. 849-855.
754. Johnston, K., et al., *Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells*. FEBS letters, 2005. **579**(7): p. 1653-1657.
755. Manzano, S. and G. Williamson, *Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells*. Molecular nutrition & food research, 2010. **54**(12): p. 1773-1780.
756. Koh, L.W., et al., *Evaluation of different teas against starch digestibility by mammalian glycosidases*. Journal of agricultural and food chemistry, 2010. **58**(1): p. 148-154.
757. Hanhineva, K., et al., *Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism*. International journal of molecular sciences, 2010. **11**(4): p. 1365-1402.
758. Röder, P.V., et al., *The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing*. PloS one, 2014. **9**(2): p. e89977.
759. Zhang, Z., et al., *Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) protects the insulin sensitivity in rat L6 muscle cells exposed to dexamethasone condition*. Phytomedicine, 2010. **17**(1): p. 14-18.
760. Kurimoto, Y., et al., *Black soybean seed coat extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via the activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice*. Journal of agricultural and food chemistry, 2013. **61**(23): p. 5558-5564.
761. Cai, E.P. and J.-K. Lin, *Epigallocatechin gallate (EGCG) and rutin suppress the glucotoxicity through activating IRS2 and AMPK signaling in rat pancreatic β cells*. Journal of agricultural and food chemistry, 2009. **57**(20): p. 9817-9827.
762. Basu, A., *Role of Berry Bioactive Compounds on Lipids and Lipoproteins in Diabetes and Metabolic Syndrome*. Nutrients, 2019. **11**(9).

763. Blaha, M.J., et al., *The importance of non-HDL cholesterol reporting in lipid management*. Journal of clinical lipidology, 2008. **2**(4): p. 267-273.
764. Jacobson, T.A., et al., *National lipid association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia: part 1—full report*. Journal of clinical lipidology, 2015. **9**(2): p. 129-169.
765. Sikora, J., et al., *Short-term supplementation with Aronia melanocarpa extract improves platelet aggregation, clotting, and fibrinolysis in patients with metabolic syndrome*. Eur J Nutr, 2012. **51**(5): p. 549-56.
766. Spahis, S., J.-M. Borys, and E. Levy, *Metabolic syndrome as a multifaceted risk factor for oxidative stress*. Antioxidants & redox signaling, 2017. **26**(9): p. 445-461.
767. Jiang, J. and N. Torok, *Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome*. Metabolic syndrome and related disorders, 2008. **6**(1): p. 1-7.
768. Machado, M. and H. Cortez-Pinto, *Non-alcoholic steatohepatitis and metabolic syndrome*. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2006. **9**(5): p. 637-642.
769. Browning, J.D. and J.D. Horton, *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury*. The Journal of clinical investigation, 2004. **114**(2): p. 147-152.
770. Postic, C., et al., *ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism*. Annu. Rev. Nutr., 2007. **27**: p. 179-192.
771. Foufelle, F. and P. Ferre, *New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c*. Biochemical Journal, 2002. **366**(2): p. 377-391.
772. Alaynick, W.A., *Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism*. Mitochondrion, 2008. **8**(4): p. 329-337.
773. Luo, L. and M. Liu, *Adipose tissue in control of metabolism*. Journal of endocrinology, 2016. **231**(3): p. R77-R99.
774. Herman, M.A., et al., *A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism*. Nature, 2012. **484**(7394): p. 333-338.
775. Eissing, L., et al., *De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- β and metabolic health*. Nature communications, 2013. **4**(1): p. 1528.

776. Ortega-Prieto, P. and C. Postic, *Carbohydrate sensing through the transcription factor ChREBP*. *Frontiers in genetics*, 2019. **10**: p. 472.
777. Yu, J., et al., *COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: role as pro-inflammatory mediator*. *Hepatology*, 2006. **43**(4): p. 826-836.
778. Moi, P., et al., *Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994. **91**(21): p. 9926-9930.
779. Wang, Y., et al., *Pentoxifylline Enhances Antioxidative Capability and Promotes Mitochondrial Biogenesis in D-Galactose-Induced Aging Mice by Increasing Nrf2 and PGC-1 α through the cAMP-CREB Pathway*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. **2021**: p. 1-21.
780. Liu, H., et al., *Effect of DEHP and DnOP on mitochondrial damage and related pathways of Nrf2 and SIRT1/PGC-1 α in HepG2 cells*. *Food and Chemical Toxicology*, 2021. **158**: p. 112696.
781. Tzounis, X., et al., *Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study*. *The American journal of clinical nutrition*, 2011. **93**(1): p. 62-72.
782. Anhê, F.F., et al., *Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review*. *PharmaNutrition*, 2013. **1**(4): p. 105-114.
783. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability*. *Gut*, 2009. **58**(8): p. 1091-1103.
784. Cani, P.D., 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**: p. 2374-2383.
785. Queipo-Ortuño, M.I., et al., *Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers*. *The American journal of clinical nutrition*, 2012. **95**(6): p. 1323-1334.

786. Stanisławska, I.J., et al., *The Activity of Urolithin A and M4 Valerolactone, Colonic Microbiota Metabolites of Polyphenols, in a Prostate Cancer In Vitro Model*. *Planta Med*, 2019. **85**(2): p. 118-125.
787. Mele, L., et al., *Phenyl- γ -valerolactones, flavan-3-ol colonic metabolites, protect brown adipocytes from oxidative stress without affecting their differentiation or function*. *Mol Nutr Food Res*, 2017. **61**(9).
788. Takagaki, A., et al., *Effects of Microbial Metabolites of (-)-Epigallocatechin Gallate on Glucose Uptake in L6 Skeletal Muscle Cell and Glucose Tolerance in ICR Mice*. *Biol Pharm Bull*, 2019. **42**(2): p. 212-221.
789. Unno, K., et al., *Blood-Brain Barrier Permeability of Green Tea Catechin Metabolites and their Neuritogenic Activity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells*. *Mol Nutr Food Res*, 2017. **61**(12).
790. Cecarini, V., et al., *Flavan-3-ol Microbial Metabolites Modulate Proteolysis in Neuronal Cells Reducing Amyloid-beta (1-42) Levels*. *Mol Nutr Food Res*, 2021. **65**(18): p. e2100380.
791. Dai, L., et al., *Angiopietin-2 silence alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation, barrier dysfunction and endoplasmic reticulum stress of intestinal epithelial cells by blocking Notch signaling pathway*. *Bioengineered*, 2021.
792. Hansson, G.K. and P. Libby, *The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword*. *Nature reviews immunology*, 2006. **6**(7): p. 508-519.
793. Lee, C.C., et al., *5-(3', 4'-Dihydroxyphenyl- γ -valerolactone), a major microbial metabolite of proanthocyanidin, attenuates THP-1 monocyte-endothelial adhesion*. *International journal of molecular sciences*, 2017. **18**(7): p. 1363.
794. Grimm, T., A. Schäfer, and P. Högger, *Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol)*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **36**(6): p. 811-22.
795. Rajagopalan, S., et al., *Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(11): p. 2572-9.

796. Yoo, H.G., et al., *IL-1beta induces MMP-9 via reactive oxygen species and NF-kappaB in murine macrophage RAW 264.7 cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **298**(2): p. 251-6.
797. Lee, C.C., et al., *5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone, a Major Microbial Metabolite of Proanthocyanidin, Attenuates THP-1 Monocyte-Endothelial Adhesion*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(7).
798. Feliciano, R.P., et al., *Plasma and Urinary Phenolic Profiles after Acute and Repetitive Intake of Wild Blueberry*. *Molecules*, 2016. **21**(9).
799. Urpi-Sarda, M., et al., *Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr A*, 2009. **1216**(43): p. 7258-67.
800. Ottaviani, J.I., et al., *The metabolome of [2-(14)C](-)-epicatechin in humans: implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 29034.
801. Li, C., et al., *Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion*. *Chem Res Toxicol*, 2000. **13**(3): p. 177-84.
802. Lee, Y., et al., *5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone, a metabolite of procyanidins in cacao, suppresses MDI-induced adipogenesis by regulating cell cycle progression through direct inhibition of CDK2/cyclin O*. *Food Funct*, 2019. **10**(5): p. 2958-2969.
803. Trepiana, J., et al., *Resveratrol Metabolites Are Able to Reduce Steatosis in Cultured Hepatocytes*. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020. **13**(10).
804. Abdulrahman, A.O., et al., *Urolithins Attenuate Multiple Symptoms of Obesity in Rats Fed on a High-Fat Diet*. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020. **13**: p. 3337-3348.
805. Zhang, S., et al., *Natural Polyphenols in Metabolic Syndrome: Protective Mechanisms and Clinical Applications*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(11).
806. Yang, C.S., et al., *Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds*. *Molecular nutrition & food research*, 2008. **52**(S1): p. S139-S151.
807. Leri, M., et al., *Healthy effects of plant polyphenols: molecular mechanisms*. *International journal of molecular sciences*, 2020. **21**(4): p. 1250.

808. Costa, C., et al., *Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases*. Food and Chemical Toxicology, 2017. **110**: p. 286-299.
809. Venkataramanamma, D., P. Aruna, and R. Singh, *Standardization of the conditions for extraction of polyphenols from pomegranate peel*. Journal of food science and technology, 2016. **53**: p. 2497-2503.
810. Curti, V., et al., *Bioavailability and in vivo antioxidant activity of a standardized polyphenol mixture extracted from brown propolis*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(5): p. 1250.
811. Batiha, G.E.-S., et al., *The pharmacological activity, biochemical properties, and pharmacokinetics of the major natural polyphenolic flavonoid: Quercetin*. Foods, 2020. **9**(3): p. 374.
812. Xiao, J. and P. Hogger, *Editorial (Thematic issue: advances in the pharmacokinetics of natural bioactive polyphenols)*. Current Drug Metabolism, 2014. **15**(1): p. 1-2.
813. Katz, M.H., *Multivariable analysis: a primer for readers of medical research*. Annals of internal medicine, 2003. **138**(8): p. 644-650.