

Université de Montréal

Activités antidiabétiques et neuroprotectrices du jus de bleuet biotransformé

par

Phuoc Tri Vuong

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Doctorat en pharmacologie**

Juin 2009

© Phuoc Tri Vuong, 2009

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Activités antidiabétiques et neuroprotectrices du jus de bleuet biotransformé

présentée par :

Phuoc Tri Vuong

a été évaluée par un jury composé des membres suivants :

Marc Prentki, PhD

Président-rapporteur

Pierre Haddad, PhD

Directeur de recherche

Chantal Matar

Co-directrice de recherche

Charles Ramassamy

Co-directeur de recherche

Denis de Blois

Membre du jury

Charles Couillard

Examineur externe

Hélène Delisle

Représentant du doyen

Résumé :

Le bleuet démontre un potentiel thérapeutique dans le traitement du cancer et des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. Ces effets bénéfiques sont attribuables aux composés phénoliques abondants dans le bleuet, tels que les anthocyanines et les flavonoïdes. La biotransformation du jus de bleuet avec les bactéries *Serratia vaccinii* augmente sa teneur en composés phénoliques et son activité anti-oxydante, et modifie ses activités physiologiques. L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'activité neuroprotectrice et le potentiel antidiabétique du jus de bleuet biostranformé (BJ). Le BJ est étudié dans différents tests dont : 1) La protection des neurones (N2a) contre le stress oxydatif (SO) induit par le peroxyde d'hydrogène; 2) La stimulation de la prise de glucose par les cellules musculaires (C2C12) et adipeuses (3T3-L1); 3) L'activité anti-hyperglycémique chez les souris obèses diabétiques KKA^y. En effet, tandis que le jus de bleuet normal n'a aucun effet, le BJ augmente l'activité des enzymes anti-oxydantes, comme la catalase et la SOD (Superoxide Dimutase) et protège les neurones contre les changements de la signalisation des MAPKs et contre la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène. Le BJ augmente aussi la prise de glucose de 48% dans les cellules C2C12 et de 142% dans les cellules 3T3-L1. Cette augmentation n'est pas expliquée par une augmentation du calcium cytosolique mais plutôt par une stimulation de la phosphorylation de l'AMPK. De plus, le BJ inhibe l'adipogenèse chez les 3T3-L1. Le BJ diminue également l'hyperglycémie chez les souris obèses diabétiques KKA^y et protège les jeunes souris pré-diabétiques contre le développement de l'obésité et du diabète. L'activité anti-hyperglycémique du BJ pourrait impliquer les adipokines puisque le BJ augmente le niveau d'adiponectine chez les souris diabétiques. Le BJ représente ainsi une approche prometteuse pour le traitement du diabète et les maladies neurodégénératives et une source de nouveaux agents thérapeutiques contre ces maladies.

Mots clés : diabète, obésité, adiponectine, anti-oxydant, neuroprotection, jus de bleuet, *Serratia vaccinii*, biotransformation.

Abstract:

Blueberry demonstrates therapeutic potential against cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases. These desirable effects are thought to involve abundant phenolic compounds in blueberry such as anthocyanins and flavonoids. Blueberry juice biotransformation by *Serratia vaccinii* bacteria increases its phenolics content, its antioxidant activity and modifies its physiological properties. The purpose of the present study was to evaluate the neuroprotection activity and the antidiabetic potential of biostranformed blueberry juice (BJ). BJ was studied for: 1) Protection of neurons (N2a) against oxidative stress caused by hydrogen peroxide; 2) Stimulation of glucose uptake by muscle cells (C2C12) and adipocytes (3T3-L1); 3) Anti-hyperglycemic activity in diabetic obese KKA^y mice. Indeed, whereas normal blueberry juice did not show any effect, BJ increased antioxidant enzymes activities (catalase, SOD) and protected neurons against modifications in MAPKs pathways and toxicity induced by hydrogen peroxide. BJ also increased glucose uptake by 48% in C2C12 cells and by 142% in 3T3-L1 cells. Enhanced glucose uptake could not be explained by an increase of cytosolic calcium but was related to the stimulation of AMPK phosphorylation. Moreover, BJ inhibited 3T3-L1 adiopogenesis. BJ also reduced hyperglycemia of obese diabetic KKA^y mice and protected pre-diabetic young mice against the development of obesity and diabetes mellitus. The anti-hyperglycemic effect of BJ may involve adipokine pathways since BJ increased adiponectin levels in diabetic mice. Thus, BJ represents a promising approach for the prevention and treatment of diabetes mellitus and possibly neurogenerative diseases as well as a source of novel therapeutic agents against these disorders.

Keywords: diabetes, obesity, adiponectin, antioxidant, neuroprotection, blueberry juice, *Serratia vaccinii*, biotransformation.

Table des matières	Page
Résumé	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xi

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Introduction.....	2
1.2. Revue de littérature.....	4
1.2.1. Biologie du bleuet.....	4
1.2.2. Composés bioactifs du bleuet.....	5
1.2.3. Biodisponibilité et métabolisme des composés actifs du bleuet.....	11
1.2.4. Activité anti-oxydante du bleuet.....	17
1.2.5. Bleuet et cancer.....	22
1.2.6. Bleuet, vieillissement et maladies neurodégénératives	28
1.2.7. Bleuet et maladies cardiovasculaires	33
1.2.8. Obésité et diabète.....	37
1.2.9. Hypothèse et objectifs de recherche.....	44

Chapitre 2 : Biostranformed blueberry juice protects neurons from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and MAPKs pathway alterations.

Rôle de chaque co-auteur dans cet article.....	49
Abstract.....	51
Résumé.....	52
Introduction.....	53
Materials and Methods.....	55
Results.....	59
Discussion.....	62
References.....	67

Figure legends.....	71
Figures.....	73

Chapitre 3 : Fermented Canadian lowbush blueberry juice stimulates glucose uptake and AMP-activated protein kinase in insulin-sensitive cultured muscle cells and adipocytes.

Rôle de chaque co-auteur dans cet article.....	83
Abstract.....	85
Résumé.....	86
Introduction.....	87
Materials and Methods.....	89
Results.....	94
Discussion.....	98
References.....	102
Figure legends.....	106
Figures.....	108

Chapitre 4 : Anti-hyperglycemic effect of biotransformed blueberry juice in diabetic KKA^y mice.

Rôle de chaque co-auteur dans cet article.....	116
Abstract.....	118
Résumé.....	120
Introduction.....	122
Materials and Methods.....	124
Results.....	128
Discussion.....	131
References.....	136
Figure legends.....	140
Figures.....	144

Chapitre 5 : Conclusion et perspectives.....155

Chapitre 6 : Références161

<u>Liste des tableaux</u>	Page
<u>Chapitre 1 :</u>	
Tableau 1 : Résumé des études des propriétés anti-oxydantes du bleuet	21
Tableau 2 : Résumé des études des propriétés anticancéreuses du bleuet	27
Tableau 3 : Résumé des études du bleuet sur les maladies neurodégénératives	32
Tableau 4 : Résumé des études du bleuet sur les maladies cardiovasculaires	37
<u>Chapitre 4 :</u>	
Tableau 1 : Biochemical parameters of KKA ^y mice after chronic treatment.....	142
Tableau 2 : Physiological and biochemical parameters of mice in preventive study...	143

<u>Liste des figures</u>	Page
<u>Chapitre 1 :</u>	
Figure 1: Structure des composés phénoliques du bleuet	6
Figure 2: Mécanismes conduisant à l'inflammation par l'obésité	40
Figure 3: Mécanisme moléculaire de la translocation des GLUTs	43
<u>Chapitre 2 :</u>	
Figure 1: Effect of hydrogen peroxide on N2a cells viability	73
Figure 2: Effect of hydrogen peroxide on N2a cells viability	74
Figure 3: GSH/GSSG ratio in N2a cells	75
Figure 4: Catalase activity in N2a cells	76
Figure 5: SOD activity in N2a cells	77
Figure 6: Phosphorylation of MAPK p38 in N2a cells	78
Figure 7: Phosphorylation of JNK in N2a cells	79
Figure 8: Phosphorylation of MEK1/2 in N2a cells	80
Figure 9: Phosphorylation of ERK1/2 in N2a cells	81

Chapitre 3 :

Figure 1: ^3H -deoxyglucose uptake by C2C12 cells	108
Figure 2: ^3H -deoxyglucose uptake by 3T3-L1 cells	109
Figure 3: ^3H -deoxyglucose uptake by C2C12 and 3T3-L1 cells	110
Figure 4: Lipid accumulation	111
Figure 5: Content of phosphorylated-AMPK α	112
Figure 6: Increase of ^3H -deoxyglucose uptake	113
Figure 7: ^3H -deoxyglucose uptake in C2C12 cells	114

Chapitre 4 :

Figure 1: Glycemia of diabetic KKA y mice.	144
Figure 2: Glycemia of diabetic KKA y mice	145
Figure 3: AUC from OGTT of diabetic KKA y mice	146
Figure 4: Food intake of diabetic KKA y mice	147
Figure 5: Body weight of diabetic KKA y mice	148
Figure 6: Glycemia of young KKA y and C57BL/6 mice	149
Figure 7: AUC from OGTT of KKA y and C57BL/6 mice	150
Figure 8: Cumulative food intake (A) and body weight gain (B) of young KKA y and C57BL/6 mice	151

Liste des abbréviations

ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)

ACF : *Aberrant crypt foci*

AMP : Adénosine monophosphate

AMPK : Protéine kinase activée par l'AMP (*AMP activated protein kinase*)

AP1 : Protéine activatrice 1 (*Activator protein 1*)

APP/PS1 : Précurseur du peptide d'amyloïde/Préséniline (*Amyloid peptide precursor/presenilin*)

ATP : Adénosine triphosphate

BDNF : Facteur neurotrophique derive du cerveau (*Brain-derived neurotrophic factor*)

BJ : Jus de bleuet biotransformé (*Biotransformed blueberry juice*)

BSA : Albumine du sérum bovin (*Bovine serum albumin*)

COX : Cyclooxygénase

CREB : Élément de liaison active par cAMP (*cAMP response element binding*)

DA : Dopamine

DCFH-DA : 2',7'-dichlorofluorescein diacetate

DMEM : *Dulbecco's modified eagle medium*

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DMX : Dexaméthasone

DPPH : Diphénylpicrylhydrazyl

EDTA : Acid éthylènediaminetétracétique (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGTA : *Ethylene glycol-bis (β -Aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid*

ERK : Kinases activées par le signal extracellulaire (*Extracellular signal-regulated kinases*)

ET : Éllagitannin

FBS : Sérum de veau foetal (*Fetal bovine serum*)

FRAP : *Ferric reducing ability of plasma*

GAE : Équivalent de l'acide gallique (*Gallic acid equivalent*)

GAG : Glycosaminoglycan

GLUT : Transporteur facilitant de glucose (*Glucose facilitated transporter*)

GPx : Glutathion peroxydase

GST : Glutathion S-transférase
GT : Gallotannin
GTP : Guanine triphosphate
HDL : Lipoprotéine de haute densité (*High density lipoprotein*)
HE : *Hemangioendothelioma*
HHDP : 6,6'-docarbonyl-2,2',3,3',4,4'-hexahydroxybiphényl
HP : Protéine de choc thermique (*Heat-shock protein*)
HS : Sérum de cheval (*Horse serum*)
IBMX : 3-isobutylméthylxanthine
ICAM : Molécule d'adhésion intracellulaire (*Intracellular adhesion molecule*)
IGF : Facteur de croissance ressemblant à l'insuline (*Insulin-like growth factor*)
IL : Interleukine
iNOS : Synthase de l'oxyde nitrique inducible (*inducible nitric oxide synthase*)
LDL : Lipoprotéine de base densité (*Low density lipoprotein*)
LPS : Lipopolysaccharide
MAPK : Protéine kinase actives par mitogène (*Mitogen-activated protein kinase*)
MCP-1 : Protéine chimiotactique des monocytes 1 (*Monocyte chemotactic protein-1*)
MC4R : Récepteur de la mélanocortine 4 (*Melanocortin 4 Receptor*)
MMP : Métalloprotéinase de la matrice (*Matrix Metalloproteinase*)
NF- κ B : Facteur nucléaire κ B (*Nuclear factor κ B*)
NJ : Jus de bleuet normal (*Normal blueberry juice*)
OGTT : Test de la tolérance au glucose oral (*Oral glucose tolerance test*)
ORAC : *Oxygen radical absorbance capacity*
PA : Pro-anthocyanidine
PAC : Capacité anti-oxydante du plasma (*Plasma antioxidant capacity*)
PCA : Acide protocatéchuïque (*Protocatechuique acid*)
PBS : Tampon phosphate (*Phosphate buffer saline*)
PI3K : Kinase du phosphoinositide-3 (*Phosphoinositide-3 kinase*)
PKC : Protéine kinase C
PMSF : *Pheylmethylsulfonyl fluoride*

PPAR : Récepteur active par proliférateur peroxisome (*Peroxisome proliferators activated receptor*)

ROS : Espèces d'oxygène réactive (*Reactive oxygen species*)

RNS : Espèces d'azote réactive (*Reactive nitrogen species*)

SO : Stress oxydatif

SOD : Superoxyde dimutase

TIMP : Inhibiteur tissulaire des MMP (*Tissue inhibitors of MMP*)

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale α (*Tumor necrosis factor α*)

TOSC : *Total oxidant scavenging capacity*

TRAP : *Total reactive antioxidant potentials*

VEGF : Facteur de croissance endothéliale vasculaire (*Vascular endothelial growth factor*)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier de tout mon coeur Dr. Pierre S. Haddad, non seulement pour son implication en tant que mon directeur de recherche, mais également pour m'avoir encouragé et soutenu pendant les années de mon doctorat. Son amour pour la recherche, sa gentillesse et sa patience m'ont aidé de finir ce travail et m'aideront encore dans mon cheminement de carrière.

J'aimerais remercier aussi ma codirectrice de recherche, la Dre. Chantal Matar, et mon codirecteur de recherche, le Dr. Charles Ramassamy, dans l'initiation, le transfert des connaissances et le support qu'ils m'ont apportées lors des années.

Je ne saurais passer sous silence le support et l'aide que j'ai reçu du Dr. Louis Martineau, de Diane Vallerand et d'Antoine Brault dans toutes les études qui contribuent à l'établissement de cette thèse.

Je tiens à souligner mes remerciements aux professeurs du Département de Pharmacologie pour les compétences que j'ai acquies au doctorat.

Mes sincères remerciements à tous les membres du comité du jury, en particulier, les Drs. Marc Prentki, Denis deBlois, Charles Couillard et Hélène Delisle pour leurs efforts, leur contribution et leur commentaires précieux non seulement dans l'amélioration de ma thèse mais également dans le savoir-faire scientifique.

J'aimerais remercier également les efforts, la gentillesse, et le support que j'ai reçu de mes chers amis-collègues de laboratoire, Danielle Adeyiwola-Spoor, Despina Harbilas, et Ali Benhaddou-Andaloussi, lors des moments les plus difficiles de ce travail.

Finalement, je remercie Francine Côté et Sylvie Caron pour leur gentillesse, leur patience ainsi que pour les nombreux services et aides qu'elles m'ont accordées durant ces années.

Et à tous ceux que j'aurais oublié bien involontairement, merci !

Chapitre 1

Introduction

1.1. Introduction

L'Amérique du Nord est un producteur majeur de bleuet commercialisé à l'état frais et transformé en une grande variété de produits, y compris en jus de fruits et concentrés. Le bleuet contient une grande quantité de composés qui sont bénéfiques à la santé humaine tels que les anthocyanines et autres composés phénoliques (Seeram 2008). Ces composés sont de puissants anti-oxydants et peuvent fournir une protection contre l'inflammation, l'athérosclérose, le cancer, le diabète et les maladies neurodégénératives (Zafra-Stone *et al.* 2007; Fernandez-Panchon *et al.* 2008). Depuis 2005, les bleuets sont classés dans la catégorie des aliments fonctionnels et nommés superfruits. Ils représentent une combinaison favorable de richesse en nutriments et de force anti-oxydante. Ils stimulent la recherche de preuves scientifiques démontrant leurs effets bénéfiques pour la santé et contribuent au développement de la manufacture des produits nutraceutiques (Nindo *et al.* 2005).

La biotransformation est une des méthodes appliquées dans l'industrie pour moduler la structure des substrats afin d'obtenir les produits désirés. La production de vitamines, d'antibiotiques, de vin, de bière, de yaourt et de fromage constitue des exemples de l'application des procédés de biotransformation. Des composés phénoliques issus de biotransformations comme la diosgénine (extrait de *Dioscorea composita*) ou le stigmastérol (extrait de *Glycine max.*) sont utilisés dans la production de corticoïdes. Également, plusieurs études rapportent l'effet de la biotransformation sur la production de resvératrol dans le vin rouge (Becker *et al.* 2003; Halls & Yu 2008), un composé, en grande partie, responsable du "Paradoxe français" (Vidavalur *et al.* 2006b) (Providencia 2006) et d'autres effets thérapeutiques sur le cancer (Mann *et al.* 2009), l'obésité (Baur

et al. 2006), le diabète (Palsamy & Subramanian 2008a, b) et les maladies neurodégénératives (Pearson *et al.* 2008; Rocha-Gonzalez *et al.* 2008).

La biotransformation du jus de bleuet sauvage (*Vaccinium angustifolium* L.) par les bactéries *Serratia vaccinii* augmente sa teneur en composés phénoliques (Martin & Matar 2005), son activité anti-oxydante (Martin & Matar 2005) et inhibe la production d'oxyde nitrique par les macrophages (Vuong *et al.* 2006), un facteur important dans l'inflammation (Perrotta *et al.* 2008).

Cette section résume les études sur les composés bioactifs du bleuet et leurs métabolisme ainsi que sur le potentiel thérapeutique du bleuet dans le traitement de l'inflammation, du cancer, du diabète et des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. À partir de ces connaissances, l'hypothèse et les objectifs du projet de recherche seront établis. En fait, ce projet vise à étudier le potentiel thérapeutique du jus de bleuet biotransformé (BJ) dans le contexte du diabète et des maladies neurodégénératives.

1.2. Revue de la littérature

1.2.1. Biologie du bleuët

Les bleuëts sont les fruits des plantes à fleurs du genre *Vaccinium*, section *Cyanococcus*. Ils sont natifs d'Amérique du Nord (Hancock & Draper 1989). Aujourd'hui, les bleuëts sont aussi produits en Australie, en Nouvelle-Zélande et dans les pays d'Amérique du Sud. Ce sont des arbrisseaux dont la hauteur varie de 10 cm à 4 m. Les espèces plus petites sont connues comme "*lowbush*" ou "bleuët sauvage", tandis que les plus grandes sont les "*highbush*". Les feuilles peuvent être caduc ou toujours vertes, ovales à lancéolés, et de 1-8 cm de long et 0.5-3.5 cm de large. Les fleurs sont en forme de cloches, blanches, roses pâles ou rouges, parfois teintées verdâtres. Le fruit est une fausse baie de 5-16 mm de diamètre ayant une couronne évasée à son extrémité. Il est verdâtre au début, puis il devient rougeâtre-violet, et finalement indigo en maturation. Il a un goût sucré si mûr, avec acidité variable (Hancock 1989). Les plantes de bleuëts produisent les fruits de mai jusqu'à octobre dans l'hémisphère nord. La "saison des bleuëts" est en juillet, et est connue comme le "*National Blueberry Month*" au Canada et aux États-Unis.

Le genre *Vaccinium*, qui se compose de 30 sections, est l'un des genres principaux de la famille Ericacea (College 2004). Dix sections du genre *Vaccinium* se trouvent en Amérique du Nord, soit *Vitis-idea*, *Vaccinium*, *Oxyococcus*, *Polycodium*, *Batodendron*, *Herpothamus*, *Hugeria*, *Pyxothamus*, *Myrtillus* et *Cyanococcus*. Il y a 14 espèces dont le nom commun en anglais contient le mot "*blueberry*" qui sont classées dans la section *Cyanococcus*. Plusieurs autres plantes du genre *Vaccinium* produisent aussi des baies

bleues. Elles sont parfois confondues avec les bleuets, particulièrement la myrtille ou bleuet européen (*Vaccinium myrtillus*) (Kron *et al.* 2002; Luteyn 2002).

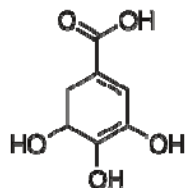
Les bleuets sont cultivés et récoltés à l'état semi-sauvage. En Amérique du Nord, l'espèce cultivée la plus commune est *V. corymbosum*, le “*Northern highbush blueberry*”. Les hybrides de cette espèce qui sont adaptées aux climats du sud des États-Unis sont nommés “*Southern highbush blueberry*”. Le “*lowbush*” ou bleuet sauvage, *V. angustifolium*, plus petit que les espèces cultivées, se retrouve dans les provinces de l'Atlantique, et au Québec ainsi qu'au Michigan et en Virginie occidentale.

Les bleuets contiennent une grande quantité de micronutriments, tels que le manganèse minéral, les vitamines B6, C et K et des fibres alimentaires. Une portion de bleuet fournit une faible charge glycémique ou “*Glycemic Load*”, d'environ 4 (Nutritiondata 2008). Les sucres simples présents dans le bleuet sont le fructose, le glucose, le maltose et le sucrose (C.I. Nindo *et al.* 2005).

1.2.2. Composés bioactifs du bleuet

Au cours des dernières décennies, la connaissance de la composition du bleuet frais ou séché et de l'extrait de bleuet a considérablement augmenté grâce aux méthodes analytiques très sensibles. Elles ont permis d'établir le profil phytochimique du bleuet. Ses principaux composés bioactifs sont les anthocyanines, les flavonoïdes, les tannins condensés ou pro-anthocyanidines (PA), les tannins hydrolysables ou ellagitannins (ET), les stilbénoloïdes, les acides phénoliques et les lignanes (Manach *et al.* 2004; Harris *et al.* 2007; Seeram 2008). La grande diversité dans la structure de ces composés confère des propriétés biologiques uniques à chaque classe. Elle affecte également leur absorption,

distribution, métabolisme et excrétion chez les humains (Manach *et al.* 2005; Singh *et al.* 2008). La diversité structurale des composés bioactifs du bleuet peut être appréciée par les différents types et niveaux d'oxydation de leur structure hétérocyclique, leur substitution des groupes –OH, leurs stéréo-isomères, leur glycosylation, leur acylation et leur polymérisation (Singh *et al.* 2008).

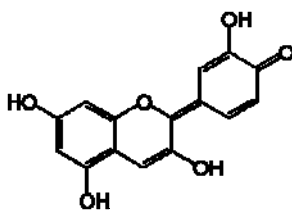


Acide gallique



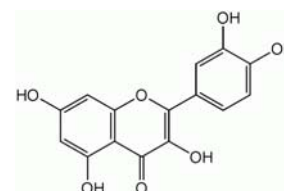
Acide p-coumarique

1. Acide phénolique



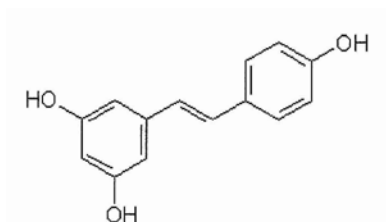
Cyanidine

2. Anthocyanidine



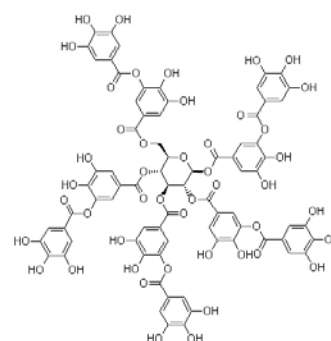
Quercétine

3. Flavonoïde



Resvératrol

4. Stibénoïde



Acide tannique

5. Pro-anthocyanidine

Figure 1 : Structure des composés phénoliques du bleuet

Anthocyanines et Anthocyanidines

Parmi les nombreux composés phytochimiques présents dans le bleuet, les anthocyanines sont probablement les plus connus. Les anthocyanines sont les pigments qui donnent la couleur rouge, bleue, mauve, violette, ou rouge-mauve aux fruits, légumes et noix (Wu & Prior 2005a, b; Wu *et al.* 2006). Les anthocyanines existent naturellement dans les fruits et légumes sous forme glycosidée. La forme non-glycosylée ou aglycone des anthocyanines est connue comme anthocyanidine. Elle existe sous différentes structures chimiques, colorées ou incolores, dépendamment du pH. Plusieurs centaines d'anthocyanines sont formées à partir des anthocyanidines de base. Les six anthocyanidines les plus connues sont la cyanidine, la delphinidine, l'élargonidine, la malvidine, la pétunidine, et la péonidine. Parmi ces six anthocyanidines, cinq sont identifiés dans le bleuet sauvage. Seul l'élargonidine n'a pas été retrouvée (Nicoue *et al.* 2007).

Mis à part certaines variations dans l'aglycone, la diversification des anthocyanines est produite par l'identité et la quantité ainsi que la position à laquelle les groupements glycosidiques et/ou alkyles sont liés à leurs squelettes structuraux. Les glycosides les plus connus dans le bleuet sont formés par l'ajout de glucose, de galactose, de rhamnose et d'arabinose. Ils existent normalement comme 3-glycosides ou 3,4-diglycosides (Hosseinian & Beta 2007). Les agents alkylants comprennent des acides phénoliques (cafféique, p-coumarique, férulique et sinapique), qui peuvent porter eux-mêmes des groupements glycosidiques (Taruscio *et al.* 2004; Zadernowski *et al.* 2005).

Flavonols et Flavanols

Les flavonols sont les flavonoïdes les plus abondants dans la nourriture. Ils existent naturellement sous formes de glycosides comme les anthocyanines. Le sucre est souvent le glucose ou le rhamnose, mais le galactose, l'arabinose, le xylose et l'acide glucuronique peuvent aussi être présents. Les aglycones les plus communs des flavonols dans le bleuet sont la quercétine, le kaempférol et la myricétine. Comme leurs biosynthèses sont stimulées par la lumière, les flavonols sont accumulés dans les tissus extérieurs et aériens des plantes (feuilles) et de leurs fruits (peau) (Hakkinen *et al.* 1999; Lee *et al.* 2002; Zheng & Wang 2003).

Les flavanols sont les seuls flavonoïdes qui n'existent pas naturellement sous forme de glycosides. Elles existent seulement en tant que monomères (catéchine) ou polymères (PA). La catéchine et l'épicatéchine sont les flavanols principales qui se trouvent dans le bleuet (Prior *et al.* 2001; Harris *et al.* 2007; Stevenson *et al.* 2007).

Tannins condensés (Pro-anthocyanidines)

Le bleuet contient une quantité élevée de tannins condensés, ou PAs. Ce sont des dimères, des oligomères et des polymères de la catéchine qui sont formés par des liaisons entre C4 et C8 (ou C6) (Buelga-Santos & Scalbert 2000). Cependant, les PAs peuvent être aussi formés par liaisons entre C2-O5 ou C2-O7, appelées liaisons structurales de type A. Les PAs peuvent être classés selon leurs composants obtenus suite à l'hydrolyse acide. Ils sont nommés par le système de nomenclature des anthocyanidines. Les PAs les plus présents sont les procyanidines alors que les moins communs sont les properlargonidines et les prodelphinidines. Il est difficile de quantifier

les PAs dans le bleuet et les aliments à cause des variations élevées de leur structure et de leur polymérisation (Gu *et al.* 2004; Manach *et al.* 2004). Cependant, il est connu que le bleuet contient une quantité élevée de PAs (Gu *et al.* 2002).

Tannins hydrolysables (Ellagitannins et Gallotannins)

Les tannins hydrolysables sont classifiés en GTs et ETs. Les GTs sont des esters de l'acide gallique tandis que les ETs sont des esters de l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP: 6,6'-dicarbonyl-2,2',3,3',4,4'-hexahydroxybiphenyl). En hydrolysant des ETs, l'acide HHDP se réarrange spontanément pour libérer l'acide éllagique. Dans les plantes, les monomères ET peuvent être continuellement oxydés et forment des dimères, des trimères et des tétramères dont le poids moléculaire peut atteindre jusqu'à 4000 Da (Ferreira *et al.* 2005; Ferreira *et al.* 2008). Jusqu'à présent, les tannins hydrolysables n'ont pas encore identifiés dans le bleuet sauvage. En fait, il est normalement présumé que le bleuet et la canneberge contiennent principalement des PAs tandis que les mûres, les framboises noires, les framboises rouges et les fraises contiennent plutôt des ETs (Seeram 2008). Cependant, comme la biotransformation du jus de bleuet avec les bactéries *S. vaccinii* produit une grande quantité d'acide gallique, il est possible que les tannins hydrolysables, au moins les GTs, existent dans le bleuet et la canneberge (Martin & Matar 2005; Vuong *et al.* 2006).

Acides phénoliques

Le bleuet contient une grande variété d'acides phénoliques, qui sont des dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et l'acide hydroxycinnamique. Les acides

hydroxycinnamiques sont plus communs que les acides hydroxybenzoïques. Ils comprennent principalement les acides chlorogénique, quinique, caféique, férulique, p-, o-, et m-coumarique. Les acides hydroxybenzoïques dans le bleuet sont les acides gallique, vanillique, syringique, protocatéchuique, ellagique, m- et p-hydroxybenzoïque (Hakkinen *et al.* 1999; Zheng & Wang 2003; Zadernowski *et al.* 2005). Même si les acides phénoliques se trouvent en forme libre dans le bleuet, ils peuvent être considérés comme des composants des polymères complexes comme les tannins hydrolysables (GTs ou ETs) ou les PAs. (Ferreira *et al.* 2005; Ferreira *et al.* 2008). Ils peuvent être ainsi libérés de leur composés parents *in vivo* par les changements de pH physiologique, par action enzymatique ou par l'action des bactéries du tube digestif, ou *in vitro*, par les conditions de stockage et de traitement (Lee *et al.* 2002; Srivastava *et al.* 2007; Brownmiller *et al.* 2008).

Stilbénoides

Les stilbènes sont des composés ayant une base phénolique. Le représentant vedette de ce groupe est le resvératrol (3,4',5-trihydroxystilbène). Le resvératrol est reconnu comme étant responsable des effets bénéfiques du vin rouge sur les maladies cardiovasculaires, le "paradoxe français" (Vidavalur *et al.* 2006a; Dudley *et al.* 2008). Récemment, il a attiré encore plus d'attention grâce à d'autres activités thérapeutiques comme antidiabétique, anti-obésité et anticancéreux (Baur & Sinclair 2006; Kundu & Surh 2008; Pearson *et al.* 2008). Le resvératrol et ses analogues, ptérostilbène et picéatannole, ont été trouvés chez les plantes membres du genre *Vaccinium*, incluant le bleuet (Lyons *et al.* 2003; Rimando *et al.* 2004).

Lignans, Triterpènes et Stéroïdes

Même si les composés bioactifs prédominants dans le bleuet sont principalement des composés phénoliques, les effets bénéfiques d'autres composés non-polaires ont été également rapportés. Ces composés comprennent l'acide ursolique, les hydroxycinamates de triterpène et le β -sitostérol. Ils sont identifiés chez les plantes membres des espèces *Vaccinium* comme la canneberge (Kraft *et al.* 2005) et le bleuet "highbush" (Neto 2007).

Les lignans, eux, sont formés de deux unités phénylpropane, comme le sécoisolaricirésinole et le matairésinole. Ils ont été retrouvés dans les petites baies incluant le bleuet (Mazur *et al.* 2000; Kraft *et al.* 2005).

1.2.3. Biodisponibilité et métabolisme des composés bioactifs du bleuet

Les composés phénoliques sont prédominants chez le bleuet. Cependant, l'estimation de leur teneur dans les aliments est difficile à cause de leurs structures complexes et mal définies. De plus, leurs standards ne sont pas commercialement disponibles. Par conséquent, les données sur leur apport diététique, leur biodisponibilité et leur pharmacocinétique chez les humains sont limitées. Il n'existe que des données partielles sur certains composés phénoliques, tels que les anthocyanines et les flavonols, grâce à l'analyse directe de la nourriture ou aux compilations bibliographiques (Manach *et al.* 2004; Wu *et al.* 2006).

La consommation des flavonols est en moyenne de 20-25 mg/jour dans sept pays incluant les États-Unis, le Danemark et les Pays-Bas. En Finlande, la moyenne de consommation des polyphénols est de 863 ± 415 mg/jour dont 75% provient des acides

phénoliques; les PAs en fournissent 14% tandis que les anthocyanidines et les autres flavonoïdes contribuent à 10% (Ovaskainen *et al.* 2008). De plus, 100g de bleuets peuvent fournir 445 mg de polyphénols, qui se composent de 325 mg de PAs, 113 mg d'anthocyanines et 7 mg de flavonoïdes (Williamson & Holst 2008).

Plusieurs études ont démontré que malgré la présence prédominante des composés phénoliques dans la diète humaine, ils ne sont pas nécessairement les plus actifs *in vivo* puisqu'ils sont mal absorbés, hautement métabolisés ou rapidement éliminés dans le système digestif. De plus, à cause des activités digestives et hépatiques, les activités physiologiques des métabolites phénoliques biodisponibles dans le sang et dans les organes ciblés peuvent être totalement différentes de celles de leurs formes natives (D'Archivio *et al.* 2007; Nielsen & Williamson 2007; Scholz & Williamson 2007; Holst & Williamson 2008; Singh *et al.* 2008). En fait, l'étude détaillée de la biodisponibilité des composés phénoliques est essentielle pour comprendre leurs effets bénéfiques sur la santé des humains.

La plupart des composés phénoliques sont présents dans la nourriture sous forme d'esters, de glycosides ou de polymères qui ne peuvent pas être facilement absorbés. En général, ils doivent être hydrolysés par les enzymes intestinales ou par la microflore intestinale avant d'être absorbés (Prasain & Barnes 2007). Cependant, la microflore diminuera la quantité des polyphénols absorbés puisqu'elle les dégrade en même temps (Hur *et al.* 2000; Lin *et al.* 2003). Durant l'absorption et le passage dans la circulation veineuse mésentérique, les composés phénoliques sont conjugués (méthylés, sulfatés, glucuronidés) dans l'intestin et dans le foie (Prasain & Barnes 2007; Spencer *et al.* 2008).

Ce processus de détoxification métabolique facilite l'élimination biliaire et urinaire. Les aglycones sont ainsi indétectables dans le sang ou présents en faibles concentrations après la consommation de doses nutritionnelles.

Les composés phénoliques circulant dans le sang sont les dérivés conjugués qui se lient extensivement à l'albumine (Williamson & Manach 2005; Williamson & Holst 2008). Les composés phénoliques sont capables de pénétrer dans les tissus, particulièrement ceux où ils sont métabolisés. Cependant, les données de leur capacité d'accumulation dans les tissus cibles sont limitées (Manach *et al.* 2005; Kalt *et al.* 2008). Les composés phénoliques sont sécrétés dans le duodénum via la voie biliaire. Ils subissent ensuite l'action des enzymes bactériennes, particulièrement de la glucuronidase, dans les segments distaux de l'intestin. Suite à l'hydrolyse par enzyme, ils peuvent être réabsorbés. Ce cycle entéro-hépatique peut induire une demi-vie plus longue des composés phénoliques dans l'organisme (Prasain & Barnes 2007; Spencer *et al.* 2008).

Métabolisme des anthocyanines

Parmi les composés actifs du bleuet, le métabolisme et la biodisponibilité des anthocyanines ont récemment fait l'objet de plusieurs études chez les humains et dans les modèles animaux (Prior & Wu 2006; McGhie & Walton 2007; Garcia-Alonso *et al.* 2008; Mertens-Talcott *et al.* 2008). La biodisponibilité des anthocyanines diffère de celle des autres flavonoïdes par trois aspects clés. Premièrement, leur biodisponibilité apparente est uniformément très faible. Toutes les études indiquent la présence d'au plus 0,1% de la dose ingérée dans l'urine. Cependant, malgré leur faible dose, ils sont détectables dans le plasma humain (McGhie & Walton 2007). Deuxièmement, leur

absorption se passe très rapidement après l'ingestion. Le T_{max} dans le plasma est de l'ordre de 15-60 minutes. Ces observations suggèrent que les anthocyanines sont absorbés à partir de l'estomac. L'élimination des anthocyanines dans le plasma respecte les cinétiques de premier ordre. La plupart des anthocyanines sont excrétés dans l'urine dans un délai de 4h après l'ingestion (Mertens-Talcott *et al.* 2008). Troisièmement, les glycosides des anthocyanines sont absorbés, distribués dans la circulation sanguine puis excrétés dans l'urine d'une façon intacte (Mazza *et al.* 2002).

Le bleuet contient une grande variété d'anthocyanines qui sont les monoglycosides (galactoside, glucoside, ou arabinoside) de cinq différents aglycones (delphinidine, cyanindine, pétunidine, péodinine, malvidine). Parmi les 25 anthocyanines du bleuet, 19 ont été détectés dans le sang après leur ingestion chez les humains (Mazza *et al.* 2002). Certains anthocyanines peuvent être détectés sous forme méthylée et glucuronidée après la consommation du bleuet (Wu *et al.* 2002). Cependant, 80% des anthocyanines du bleuet se rendent au colon suite à son ingestion (Kahle *et al.* 2006). En prenant l'excrétion urinaire comme une indication de l'absorption, on constate que le glycoside de delphinidine est mieux absorbé que le glycoside de malvidine, et que les galactosides sont mieux absorbés que les arabinosides. Ces résultats indiquent que la nature de l'aglycone et du sucre peuvent affecter l'absorption des anthocyanines (McGhie *et al.* 2003). Les anthocyanines intacts sont détectés dans le foie, les yeux, le cortex et le cervelet des cochons nourris avec le bleuet (Kalt *et al.* 2008).

La faible biodisponibilité des anthocyanines peut être expliquée par leur métabolisme rapide. Récemment, l'acide protocatéchuique (PCA) a été identifié comme le métabolite

principal circulant dans le sang après l'ingestion du glycoside de cyanindine (Vitaglione *et al.* 2007). Le PCA a une activité anti-oxydante remarquable et peut expliquer la libération lente mais persistante des composés phénoliques dans le sang à partir de l'intestin. Il représente ainsi un réel mécanisme de défense contre les processus oxydatifs de l'organisme (Galvano *et al.* 2008).

Métabolisme des flavonols

Parmi les flavonols du bleuet, la quercétine, la plus présente des flavonols, est la plus étudiée (Graefe *et al.* 1999; Graefe *et al.* 2001; Erlund *et al.* 2006; Bischoff 2008; Boots *et al.* 2008). La quercétine est biodisponible chez les humains (Graefe *et al.* 1999; Graefe *et al.* 2001) et la consommation du bleuet peut en doubler sa concentration dans le plasma après plusieurs semaines (Erlund *et al.* 2006).

La présence des glycosides de quercétine intacts dans le plasma a provoqué un grand débat. Cependant, il est maintenant accepté que tels composés n'existent pas dans le plasma après une dose nutritionnelle, et la quercétine circule dans le sang sous forme conjuguée (glucuronidée, sulfatée) (Manach *et al.* 2005). La biodisponibilité de quercétine diffère d'une source alimentaire à l'autre, dépendamment de la nature du sucre lié à la quercétine. En général, les glucosides de quercétine sont mieux absorbés que l'aglycone quercétine, sauf le rhamnoglucoside de quercétine (rutine), qui est moins bien et moins rapidement absorbé que l'aglycone quercétine (Bischoff 2008). Durant le métabolisme des flavonols, les acides phénoliques peuvent être produits également par la microflore intestinale. La dégradation de la quercétine produit principalement les acides 3, 4-dihydroxy phénylacétique, 3-méthoxy-4-hydroxy phénylacétique, et 3-

hydroxy phénylacétique (Manach *et al.* 2005). Aujourd'hui, la quercétine est utilisée comme biomarqueur de la consommation des flavonoïdes à partir de fruits et légumes (Bischoff 2008).

Métabolismes des tannins

L'évaluation de la biodisponibilité et du métabolisme des tannins demeure un défi, à cause de leur structure mal définie, de l'absence des standards authentiques et des données imprécises de leur composition dans la nourriture. Il y a ainsi très peu de rapports sur la biodisponibilité des PAs et ETs (D'Archivio *et al.* 2007). Même si la détection des dimères de PAs B1 et B2 est rapportée (Holt *et al.* 2002), les études *in vitro* et *in vivo* indiquent que la polymérisation altère considérablement l'absorption intestinale des tannins (Deprez *et al.* 2001; Donovan *et al.* 2002; Gonthier *et al.* 2003). La punicalagine (PM 1084), un ET, est le plus complexe polyphénol qui peut être détecté intact dans le plasma des rats (Cerdeira *et al.* 2003).

Étant donné la mauvaise absorption des tannins sous leurs formes intactes, il se peut que leurs effets biologiques ne proviennent pas de leurs actions directes. Ces effets peuvent donc être produits par leurs métabolites, qui peuvent être plus aisément absorbés. En fait, les tannins peuvent être scindés en dimères et monomères dans l'environnement acide gastrique (Spencer *et al.* 2000; Zhu *et al.* 2002). Ils peuvent aussi être dégradés par la microflore en plusieurs acides phénoliques et aromatiques et autres métabolites (Cerdeira *et al.* 2005a; Cerdeira *et al.* 2005b; Manach *et al.* 2005). Les ETs peut former l'acide ellagique dans le plasma humain (Seeram *et al.* 2004). Tandis que le métabolisme microbien des PAs n'a jamais été rapporté chez les humains, celui des ETs a été bien

démonstré (Cerda *et al.* 2004; Cerda *et al.* 2005a; Cerda *et al.* 2005b). Puisque le bleuet contient principalement des PAs, leur dégradation par la microflore et leurs métabolites doivent être étudiés davantage chez les humains.

1.2.4. Activité anti-oxydante du bleuet

Les ROS (*Reactive Oxygen Species*) et les RNS (*Reactive Nitrogen Species*), aussi appelés les radicaux libres, sont des molécules hautement réactives qui sont produites suite à plusieurs réactions biologiques comme la chaîne de respiration mitochondriale et les conditions inflammatoires (Droge 2002; Valko *et al.* 2007; Martinez & Andriantsitohaina 2008; Paravicini & Touyz 2008; Touyz & Schiffrin 2008). La libération des ROS par les macrophages fait également partie du mécanisme de défense de l'organisme (Valko *et al.* 2007). La production de l'anion superoxyde ($O^{\bullet 2-}$) est générée par l'enzyme NADPH oxydase des leucocytes activés dans les sites inflammatoires, et/ou par l'enzyme xanthine oxydase activée dans les conditions d'ischémie/réperfusion (Paravicini & Touyz 2008). Le peroxyde d'hydrogène est formé par la dismutation soit spontanée, soit catalysée par l'enzyme SOD (*Superoxide Dismutase*). Suite à la réaction Fenton/Haber-Weiss, le radical OH^{\bullet} est produit à partir de H_2O_2 et Fe^{2+} (gain de la réduction de Fe^{3+} par $O^{\bullet 2-}$). Une autre voie de réaction du peroxyde d'hydrogène dans les leucocytes activés est la génération d'hypochlorite (HOCl) par l'enzyme myéloperoxydase impliquant les ions Cl^- (Droge 2002). Le peroxynitrite (ONOOH) est formé à partir de $O^{\bullet 2-}$ and NO^{\bullet} , qui sont produits dans les leucocytes activés (Touyz & Schiffrin 2008).

L'organisme possède différents mécanismes de défense anti-oxydante contre les ROS. Ce sont les enzymes anti-oxydantes (catalase, superoxyde dismutase, glutathion réductase, glutathion peroxydase), les petites molécules anti-oxydantes (acide urique, glutathion, albumine, les groupements thiols (SH) des protéines, bilirubine), certaines vitamines (acide ascorbique, α -tocophérol) et les caroténoïdes (Valko *et al.* 2007) qui ont la capacité de réagir de concert pour neutraliser des radicaux libres (Yeum *et al.* 2004).

La déficience de la défense anti-oxydante peut conduire au stress oxydatif, qui est le déséquilibre entre la production des anti-oxydants et la libération des radicaux libres et peut causer le dommage d'autres biomolécules. Étant le ROS le plus réactif, OH^\bullet est capable d'induire l'oxydation d'une variété de biomolécules comme les enzymes, les protéines, les nucléotides et les lipides (Limon-Pacheco & Gonsebatt 2008). Le stress oxydatif joue un rôle important dans le développement des maladies dégénératives chroniques, incluant le cancer, les maladies cardiovasculaires et les processus dégénératifs associés au vieillissement (Valko *et al.* 2007). En fait, l'étape initiale de l'athérosclérose conduisant aux maladies du cœur et à l'infarctus est l'oxydation de LDL (*Low Density Lipoprotein*). Les plaques qui bloquent la circulation artérielle et causent les maladies cardiovasculaires sont formées en partie par les macrophages remplis de LDL oxydée (Willcox *et al.* 2008). Par ailleurs, les bases oxydées de l'ADN représentent des mutagènes puissants impliqués dans le processus de carcinogénèse (Valko *et al.* 2006). Le diabète est aussi associé au dommage oxydatif des biomolécules (Willcox *et al.* 2004).

Par conséquent, les anti-oxydants dérivés de la diète sont importants dans la protection de l'organisme contre les maladies chroniques. Une diète élevée en fruits et légumes, sources principales des anti-oxydants, peut diminuer le stress oxydatif causé par les ROS via plusieurs mécanismes comme la protection des molécules cibles (lipides, protéines, acides nucléiques) contre le dommage oxydatif, la suppression des réponses inflammatoires et le rétablissement de l'homéostasie vasculaire (Willcox *et al.* 2004; Willcox *et al.* 2008).

Les composés phénoliques sont métabolites secondaires dans les plantes. Ils jouent des rôles importants dans la formation des tissus protecteurs ou supporteurs, l'établissement des mécanismes de défense et la signalisation des interactions entre la plante et ses environnements (Boudet 2007). Les composés phénoliques sont aujourd'hui considérés comme de puissants anti-oxydants *in vitro* (Zafra-Stone *et al.* 2007) et *in vivo* (Fernandez-Panchon *et al.* 2008). Ils sont plus puissants que la vitamine E, la vitamine C et les caroténoïdes (Rice-Evans *et al.* 1997). La corrélation inverse entre la consommation de fruits et légumes et le risque de maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, le cancer, le diabète ou l'ostéoporose a été partiellement attribuée à l'activité anti-oxydante des composés phénoliques (Arts & Hollman 2005; Scalbert *et al.* 2005).

L'activité des composés phénoliques provient de leur capacité à donner un électron ou un hydrogène, et de délocaliser un électron impair à l'intérieur de leur structure aromatique. Ils protègent ainsi les molécules biologiques contre l'oxydation. Les propriétés anti-oxydantes des composés phénoliques *in vitro* peuvent être évaluées grâce

à plusieurs méthodes telles que ORAC, TRAP, FRAP (*Ferric-reducing Ability of Plasma*), DCFH-DA, DPPH, ABTS, TOSC, test de Crocin et test de Luminol (Antolovich *et al.* 2002; Sanchez-Moreno 2002). Récemment, les mesures de l'activité anti-oxydante peuvent aussi s'effectuer grâce aux modèles basés sur les cultures cellulaires (Wolfe & Liu 2007; Wolfe *et al.* 2008).

Le bleuet frais démontre la capacité anti-oxydante la plus élevée parmi les aliments mesurés avec les méthodes *in vitro* (Halvorsen *et al.* 2002; Moyer *et al.* 2002; Wu *et al.* 2004). Le jus du bleuet possède une activité anti-oxydante aussi puissante (Seeram *et al.* 2008). De plus, il inhibe l'oxydation des LDL (Seeram *et al.* 2008). L'activité anti-oxydante élevée du bleuet est également démontrée dans les modèles basés sur les cultures cellulaires, telles que les cellules cancéreuses hépatiques HepG2 (Wolfe *et al.* 2008). Jusqu'à ce jour, l'activité anti-oxydante du bleuet n'est que partiellement démontrée *in vivo*, où le sérum des rats nourris avec le bleuet peut protéger les cellules FaO contre la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène (Duffy *et al.* 2008). Par contre, cette activité puissante est prouvée chez les humains. En effet, deux études sur la consommation du bleuet chez les humains démontrent que l'ingestion de 100g de bleuet séché ou comme supplément augmente leurs PAC (*Plasma Antioxidant Capacity*) postprandial (Kay & Holub 2002; Mazza *et al.* 2002). Un supplément de bleuet peut aussi augmenter l'activité de l'enzymes SOD et la concentration du peptide C chez les enfants atteints du diabète de type I (Nemes-Nagy *et al.* 2008). De plus, la consommation quotidienne de bleuets (250g) pendant trois semaines peut significativement diminuer le stress oxydatif chez les fumeurs chroniques (McAnulty *et al.* 2005).

Des études pour élucider les mécanismes moléculaires conduisant à ces effets anti-oxydants du bleuet sont en cours. En général, les effets anti-oxydants des composés phénoliques proviennent de la régulation à la hausse au niveau de la transcription des enzymes anti-oxydantes, et/ou de la régulation de la synthèse de glutathion (Schroeter *et al.* 2002). En fait, plusieurs études démontrent que les composés phénoliques affectent la régulation de la signalisation des ERK1/2 (Martin *et al.* 2003) et MAPKs (Frigo *et al.* 2002), qui maintiennent le contrôle de ces processus ci-dessus.

Tableau 1 : Résumé des études des propriétés anti-oxydantes du bleuet

Référence	Étude	Matériel	Dose
(Halvorsen <i>et al.</i> 2002)	<i>In vitro</i>	Fruit frais entier, broyé, centrifugé.	10 µl du supernageant
(Moyer <i>et al.</i> 2002)	<i>In vitro</i>	Extraction de la poudre du fruit congelé	nd
(Wu <i>et al.</i> 2004)	<i>In vitro</i>	Extraction du fruit séché	40 µl du supernageant
(Seeram <i>et al.</i> 2008)	<i>In vitro</i>	Jus de bleuet	nd
(Wolfe <i>et al.</i> 2008)	<i>In vitro</i>	Extraction du fruit frais	20 µl du supernageant
(Kay & Holub 2002)	Clinique	Poudre du fruit congelé	100 g comme supplément
(Mazza <i>et al.</i> 2002)	Clinique	Poudre du fruit congelé	100 g comme supplément

(Nemes-Nagy <i>et al.</i> 2008)	Clinique	Jus de bleuet concentré	nd
(McAnulty <i>et al.</i> 2005)	Clinique	Fruit frais	250 g

1.2.5. Bleuet et cancer

Les études épidémiologiques démontrent qu'une diète riche en composés phénoliques contribue à la diminution du risque de certains types de cancer (Block *et al.* 1992; Steinmetz & Potter 1996; Vainio & Weiderpass 2006; Stoner *et al.* 2008). Même si les composants prédominants dans le bleuet sont des composés phénoliques comme les anthocyanines, les autres composants phytochimiques peuvent aussi contribuer d'une façon synergique et/ou additionnelle à leurs activités anticancéreuses. Les effets anticancéreux du bleuet sont ainsi le résultat de plusieurs mécanismes d'action complémentaires et superposés. Des récentes études démontrent que les extraits de bleuet et ses constituants phénoliques purifiés inhibent la prolifération cellulaire, modulent l'arrêt du cycle cellulaire et induisent la réparation de l'ADN, la transduction du signal et l'apoptose dans les cellules cancéreuses avec peu ou absence de toxicité sur les cellules normales. Même si la plupart de ces études se concentrent sur l'évaluation des extraits totaux du bleuet, un nombre important de bio-essais guidés a commencé à isoler et identifier des constituants anticancéreux présents dans les extraits de bleuet.

Modulation des voies de signalisation de la prolifération, de l'apoptose et de l'arrêt du cycle cellulaire

Les extraits de bleuet peuvent diminuer, d'une façon dépendante de la dose, la prolifération des cellules cancéreuses du sein MCF-7 humaines (Olsson *et al.* 2004). Ils stimulent également l'apoptose d'une lignée cellulaire cancéreuse humaine HT-29 (du colon), qui exprime l'enzyme COX-2 (*Cyclooxygenase 2*) (Olsson *et al.* 2004). Les extraits de bleuet peuvent inhiber l'activité de COX-2 *in vitro* (Seeram *et al.* 2001). De plus, les extraits de bleuet inhibent la croissance des lignés cellulaires cancéreuses humaines de la bouche, du sein, du colon et de la prostate, d'une manière dépendante de la dose (Seeram *et al.* 2006). Les fractions du bleuet riches en PAs ont une meilleure inhibition de prolifération chez les cellules cancéreuses de la prostate sensibles aux hormones (LNCaP) que sur les cellules insensibles (DU145) (Schmidt *et al.* 2006).

Le jus de bleuet démontre également une inhibition puissante de la croissance des lignées cellulaires cancéreuses de l'estomac, de la prostate, de l'intestin et du sein (Boivin *et al.* 2007). Cette inhibition est produite par l'arrêt du cycle cellulaire. Le jus de bleuet induit la régulation à la baisse des cycline kinases tels que la cdk 3, la cdk 6 et des complexes de cycline D1 et cycline D3. Il inhibe également l'activation de COX-2 et de NFκB, induit par le TNF-α (Boivin *et al.* 2007).

Les autres produits dérivés du bleuet comme la farine de ses pépins sont aussi évalués pour leurs propriétés anticancéreuses. Ils inhibent la prolifération de la lignée cellulaire cancéreuse humaine HT29 (du colon) (Parry *et al.* 2006).

Les effets des composés bioactifs purifiés de bleuet comme la quercétine, l'acide chlorogénique et l'épicatéchine sont étudiés sur les cellules cancéreuses du foie HepG2 humaines. La quercétine inhibe la viabilité des cellules d'une façon dépendante de la dose tandis que l'acide chlorogénique et l'épicatéchine n'ont pas d'effet sur le taux des cellules mortes. Similairement, la quercétine, contrairement à l'acide chlorogénique ou à l'épicatéchine, induit l'apoptose dans les cellules hépatomes. Lors d'expériences sur la progression du cycle cellulaire, la quercétine arrête le cycle cellulaire à la phase G1 avant l'apoptose (Ramos *et al.* 2005).

Angiogenèse

Les approches anti-angiogéniques pour traiter le cancer représentent un domaine de premier ordre en biologie des tumeurs vascularisées. Les agents qui inhibent l'angiogenèse ont un potentiel d'inhiber aussi la croissance tumorale. Ils limitent donc la diffusion de métastase et gardent ainsi le cancer en état de croissance statique pour de longues périodes. Les extraits de bleuet sont aussi étudiés pour leurs propriétés anti-angiogéniques et leur potentiel cytotoxique sur les modèles de cancer. *In vitro*, ils inhibent l'expression du facteur VEGF, le facteur clé de l'angiogenèse des tumeurs, induite par le peroxyde d'hydrogène ou par le TNF- α chez les kératinocytes humaines (Roy *et al.* 2002). De plus, ils inhibent le facteur MCP-1, le facteur qui facilite l'angiogenèse dans les cellules endothéliales tumorales (Atalay *et al.* 2003). Ces effets anti-angiogéniques ont été confirmés *in vivo* où les extraits de bleuet ont clairement annulé l'angiogenèse tumorale chez les souris (Atalay *et al.* 2003; Bagchi *et al.* 2004). Dans ces modèles, ils inhibent également l'expression du facteur MCP-1 et la transcription du facteur NF- κ B. De plus, le prétraitement des cellules endothéliales tumorales avec des extraits de bleuet avant injection dans les animaux diminue leur capacité de former l'hémangiome (Atalay *et al.* 2003).

Antimutagénique

L'étape initiale de la formation d'un cancer est le dommage du génome d'une cellule somatique, produisant une mutation dans un oncogène ou un gène suppresseur de tumeur. Le jus de bleuet et ses extraits ont été étudiés pour leur capacité d'inhibition de la production de ces mutations. Le jus de bleuet inhibe significativement la mutagenèse causée par le mutagène direct Methyl-methanesulfonate ou par le carcinogène métabolique benzopyrène. Les extraits éthanoliques de bleuet démontrent aussi une inhibition puissante sur ces mutations (Hope Smith *et al.* 2004).

Inhibiteurs des enzymes metalloprotéinase

Mise à part les mécanismes anticancéreux discutés ci-dessus, le bleuet démontre également une inhibition de l'activité des enzymes MMPs (*Matrix Metalloproteinase*). Les MMPs sont les enzymes essentielles au développement et au remodelage des tissus, et la surexpression de ces enzymes contribue à plusieurs conditions pathologiques (Yoshizaki *et al.* 2002; Cirillo *et al.* 2007). En particulier, la surexpression des MMPs joue un rôle important dans le processus de métastase des cancers. Elle participe à la protéolyse de la matrice extracellulaire qui conduit à la progression des tumeurs (Pupa *et al.* 2002; Jordan *et al.* 2004; Liu *et al.* 2007; Kahlert *et al.* 2008).

Certaines fractions du bleuet riches en anthocyanines et en PAs peuvent induire une régulation à la baisse des MMPs chez les cellules cancéreuses humaines de la prostate DU145. Elles agissent probablement via plusieurs mécanismes, dont les voies de signalisation de PKC et de MAPKs qui sont régulées par les flavonoïdes (Matchett *et al.* 2005). En particulier, la quercétine, un flavonol typique du bleuet, exerce son rôle de

chimioprotection via des effets complexes sur la transduction du signal impliqué dans la prolifération cellulaire, incluant l'augmentation de l'expression des TIMPs (*Tissue Inhibitors of MMPs*) endogènes (Morrow *et al.* 2001), ou la diminution de l'expression de la MMP-9 (Lin *et al.* 2008). Un autre composé phénolique du bleuet, l'acide ursolique (Neto 2007), peut réduire l'expression de la MMP-9 chez les cellules fibrosarcomes et inhibe ainsi l'invasion tumorale (Huang *et al.* 2008).

Activité de chimioprévention du bleuet

Lors d'une étude sur les rats Fisher 344, la consommation de bleuet ou de jus de bleuet pendant 17 semaines a diminué la formation des ACF (*Aberrant Crypt Foci*) induit par l'azoxyméthane (Boateng *et al.* 2007). Les résultats démontrent que l'activité de l'enzyme GST (Glutathione S-transférase) dans le foie des rats nourris avec le bleuet et le jus de bleuet est plus élevée par rapport aux rats du groupe témoin (Boateng *et al.* 2007). Dans une autre étude chez des souris, l'extrait du bleuet diminue, d'une manière dépendante de la dose, la taille des tumeurs HE (*Hemangioendothelioma*) (Gordillo *et al.* 2009). De plus, l'extrait de bleuet augmente la viabilité des souris traitées par rapport aux souris témoins. Les résultats démontrent que l'extrait inhibe la formation de tumeurs par activité anti-angiogénique et par inhibition des voies de signalisation de JNK et NF- κ B (Gordillo *et al.* 2009).

Tableau 2 : Résumé des études des propriétés anticancéreuses du bleuet

Référence	Étude	Matériel	Dose
(Olsson <i>et al.</i> 2004)	<i>In vitro</i>	Extraction du fruit congelé	0.01-350 μ g/mL
(Seeram <i>et al.</i> 2006)	<i>In vitro</i>	Extraction du fruit frais	200 μ g/mL

(Schmidt <i>et al.</i> 2006)	<i>In vitro</i>	Extraction du fruit frais	20 µg/mL
(Boivin <i>et al.</i> 2007)	<i>In vitro</i>	Jus de bleuet	0, 10, 20, 30, 40, 50 µl/mL
(Parry <i>et al.</i> 2006)	<i>In vitro</i>	Extraction de la poudre des pépins	3, 6 mg équivalent de la poudre/mL
(Ramos <i>et al.</i> 2005)	<i>In vitro</i>	Quercétine Acide chlorogénique (-) épicatechine	50-300 µM 205-1000 µM 100-1000 µM
(Roy <i>et al.</i> 2002)	<i>In vitro</i>	Extraction des pépins	25 µg/mL
(Atalay <i>et al.</i> 2003)	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Extraction du fruit congelé	50 µg/mL
(Bagchi <i>et al.</i> 2004)	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Extraction du fruit congelé	50 µg/mL
(Hope Smith <i>et al.</i> 2004)	<i>In vitro</i>	Jus de bleuet Extraction du fruit congelé	50-100 µl/mL
(Matchett <i>et al.</i> 2005)	<i>In vitro</i>	HPLC fractions du jus de bleuet	0,1-1 µg/mL
(Morrow <i>et al.</i> 2001)	Clinique	Quercétine	30 mg/jour pendant 2 semaines
(Lin <i>et al.</i> 2008)	<i>In vitro</i>	Quercétine	40-80 µM
(Huang <i>et al.</i> 2008)	<i>In vitro</i>	Acide ursolique	20-40 µM
(Boateng <i>et al.</i> 2007)	<i>In vivo</i>	Poudre du fruit congelé	5%
(Gordillo <i>et al.</i> 2009)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit congelé	nd

1.2.6. Bleuets, vieillissement et maladies neurodégénératives

Plusieurs troubles neurologiques d'ordre moteur (Kluger *et al.* 1997) et cognitif (Bartus 1990) se produisent au cours du vieillissement, même en absence de maladie neurodégénérative. Même si les mécanismes induisant ces troubles neurologiques restent à déterminer, il est clair que le stress oxydatif (SO) et l'inflammation sont impliqués (Joseph *et al.* 2000; Joseph *et al.* 2005; Lau *et al.* 2007b). Ces troubles de fonction du cerveau induits par le SO sont dus, en partie, à une baisse des mécanismes de défense anti-oxydants endogènes et à une augmentation de la vulnérabilité du cerveau face aux effets néfastes des dommages oxydatifs (Le Forestier *et al.* 2008; Mancuso *et al.* 2008; Pratico 2008; Yacoubian & Standaert 2008). Ainsi, la clé pour réduire ces troubles neurologiques est de modifier l'environnement neuronal, de sorte que l'inflammation neuronale, le SO et la vulnérabilité du cerveau face à ces derniers soient diminués.

Par ailleurs, les études épidémiologiques indiquent que les anti-oxydants nutritionnels peuvent prévenir l'apparition de la démence (Solfrizzi *et al.* 2003) et fournir une protection contre l'infarctus (Sweeney *et al.* 2002; Solfrizzi *et al.* 2003). De plus, les suppléments anti-oxydants peuvent fournir une protection contre les maladies neurodégénératives liées à l'âge, incluant la maladie de Parkinson (de Rijk *et al.* 1997), la maladie d'Alzheimer (Maxwell *et al.* 2005; Dai *et al.* 2006) et la sclérose latérale amyotrophique (Di Matteo & Esposito 2003; Ascherio *et al.* 2005). Les études sur les animaux ont apporté des preuves liant la consommation des polyphénols anti-oxydants/anti-inflammatoires présents dans les fruits et légumes à la réduction de neurodégénération causée par le vieillissement ou par la maladie (Shukitt-Hale *et al.* 2007; Duffy *et al.* 2008; Singh *et al.* 2008). Le bleuets contient une grande quantité de

flavonoïdes polyphénoliques et est classé comme l'aliment ayant une activité antioxydante la plus élevée (Seeram *et al.* 2008; Wolfe *et al.* 2008). Le bleuet comme supplément peut être ainsi bénéfique pour prévenir et/ou inverser les modifications de performances motrice et cognitive liées au vieillissement.

En effet, les rongeurs nourris avec une diète contenant le bleuet comme supplément avant l'introduction des traumatismes au niveau du cerveau par l'ischémie (Sweeney *et al.* 2002; Wang *et al.* 2005; Yasuhara *et al.* 2008) ou par 6-hydroxydopamine (Stromberg *et al.* 2005) subissent moins de dommage neuronal. La supplémentation alimentaire avec les extraits de bleuet augmente aussi la survie des neurones transplantés (Willis *et al.* 2005; McGuire *et al.* 2006; Willis *et al.* 2008). De plus, l'ajout de bleuet dans une diète contrôlée peut renverser les déficits liés au vieillissement au niveau du cerveau et des fonctions comportementales chez les animaux âgés (Bickford *et al.* 1999; Joseph *et al.* 1999; Bickford *et al.* 2000; Ramirez *et al.* 2005; Barros *et al.* 2006; Williams *et al.* 2008). En plus de la performance dans le labyrinthe d'eau de Morris, les pertes cognitives en reconnaissance d'objet sont également inversées grâce à un apport de bleuet (Goyarzu *et al.* 2004). Similairement, le bleuet protège les rats contre les déficits de comportement cognitif induits par irradiation (Shukitt-Hale *et al.* 2007). Les rats nourris par une diète contenant 2% d'extrait de bleuet subissent moins de perte de neurone induite par l'acide kainique et démontrent une performance supérieure en apprentissage par rapport aux rats témoins (Duffy *et al.* 2008; Shukitt-Hale *et al.* 2008). Les cellules FaO prétraitées avec le sérum des rats nourris avec l'extrait de bleuet démontrent également un meilleur taux de survie suite au traitement avec le peroxyde d'hydrogène (Duffy *et al.* 2008).

De tous les fruits, c'est le bleuet qui entraîne l'augmentation la plus élevée de la performance motrice, de l'activité GTPase stimulée par le carbachol et de la sécrétion de dopamine (DA) (Joseph *et al.* 1999). Il inverse ainsi les déficits de comportement moteur (Ramirez *et al.* 2005; Shukitt-Hale *et al.* 2005; Barros *et al.* 2006). Le bleuet protège également les rats contre les déficits de comportement moteur induits par irradiation (Shukitt-Hale *et al.* 2007). Tandis que les fraises offrent une meilleure protection des animaux contre les déficits spatiaux dans le labyrinthe chez un modèle rongeur de vieillissement accéléré, le bleuet démontre une meilleure inversion en apprentissage, un comportement dépendant de la fonction d'un striatum intact (Shukitt-Hale *et al.* 2007). Ainsi, les composés phénoliques de ce fruit auraient dû agir dans différentes régions du cerveau pour produire leurs effets bénéfiques et ces effets impliquent des mécanismes plus qu'une simple diminution du SO ou de l'inflammation. En fait, les marqueurs du SO ne sont que légèrement diminués par les diètes chez les humains (Joseph *et al.* 1999), suggérant que ces composés phénoliques des fruits possèdent une multiplicité d'actions, en dehors de l'activité anti-oxydante. D'autres mécanismes possibles qui peuvent expliquer les effets positifs du bleuet comprennent : (i) les effets directs sur la signalisation servant à augmenter les communications neuronales (Joseph *et al.* 2003), (ii) la capacité de tamponner contre l'excès du calcium (Joseph *et al.* 2004), (iii) l'augmentation des protéines HP (*Heat shock Protein*) neuroprotectrices (Galli *et al.* 2006), (iv) la réduction des signaux du stress comme le facteur NF- κ B (Goyarzu *et al.* 2004; Shukitt-Hale *et al.* 2008) et (v) l'abolition de l'expression des cytokines inflammatoires comme le IL-1 β et le TNF- α (Shukitt-Hale *et al.* 2008). De plus, les anthocyanines du bleuet sont retrouvés dans le cerveau et leur concentrations sont en corrélation positive avec la performance cognitive (Andres-Lacueva *et al.* 2005).

Les mesures de plasticité de l'hippocampe, incluant la neurogenèse, sont également augmentés chez les rats nourris par une diète enrichie de bleuet (Casadesus *et al.* 2004). L'expression du facteur IGF-1 ainsi que celle de ses récepteurs et l'activation de la voie ERK-CREB-BDNF sont augmentées chez les rats nourris de bleuet, et cette augmentation est en corrélation avec l'amélioration de la mémoire spatiale de ces animaux (Casadesus *et al.* 2004; Williams *et al.* 2008). De plus, le bleuet abolit l'activation microgliale induite par le LPS (Lipopolysaccharide) ou l'amyloïde β via inhibition de la voie MAPK p44/42 (Lau *et al.* 2007a; Zhu *et al.* 2008).

Les propriétés du bleuet allant de la signalisation aux mesures fonctionnelles sont démontrées dans une étude où des souris transgéniques APP/PS1 sont nourries de bleuet à partir de l'âge de 4 mois jusqu'à l'âge de 12 mois. Ces souris démontrent une performance dans le labyrinthe Y meilleure que les animaux transgéniques témoins et similaire à celles des souris non transgéniques (Joseph *et al.* 2003). Cependant, aucune différence au niveau du nombre de plaques n'a été trouvée entre les souris APP/PS1 nourries de bleuet et le groupe témoin. Des analyses *a posteriori* indiquent que les animaux nourris de bleuet démontrent une augmentation de l'activité GTPase, de l'expression de l'ERK dans l'hippocampe et de l'expression de la PKC α (Protéine Kinase C) dans l'hippocampe et le striatum par rapport aux animaux témoins (Joseph *et al.* 2003). La PKC est impliquée dans la régulation de la plasticité synaptique et de la mémoire à court et à long terme, en particulier de la mémoire spatiale (Sun & Alkon 2006; Alkon *et al.* 2007; Nelson *et al.* 2008). D'autres études confirment que le bleuet augmente l'ERK et que cette augmentation est en corrélation avec l'augmentation de la neurogenèse (Casadesus *et al.* 2004; Williams *et al.* 2008). Par conséquent, les effets

bénéfiques du bleuet sur le comportement des animaux âgés peuvent impliquer l'augmentation de la signalisation cellulaire associée à l'apprentissage et à la mémoire.

En résumé, les interventions nutritionnelles, notamment avec le bleuet, représentent un atout précieux dans le renforcement du cerveau contre les maladies neurodégénératives liées au vieillissement. Le plus tôt ces interventions nutritionnelles commencent, le plus efficacement elles peuvent prévenir ou retarder les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer.

Tableau 3 : Résumé des études du bleuet sur les maladies neurodégénératives

Référence	Étude	Matériel	Dose
(Sweeney <i>et al.</i> 2002)	<i>In vivo</i>	Fruit séché	14.3 % de la diète
(Wang <i>et al.</i> 2005)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Yasuhara <i>et al.</i> 2008)	<i>In vivo</i>	Poudre du bleuet séché	nd
(Stromberg <i>et al.</i> 2005)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Willis <i>et al.</i> 2005)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(McGuire <i>et al.</i> 2006)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Willis <i>et al.</i> 2008)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Bickford <i>et al.</i> 1999)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Joseph <i>et al.</i> 1999)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Bickford <i>et al.</i> 2000)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Ramirez <i>et al.</i> 2005)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Barros <i>et al.</i> 2006)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2.6–3.2 mg/kg/day

(Williams <i>et al.</i> 2008)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Goyarzu <i>et al.</i> 2004)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Shukitt-Hale <i>et al.</i> 2007)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Duffy <i>et al.</i> 2008)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Shukitt-Hale <i>et al.</i> 2008)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Galli <i>et al.</i> 2006)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Andres-Lacueva <i>et al.</i> 2005)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Casadesus <i>et al.</i> 2004)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète
(Lau <i>et al.</i> 2007a)	<i>In vitro</i>	Extraction du fruit frais	50-500 µg/ml
(Zhu <i>et al.</i> 2008)	<i>In vivo</i>	Extraction du fruit frais	2% de la diète

1.2.7. Bleuets et maladies cardiovasculaires

L'athérosclérose est une condition affectant les artères coronaires dans lesquelles l'absorption des lipoprotéines oxydées par l'endothélium et la réponse inflammatoire qui en découle conduisent à la formation de plaques sur la paroi artérielle. Elles causent la restriction du débit sanguin qui aggrave ou produit l'hypertension et éventuellement causent des dommages irréparables au cœur (McLaren & Ramji 2008). Les preuves scientifiques indiquent que la consommation d'une diète riche en flavonoïdes peut diminuer le risque de développer l'athérosclérose, grâce à leur capacité de diminuer l'oxydation de LDL, l'agrégation et l'adhésion des plaquettes, la réponse inflammatoire des tissus vasculaires et d'induire la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Neto 2007; Zafra-Stone *et al.* 2007).

L'accumulation des LDL oxydées dans l'intima et leur absorption par les macrophages est le point de départ de l'athérosclérose. Elle peut être limitée par la présence d'antioxydants qui diminuent le dommage initial des LDL et neutralisent les effets des enzymes oxydatives produites par les macrophages. Le bleuet peut inhiber l'oxydation des lipides et des protéines (Viljanen *et al.* 2004). La consommation de bleuet comme supplément peut ainsi diminuer la formation de LDL oxydées et prévenir l'athérosclérose. Les mécanismes d'action du bleuet qui sous-tendent leurs effets bénéfiques dans l'athérosclérose sont présentement à l'étude. Le ptérostilbène, un composant du bleuet, active le PPAR α (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*), diminue les LDL et augmente les HDL plasmatique (Rimando *et al.* 2005). Il inhibe aussi la production des médiateurs inflammatoires comme le NF- κ B, l'AP-1, la COX-2 et l'iNOS (Cichocki *et al.* 2008).

Un autre mécanisme possible pour diminuer les lipides plasmatiques implique la liaison aux acides biliaires et leur excrétion. Les fibres alimentaires et d'autres phytonutriments peuvent se lier aux acides biliaires et augmenter ainsi leur excrétion. Cette augmentation stimule ensuite la conversion du cholestérol en acides biliaires et diminue ainsi la concentration de cholestérol plasmatique (Chou *et al.* 2008; Theuwissen & Mensink 2008). Une étude récente indique que le bleuet est le plus efficace des fruits riches en anthocyanines qui peuvent se lier aux acides biliaires et son activité est comparable à 47% à celle de la cholestyramine, un médicament connu pour traiter l'hypercholestérolémie (Kahlon & Smith 2007).

Les cellules endothéliales de la paroi du système cardiovasculaire sont constamment en contacts avec les ROS générées par les monocytes et les neutrophiles. Elles répondent à ces stimulations par la production de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion, un événement qui joue un rôle clé dans l'athérogenèse et la rupture des plaques (McLaren & Ramji 2008). Le bleuet peut diminuer la vulnérabilité endothéliale à l'oxydation et à l'inflammation. Les anthocyanines et les acides hydrocyanimiques du bleuet peuvent protéger les lipides membranaires contre l'oxydation (Youdim *et al.* 2002). Les anthocyanines sont particulièrement efficaces pour inhiber la régulation à la haute des médiateurs inflammatoires induits par le TNF- α , comme IL-8, MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) et ICAM-1 (*Intracellular Adhesion Molecule-1*) (Youdim *et al.* 2002). Ces études attribuent donc un rôle protecteur aux composés phénoliques du bleuet dans le contexte des stress oxydatifs et inflammatoires du système cardiovasculaire.

De récentes études suggèrent que les composés du bleuet peuvent modifier la composition des glycosaminoglycans (GAGs), un groupe des macromolécules produits par l'endothélium vasculaire et les cellules du muscle lisse (Kalea *et al.* 2006). Les GAGs participent à l'organisation de la matrice extracellulaire et régulent, par interaction avec d'autres molécules, la prolifération, la migration, l'adhésion et la signalisation cellulaire ainsi que la coagulation et le métabolisme des lipoprotéines (Karamanos 1998; Theocharis *et al.* 1999). L'inflammation chronique et la progression de l'athérosclérose sont liées aux GAGs sursulfatés (Tovar *et al.* 1998). La teneur en GAGs de l'aorte des rats nourris au bleuet est significativement plus élevée que celle des rats témoins, et leur teneur en GAGs sulfatés est diminuée. On attribue à cette

augmentation des GAGS la capacité de modifier la matrice extracellulaire, l'activité de la lipoprotéine lipase et la transduction du signal dans l'endothélium vasculaire et les cellules du muscle lisse (Norton *et al.* 2005). De plus, la consommation de bleuet comme supplément améliore également la machinerie de contractilité des muscles lisse par la suppression de la contraction contrôlée par le récepteur adrénérgique $\alpha 1$ (Norton *et al.* 2005). La nature des composés responsables de cette activité et leurs mécanismes d'action sont présentement sous investigation.

En résumé, les preuves scientifiques suggèrent que les composés phytochimiques du bleuet, en particulier les PAs, les anthocyanines, la quercétine, l'acide ursolique et les stilbenes, ont un effet synergique protecteur contre les processus oxydatifs impliqués dans le développement des maladies vasculaires. Ceci inclut la prévention contre le dommage oxydatif des LDL et la nécrose ou l'apoptose cellulaire induites par le SO. D'autres mécanismes impliquent la diminution d'expression des cytokines inflammatoires, la diminution de l'absorption des LDL par la paroi vasculaire ainsi que des changements de structure dans la matrice extracellulaire.

Tableau 4 : Résumé des études du bleuet sur les maladies cardiovasculaires

Référence	Étude	Matériel	Dose
(Viljanen <i>et al.</i> 2004)	<i>In vitro</i>	Fractions par HPLC de l'extrait du fruit frais	1,4-8,4 $\mu\text{g/mL}$
(Kahlon & Smith 2007)	<i>In vitro</i>	Poudre du fruit séché	103-107 mg
(Youdim <i>et al.</i> 2002)	<i>In vitro</i>	Fractions par HPLC de	0.1 mg/ml

		l'extrait du fruit frais	
(Kalea <i>et al.</i> 2006)	<i>In vivo</i>	Poudre du fruit séché	8% (w/w)
(Norton <i>et al.</i> 2005)	<i>In vivo</i>	Poudre du fruit séché	8% (w/w)

1.2.8. Obésité et diabète

L'insuline est l'hormone principale de l'homéostasie de glucose. La liaison de l'insuline à la sous-unité α de son récepteur induit une autophosphorylation rapide de sa sous-unité β , qui permet ensuite la phosphorylation de la tyrosine des IRS (*Insulin Receptor Substrate*) 1 et 2 (Saltiel & Kahn 2001). L'association des IRS au PI3K (*Phosphoinositide-3 kinase*) active ce dernier, qui active à son tour l'Akt/PKB (*Protein Kinase B*) (Saltiel & Kahn 2001). L'Akt/PKB est le moteur de l'action métabolique de l'insuline, incluant l'absorption de glucose dans les tissus musculaires et adipeux, la synthèse du glycogène dans le foie et le muscle, et le dépôt de gras dans les adipocytes (Chang *et al.* 2004). Il phosphoryle et inactive aussi la GSK-3 β (*Glycogen Synthase Kinase*), un régulateur négatif de la glycogène synthétase, et augmente ainsi la synthèse de glycogène et des protéines (Dugo *et al.* 2006). Il participe également à la croissance et à la survie cellulaire via la voie de mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) (Bodine *et al.* 2001; Shaw 2008).

L'obésité induit un état inflammatoire chronique caractérisé par l'augmentation des médiateurs inflammatoires dans le plasma et dans le tissu adipeux (Martyn *et al.* 2008). Elle a un grand impact sur le métabolisme du glucose, des lipides et de l'énergie (Hotamisligil 2006; Hotamisligil & Erbay 2008). Plusieurs voies de signalisation ont été

proposées pour expliquer la pathogenèse de l'inflammation associée à l'obésité tels que l'activation du TLR4 (Toll-like Receptor) par les acides gras (Shi *et al.* 2006; Tsukumo *et al.* 2007), l'activation des kinases PKC et JNK par les dérivés des acides gras (diacylglycéride ou céramide) (Yu *et al.* 2002; Holland *et al.* 2007), l'induction de stress de l'ER (*Endoplasmic Reticulum*) (Nakatani *et al.* 2005), l'augmentation d'activité des ROS (Houstis *et al.* 2006) et l'activation des macrophages suite à la mort des adipocytes (Strissel *et al.* 2007).

L'obésité induit la résistance à l'insuline des tissus périphériques et conduit éventuellement le diabète de type II (de Ferranti & Mozaffarian 2008). Premièrement, les adipocytes intensifient la libération des acides gras libres et leur accumulation dans les organes cibles comme le muscle, le foie et les cellules β pancréatiques. Ils élèvent ainsi la production de céramide, qui active ensuite la PKC θ (Kim *et al.* 2004), la S6K (*Ribosomal Protein S6 Kinase*) (Tremblay *et al.* 2007) et la voie JNK/SAPK (Prada *et al.* 2005). Ces dernières induisent la phosphorylation de l'IRS-1 sur 3 résidus sérine (307, 612 et 632), qui s'oppose à sa phosphorylation en tyrosine et inhibe ainsi la signalisation de l'insuline (Grounds *et al.* 2008). Deuxièmement, les adipocytes sécrètent des hormones (leptine, résistine) et les cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-1 β) impliquées dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline (de Ferranti & Mozaffarian 2008; Grounds *et al.* 2008). Ces dernières stimulent d'autres médiateurs inflammatoires tels que le NF- κ B et le JNK/SAPK qui induisent également la phosphorylation des sérines de l'IRS-1. Cependant, c'est l'apoptose des adipocytes qui est l'événement primaire causant l'insensibilité à l'insuline (Harman-Boehm *et al.* 2007). La libération de MCP-1 suivant l'apoptose des adipocytes engendre l'infiltration des macrophages, ce

qui intensifie la sécrétion des cytokines inflammatoires (Harman-Boehm *et al.* 2007). L'infiltration des macrophages se produit aussi dans le foie où l'inflammation hépatique engendre la fibrose hépatique, la résistance à l'insuline, la peroxydation des lipides et l'apoptose des hépatocytes (Schattenberg *et al.* 2006; Hotamisligil & Erbay 2008). Enfin, le récepteur nucléaire PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-activated Receptor*) est aussi ciblé par les signaux inflammatoires pour provoquer la résistance à l'insuline (Gao *et al.* 2006). L'activité transcriptionnelle de PPAR γ est nécessaire pour maintenir la sensibilité à l'insuline et le métabolisme des lipides (Laplante *et al.* 2006). Le TNF- α ou l'IL-1 active la voie IKK/NF- κ B et inhibe la fonction du PPAR γ , probablement via l'augmentation d'un corépresseur nucléaire (Suzawa *et al.* 2003; Gao *et al.* 2006).

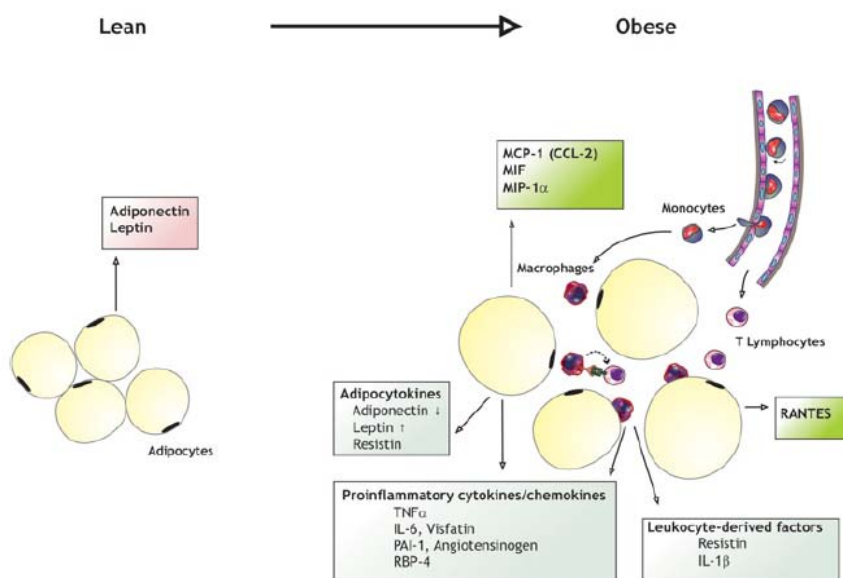


Figure 2 : Mécanismes conduisant à l'inflammation par l'obésité

Dans les conditions physiologiques normales, les patients qui développent une résistance à l'insuline suite à l'obésité peuvent augmenter la sécrétion d'insuline et maintenir l'homéostasie de glucose pour une longue période, évitant le développement du diabète (Marchetti *et al.* 2006). Au contraire, chez les patients qui subissent une dysfonction des cellules β -pancréatiques, la sécrétion d'insuline devient progressivement trop basse pour répondre à la demande des tissus périphériques (Prentki & Nolan 2006). Par conséquent, la glycémie s'élève, passant de l'état normal à l'intolérance au glucose et éventuellement à la manifestation du diabète (Chang-Chen *et al.* 2008).

La dysfonction des cellules β -pancréatiques liée au diabète de type II est induite par plusieurs facteurs génétiques et acquis, qui ne sont pas encore totalement clarifiés. Plusieurs gènes ont été associés à la dysfonction de ces cellules, tels que les gènes codant les facteurs de transcription, les protéines impliquées dans le métabolisme du glucose et les molécules de la voie de signalisation de l'insuline (Calpain10, ARNT) (Sladek *et al.* 2007; Meyre *et al.* 2009). La glucotoxicité et la lipotoxicité sont les deux principaux facteurs acquis causant le dommage des cellules β -pancréatiques (Chang-Chen *et al.* 2008). L'exposition prolongée de ces cellules à une concentration élevée en glucose stimule toutes les voies conduisant à l'augmentation de la production des ROS et du stress oxydatif via la phosphorylation oxydative, la suractivation de la voie d'hexosamine et l'activation de la PKC (Poitout & Robertson 2002; Prentki & Nolan 2006). En parallèle, l'accumulation des acides gras et de leurs métabolites dans les cellules β -pancréatiques induit l'inhibition de l'expression du gène de l'insuline (Prentki & Nolan 2006). De plus, les gluco- et lipotoxicité augmentent l'apoptose chez les cellules β -pancréatiques (Lupi *et al.* 2002; Andreozzi *et al.* 2004). Une concentration

élevée de glucose cause la surexpression des gènes pro-apoptotiques Bad, Bid, et Bik (Andreozzi *et al.* 2004) tandis que l'accumulation des acides gras diminue l'expression de Bcl-2, augmente la production du céramide, l'activation des caspases et l'apoptose (Lupi *et al.* 2002).

L'augmentation de la déposition du polypeptide amyloïde d'îlot (IAPP) dans les îlots peut aussi contribuer à la dysfonction et à l'apoptose des cellules β -pancréatiques (Hoppener & Lips 2006; Ritzel *et al.* 2007). Le gène de l'IAPP est exprimé presque exclusivement dans les cellules bêta et la protéine est cosécrétée avec l'insuline (Cooper *et al.* 1987; Westermark *et al.* 1987). L'augmentation de la production de l'insuline élève également celle de l'IAPP et cette concentration élevée cause l'aggrégation, la fibrillation, la formation des oligomères d'IAPP toxiques et l'amylose des îlots (Meier *et al.* 2006; Ritzel *et al.* 2007). Le mécanisme/effet commun possible entre la glucotoxicité, la lipotoxicité et la déposition d'IAPP est la réaction inflammatoire au niveau des îlots pancréatiques, puisqu'il y a l'infiltration des macrophages et augmentation de l'expression de l'IL-1 β (Donath *et al.* 2005; Ehses *et al.* 2007).

Le diabète de type II associé à l'obésité est caractérisé par l'augmentation de la concentration de glucose dans le sang, suite à une dysfonction des cellules β -pancréatiques, une élévation de la production de glucose par le foie (gluconéogenèse et glycogénolyse) et une diminution de la capture de glucose par les tissus périphériques (Wellen & Hotamisligil 2005). De plus, la diminution de la production d'insuline et de sa fonction, qui réduit ses effets anabolisants et anti-inflammatoires, conjuguée à

l'hyperglycémie, engendre une perte de protéine du muscle, augmente le risque d'infection et intensifie les réponses inflammatoires (Martyn *et al.* 2008).

Les cellules musculaires et adipeuses sont caractérisées par un mécanisme spécialisé dans la régulation de l'absorption du glucose : en réponse à l'activation du récepteur de l'insuline et la signalisation en aval, le GLUT4 (*Glucose Transporter 4*) se déplace à la membrane plasmique, un processus qui facilite la diffusion de glucose vers le milieu intracellulaire (Bjornholm & Zierath 2005; Wijesekara *et al.* 2006). En parallèle, l'AMPK (AMP-activated Protein Kinase), une enzyme hautement sensible à l'équilibre énergétique, peut induire la translocation de GLUT4 en réponse à une augmentation du rapport AMP/ATP. Une hausse de la concentration du calcium cytosolique peut aussi activer l'AMPK (Woods *et al.* 2005; Jorgensen *et al.* 2006; Witters *et al.* 2006). Les médicaments antidiabétiques de la famille des biguanides comme la metformine exercent également leur effets via la voie de l'AMPK (Zou *et al.* 2004; Davis *et al.* 2006; Foretz *et al.* 2006). Par contre, les thiazolidinediones agissent sur le récepteur nucléaire PPAR γ (Peroxisome Proliferators-activated Receptor) pour induire une régulation à la hausse des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides, incluant les effecteurs de la voie de l'insuline tels que le PI3K (Phosphoinositide-3 Kinase) et le GLUT4 (Halimi 2005; Li *et al.* 2005).

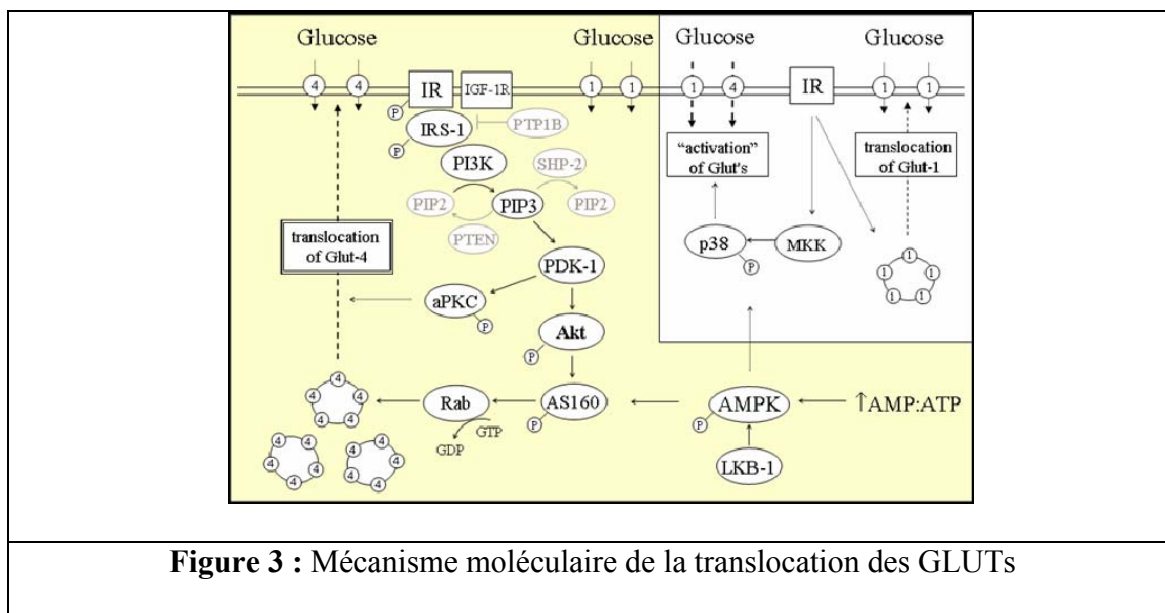


Figure 3 : Mécanisme moléculaire de la translocation des GLUTs

Plusieurs modèles animaux ont été mis au point pour étudier la pathogenèse du diabète de type II tels que les rats Zucker *fa/fa*, les souris C57BL/6 *ob/ob*, les souris C57BL/KsJ *db/db*, les souris *KKA^y* et les souris BDF1 (Srinivasan & Ramarao 2007; Karasawa *et al.* 2009). Les souris *KKA^y* proviennent d'un croisement entre la souris noire KK intolérante au glucose et la souris jaune obèse *A^y*. Le gène *A^y* encode le peptide agoutie, qui est un antagoniste du récepteur MC4R (*Mélanocortine 4 Receptor*) dans le système mélanocortine hypothalamique, et inhibe l'activité de la leptine sur ce système (Barsh *et al.* 2000). Ces souris perdent en grande partie le contrôle de satiété et sont donc hyperphagiques. Leur phénotype est caractérisé par l'obésité et le développement de l'hyperleptinémie, de la résistance à l'insuline, de l'hyperinsulinémie, du diabète, de la dyslipidémie et de l'hypertension (He *et al.* 2001). Par conséquent, les souris *KKA^y* représentent un excellent modèle qui reflète bien les principaux facteurs du diabète de type II causé par l'obésité chez les humains (Srinivasan & Ramarao 2007).

1.2.9. Hypothèse et Objectifs de recherche :

i. Hypothèse :

L'obésité est devenue un grave problème de santé dans les pays industrialisés ainsi que dans les pays en développement (Prentice 2006; Yach *et al.* 2006). Dans la population des États-Unis, plus de 60% des individus excèdent le seuil d'indice de masse corporelle (IMC) normal (Hedley *et al.* 2004). Il est maintenant évident que l'obésité est plus qu'un problème cosmétique. Plusieurs études épidémiologiques démontrent que l'accumulation excessive de tissu adipeux est associée à des sérieuses maladies qui augmentent la morbidité et la mortalité (Calle *et al.* 2003; Calle & Kaaks 2004; Poirier *et al.* 2006) et causent ainsi une augmentation substantielle des coûts en soins de santé (Flegal 2005; Yach *et al.* 2006). Par conséquent, le traitement de l'obésité sera une approche de premier choix pour remplacer le traitement de la morbidité (Hofbauer *et al.* 2007). Cependant, le traitement de l'obésité par les changements d'alimentation et de comportement ne présente que de modestes résultats et la pharmacothérapie n'atteint pas non plus un meilleur succès. Au début de 2009, seulement trois médicaments (Orlistat, Cetilistat, Sibutramine) ont été approuvés pour l'utilisation à long terme et quelques composés (CP-945,598, APD-356, GW856464, AC137) sont présentement en développement clinique (Hofbauer *et al.* 2007).

Le diabète de type II atteint lui aussi maintenant une proportion épidémique, et environ 333 millions de personnes en seront atteintes en 2025 selon la Fédération internationale de diabète. De plus, l'efficacité des médicaments antidiabétiques est modeste et ils doivent souvent être utilisés en combinaison (Krentz & Bailey 2005; Srinivasan *et al.* 2008). La recherche de nouveaux agents antidiabétiques est donc un défi important pour

les chercheurs scientifiques et les plantes médicinales deviennent une source novatrice, abondante et intéressante pour la découverte de nouvelles avenues thérapeutiques (Prabhakar & Doble 2008). Parmi les plantes médicinales d'intérêt, le bleuet est utilisé depuis longtemps comme antidiabétique en médecine traditionnelle (Haddad *et al.* 2003; Jellin *et al.* 2005) mais ses mécanismes d'action restent inconnus. Récemment, les extraits de différentes parties du bleuet (racine, tige, feuille, fruit) ont fait l'objet d'études leur conférant des propriétés antidiabétiques semblables à celles de l'insuline et des TZD (Thiazolidinediones), ainsi que des activités neuroprotectrices face à la glucotoxicité (Martineau *et al.* 2006). De plus, les anthocyanines du bleuet peuvent réduire l'obésité chez les animaux nourris avec une diète riche en calories (Prior *et al.* 2008).

Les études épidémiologiques révèlent une association modérée entre l'obésité, l'hyperinsulinémie, le diabète et les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Whitmer 2007; Beydoun *et al.* 2008). Les mécanismes de cette association restent à élucider. Cependant, les actions directes de l'insuline, les produits avancés de glycosilation, les maladies cérébrovasculaires et les produits du métabolisme du tissu adipeux pourraient être impliqués (Luchsinger 2008; Luchsinger & Gustafson 2009).

En particulier, la polyneuropathie sensorimotrice distale diabétique affecte au moins 50% des patients diabétiques et est une cause primaire de l'amputation des pieds (Martin *et al.* 2006; Albers *et al.* 2007). Les deux grands essais cliniques chez les patients diabétiques de type I et II : DCCT (Diabetes Control and Complication Trial) et UKPDS (UK Prospective Diabetes Study) indiquent que l'hyperglycémie est un facteur

étiologiques important de cette complication diabétique (Boulton 1998; Stratton *et al.* 2000; Cameron *et al.* 2001). Plusieurs mécanismes impliquent dans cette pathogenèse, tels que : augmentation de l'activité de l'aldose réductase; glycation/glycoxydation non enzymatique; activation de la PKC, des MAPKs, de la PARP, de la COX-2, du NF- κ B; stress oxydatif et nitrosatif. La plupart des mécanismes pathogéniques se convergent au niveau du stress oxydatif-nitrosatif, qui est susceptible d'être le mécanisme central (Figueroa-Romero *et al.* 2008; Obrosova 2008).

ii. But :

Comme la biotransformation modifie les propriétés du jus de bleuet et que le bleuet démontre des effets bénéfiques potentiels dans le traitement du diabète et des maladies neurodégénératives, le but de ce projet de recherche est d'évaluer et de comparer le pouvoir antidiabétique et l'activité neuroprotectrice du jus de bleuet normal (NJ) et biotransformé (BJ).

iii. Objectifs :

1. Effet neuroprotecteur du BJ chez les neurones N2a en utilisant le peroxyde d'hydrogène comme un inducteur du SO.
2. Potentiel antidiabétique des deux jus et leurs mécanismes d'action chez les lignées cellulaires sensibles à l'insuline comme les cellules musculaires et adipeuses.

3. Activité antidiabétique des deux jus dans un modèle animal de diabète de type II :
L'effet chronique du jus de bleuet chez les souris KKAY obèses et diabétiques et
l'effet préventif chez les jeunes souris KKAY prédiabétiques.

Chapitre 2

**Biostranformed blueberry juice protects neurons from
hydrogen peroxide-induced oxidative stress
and MAPKs pathway alterations.**

Role de chaque co-auteur dans cet article

Cet article a été soumis à la revue “*Journal of Neuroscience Research*”. Les travaux expérimentaux, l’analyse des données et la rédaction de l’article ont été effectués par Tri Vuong. Dr. Pierre S. Haddad est mon directeur de recherche. Dre. Chantal Matar est ma co-directrice de recherche. Dr. Charles Ramassamy est mon co-directeur de recherche.

Title

Biotransformed blueberry juice protects neurons from hydrogen peroxide induced-oxidative stress and MAPKs pathway alterations.

Authors

Tri Vuong^{1,2}, Pierre S. Haddad^{1,2}, Chantal Matar^{2,4}, Charles Ramassamy^{2,3}

Affiliation

¹ Natural Health Products and Metabolic diseases Laboratory, Department of Pharmacology and Montreal Diabetes Research Center, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

²Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels, Université Laval, Québec City, Québec, Canada.

³Institut Armand-Frappier, Institut National de Recherche Scientifique, Laval, Québec, Canada.

⁴Department of chemistry and biochemistry, Université de Moncton, Moncton, Canada.

Address for correspondence

Pierre S. Haddad, PhD.

Department of Pharmacology

Université de Montréal

P.O. Box 6128, Downtown Station

Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Email : Pierre.haddad@umontreal.ca

Phone : 514-343-6590

Fax : 514-343-2291

Charles Ramassamy, Ph.D.

INRS-InstitutArmand-Frappier

531 Boul. des Prairies

Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Email : Charles.Ramassamy@iaf.inrs.ca

Phone : 450-687-5010

Fax : 450-686-5501

Abstract

A growing body of evidence supports the therapeutic effects of blueberry in neurodegenerative disorders. Biotransformation of blueberry juice by *Serratia vaccinii* bacteria increases its phenolic content and antioxidant activity. In neuronal cell culture, biotransformed blueberry juice (BJ) significantly increased the activity of antioxidant enzymes, namely catalase and superoxide dismutase (SOD). Moreover, BJ protected neurons against hydrogen peroxide-induced cell death in a dose-dependent manner. This is associated with up-regulation of MAPK family enzymes p38 and JNK activation, as well as protection of MEK1/2 and ERK1/2-activity loss induced by hydrogen peroxide. The current studies demonstrate that BJ can protect neurons against oxidative stress possibly by increasing antioxidant enzyme activities and activating p38- and JNK-dependent survival pathways while blocking MEK1/2-ERK1/2-mediated cell death. Thus, biotransformed blueberry juice may represent a novel approach to prevent and to treat neurodegenerative disorders and a source of novel therapeutic agents against these diseases.

Résumé

Un nombre croissant de preuves scientifiques démontre le potentiel thérapeutique du bleuet dans les maladies neurodégénératives. La biotransformation du jus de bleuet par les bactéries *Serratia vaccinii* augmente sa teneur en composés phénoliques et son activité anti-oxydante. Dans les neurones en culture cellulaire, le jus de bleuet biotransformé BJ augmente l'activité des enzymes anti-oxydantes, la catalase et la superoxyde dismutase (SOD). De plus, il protège des neurones, de manière dose-dépendante, contre la mort cellulaire induite par le peroxyde d'hydrogène. Cette protection est associée à la régulation à la hausse de l'activité de la MAPK p38 et de la JNK, et à l'inhibition de la perte d'activité de la voie MEK1/2-ERK1/2. L'étude présente démontre que le jus de bleuet biotransformé peut protéger les neurones contre le stress oxydatif, probablement par augmentation de l'activité des enzymes anti-oxydantes, par activation la voie de survie dépendante de la MAPK p38 et de la JNK, et par inhibition de la mort cellulaire induite par la voie MEK1/2-ERK1/2. Le jus de bleuet biotransformé pourrait représenter une nouvelle approche pour prévenir et traiter les maladies neurodégénératives et une source de nouveaux agents thérapeutiques contre ces maladies.

Introduction

Oxidative neuronal cell damage has been implicated in the pathogenesis of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and amyotrophic lateral sclerosis [1-4]. It is mediated by reactive oxygen species (ROS), including hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion, and hydroxyl radicals, which are generated as byproducts of normal and irregular metabolic processes. ROS attack cellular biomolecules, disrupt cellular function and membrane integrity, thereby leading to apoptosis [2, 5, 6]. As a major component of ROS, H_2O_2 induces apoptosis in many different cell types and therefore has been extensively used as an inducer of oxidative stress in *in vitro* models [7-9].

Exposure to ROS from a variety of source has lead organisms to develop a series of defense mechanisms. Such mechanisms involve: prevention, repair, physical defense, and antioxidant defense. Non-enzymatic antioxidants are represented by glutathione (GSH), ascorbic acid (vitamin C), α -tocopherol (vitamin E), and carotenoids. Enzymatic antioxidant defense includes superoxide dimutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) [10]. However, the effects of SOD may become deleterious when this enzyme is overexpressed because of the resulting H_2O_2 production [11].

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) family plays a critical role in the cellular response to a wide rang of stimuli. Indeed, the dynamic balance between branches of the MAPK family, namely ERK1/2, c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 MAPK, is implicated in regulating cell death/survival [10, 12]. Several mechanisms participate in the specificity of different, even opposing signals of MAPK family, including (i)

duration and strength of signal, (ii) interaction with various scaffold proteins, (iii) subcellular localization, (iv) presence of several isoforms, (v) extensive cross-talk and interplay between MAPK cascade and other pathways, and (vi) post-translational modifications other than phosphorylation [13]. Furthermore, the spatial distribution and temporal qualities of MAPKs can markedly alter the qualitative and quantitative features of downstream signaling to immediate early genes (IEG) and the expression of IEG-encoded protein products. As a result, IEG products provide a molecular interpretation of MAPKs dynamics, enabling the cell to program an appropriate biological response [12].

Natural antioxidants have been reported to play a major role in blocking oxidative stress induced by free radicals. Supplementation with fruits and vegetables rich in polyphenols is beneficial in both forestalling and reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior [14-17]. The observed protection may be due to the antioxidant and anti-inflammatory properties of the polyphenolic compounds found in these fruits and vegetables [9, 18-20].

Blueberries are among the highest in antioxidant capacity among all fruits and vegetables [21]. Blueberries and its phenolic compounds, such as anthocyanins and flavonoids, have been identified as potential contributors to amelioration of neuronal cell dysfunction [22-25]. Biotransformation of blueberry juice with a novel strain of bacteria isolated from the blueberry flora and named *Serratia vaccinii*, increases its phenolic content and antioxidant activity [26]. It also modifies the biological activity of biotransformed blueberry juice (BJ), such as increasing its antidiabetic potential and

inhibiting nitric oxide production in macrophages [27, 28]. The aim of this study was to assess the neuroprotective property of BJ against H₂O₂-induced oxidative stress in cultured neuronal cells.

Materials and Methods

Preparation of fermented Blueberry juice

Mature lowbush blueberries (*Vaccinium angustifolium* Ait.) were purchased from Cherryfield Foods Inc. (Cherryfield, Maine, USA) as fresh and untreated fruits. Blueberry juice was extracted by blending the fruit (100g) in a Braun Type 4259 food processor with an equivalent quantity (100g) of Minimal Broth Davis without dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). The fruit mixture was then centrifuged at 500 x g for 6 min to remove fruit skin and insoluble particles. The resulting juice was sterilized using 0.22 µm Express Millipore filters (Millipore, Etobicoke, Ontario, Canada).

Serratia vaccinii bacteria were cultured as previously described [26]. The juice was inoculated with a saturated culture of *Serratia* corresponding to 2% of the total juice volume. After a four day fermentation period, the transformed juice was sterilized by 0.22 µm filtration. The total phenolic content was then measured by the Folin-Ciocalteu method using gallic acid as standard and hence expressed as µM Gallic Acid Equivalent (GAE). The total phenolic content was increased from 4581 µM GAE to 19338 µM GAE, confirming successful transformation. Blueberry and biotransformed blueberry juice have been partially characterized, as described elsewhere [26, 29].

Cell culture

Murine N2a neuroblastoma cell line was obtained from American Type Cell Collection (ATCC; Chicago, IL). Cells were cultured in MEM media containing FBS (10%, v/v) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), penicillin/streptomycin (0.05 mg/mL) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ air in 24-well plates for viability and toxicity experiments, 12-well plates for SOD activity experiments, and 6 well plates for enzyme activities and signalling experiments.

Viability and toxicity assay

Cell viability was assessed by WST-1 assay (Roche, Laval, QC, Canada). Briefly, after pretreatments with blueberry juices, H₂O₂ was added to a final concentration 0.75 mM for 24h. WST-1 was added (10%, v/v) and incubated at 37°C for 2h. The absorbance was measured at 450nm in a plate reader (Wallac Victor 2, Perkin-Elmer, St-Laurent, QC).

In preliminary experiments, H₂O₂ induced a 30-35% cells loss at 0.75 mM. This concentration was used for all experiments thereafter. The protective effect of BJ was maximized if cells were pre-treated with BJ for 1h before adding H₂O₂.

Cell toxicity was measured by LDH assay (Roche, Laval, QC, Canada). After treatments, 100µl of culture medium was transferred to a 96-well plate. Cells were lysed with 0.1M NaOH for 10 min on ice and 100µl of lysate was transferred to a 96-well plate. 100µl of assay mixture was added to each well and incubated at room temperature for 10 minutes. The absorbance was measured at 450nm.

GSH/GSSG ratio

GSH/GSSG ratio was measured by BIOXYTECH GSH/GSSG-412TM kit (OxisResearchTM, Foster City, CA, USA). After treatments, cells were placed on ice and washed twice with ice-cold Krebs-phosphate buffer. 20 μ l of scavenger was added to GSSG sample while 20 μ l of buffer was added to GSH sample. Cells were then lysed in 200 μ l of lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)/0.5% Triton X-100). Lysed cells were scraped and transferred to microcentrifuge tubes. Samples were allowed to lyse for an additional 15 min on ice with periodic vortexing. The lysates were centrifuged at 300 x g at 4⁰C for 10 minutes, and samples used for determination of GSH/GSSG ratio according to the manufacturer's instructions.

Enzymatic activity assay

SOD enzyme activity was measured using the SOD Assay Kit-WST (Dojindo Molecular Technologies Inc., Gaithersburg, MD). After treatments, cells were placed on ice and washed twice with ice-cold Krebs-phosphate buffer. Cells were lysed in 200 μ l of lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)/0.5% Triton X-100). Lysed cells were then scraped and transferred to microcentrifuge tubes. Samples were allowed to lyse for an additional 15 min on ice with periodic vortexing. The lysates were centrifuged at 300 x g at 4⁰C for 10 minutes, and 20 μ l of this sample solution was used for determination of SOD enzyme activity according to the manufacturer's instructions. Catalase (CAT) activity was determined by adding 900 μ l of 30 mM H₂O₂ to 100 μ l of cell lysate. The disappearance of H₂O₂ was monitored at 240 nm for 1 min.

Western Blot analysis

After treatments, cells were placed on ice and washed three times with ice-cold Krebs-phosphate buffer. Cells were lysed in RIPA lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing protease inhibitors (2 mM PMSF and Complete Mini protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Laval, QC, Canada)) and phosphatase inhibitors (0.5 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 1 mM Na pyrophosphate). Lysed cells were then scraped and transferred to microcentrifuge tubes. Samples were allowed to lyse for an additional 15 min on ice with periodic vortexing. Lysates were then centrifuged at 4500 x g and supernatants were collected and stored at -80°C until further analysis.

Protein concentration of lysates was assessed using the bicinchoninic acid colorimetric method (Pierce, Rockford, IL, USA), using the procedure supplied by the manufacturer. 120 µg of total protein from each sample were loaded onto an 8% acrylamide gel and separated at 4°C for 3 h at 75 mA, followed by 15 h at 20 mA, using a Protean II electrophoresis apparatus (Biorad, Mississauga, ON, Canada). Separated samples were then electro-transferred to PVDF membrane (Millipore) at 4°C for 90 min at 1A using a Transblot apparatus (BioRad). Membranes were stained with Ponceau red solution (5%, in acetic acid, Sigma), photographed and then washed in TBST (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Tween-20), followed by blocking in TBST + 5% non-fat dried milk for 1 h at ambient temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with the following antibodies : rabbit anti-phospho-MEK1/2 (Ser217/221), rabbit anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), mouse anti-phospho-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204), rabbit anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), (cat #9121, #9211, #4377, #9251 respectively, Cell Signaling Tech. Inc., Danvers, MA, USA) at 1:1000 dilution in TBST

+ 5% BSA. Membranes were then incubated 60 min at ambient temperature with HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) at 1:100 000 dilution in TBST + 5% milk. After washing with TBST, the blots were revealed using the enhanced chemiluminescence method (ECL, Amersham, Piscataway, NJ, USA) on blue-light-sensitive film (Amersham). Densitometric analysis was performed using a Hewlett-Packard flatbed scanner and NIH software ImageJ 1.37v.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data by two way ANOVA and Fisher post-hoc tests were performed using StatView software (Cary, NC, USA). Statistical significance was set at $p \leq 0.05$. Data are reported as mean \pm SEM.

Results

BJ protects neurons against hydrogen peroxide-induced cell death

To investigate the potential protective effects of blueberry juices *in vitro*, N2a neuroblastoma cells were treated with H₂O₂ in their presence or absence. H₂O₂ alone induced significant loss of cell viability in a dose-dependant manner (data not show), whereas biotransformed (BJ) or normal (NJ) blueberry juices alone were non-toxic. Co-treatment with BJ significantly protected neurons against H₂O₂ induced-oxidative stress in a dose dependant manner, and completely abolished H₂O₂ toxicity from a concentration of 30 μ M GAE onwards, whereas NJ was without effect (Figure 1).

Because the WST-1 assay is based on mitochondrial activity and that the latter can be affected by plant polyphenolic compounds [30], we confirmed our results with the LDH assay. Again, H₂O₂ induced dose- dependent neuronal cell death that was countered by BJ but not NJ (Figure 2).

BJ preserves GSH/GSSG balance

Neither NJ nor BJ alone affected the GSH/GSSG ratio whereas H₂O₂ significantly decreased GSH/GSSG ratio by 19% after 30 min and by 21% after 4h. However, H₂O₂ significantly lost its tendency to reduce the GSH/GSSG ratio in BJ-pretreated neurones while no significant difference was denoted in NJ-pretreated cells (Figure 3).

BJ increases catalase and SOD activity

When administered alone, BJ increased catalase activity in N2a cells. It reached the highest level after a 4h treatment (0.13 ± 0.02 vs. 0.09 ± 0.01 mM/min/mg protein, 4 h vs 0h, $p < 0.05$) and then gradually decreased toward control values. In contrast, control and NJ treated cells displayed a rather stable catalase activity over the 24 h experimental period. When H₂O₂ alone was added, catalase activity increased rapidly and reached the highest level after 24h (0.13 ± 0.02 vs. 0.08 ± 0.01 mM/min/mg protein, HP vs control at 24h, $p < 0.05$). NJ treatment did not significantly affect H₂O₂ actions (data not show).

BJ, but not NJ, rapidly and significantly increased SOD activity when administered alone (Figure 5). However, SOD activity returned to the basal level after 24h. H₂O₂ by itself gradually increased SOD activity. It reached the highest level after 4h and then remained constant at this high level. When H₂O₂ was added to BJ-treated cells, SOD activity was slightly increased then returned to the basal level after 24h (Figure 5). As for catalase, NJ pretreatment did not show any effect (data not show).

BJ protection is associated with activation of JNK and MAPK p38

Exposure of N2a cells to BJ alone triggered the activation of both MAPKp38 (Figure 6) and JNK (Figure 7) while NJ did not show any effect as compared with the vehicle control. BJ induced maximal phosphorylation of MAPKp38 by 90% after 30 min (Figure 6) and JNK by 66% after 2h (Figure 7). While H₂O₂ did not modify JNK phosphorylation (Figure 7), it increased MAPKp38 activity by 111% after 30 min, which then gradually decreased to a very low level after 4h (19% of time 0 control, Figure 6). In BJ-treated cells challenged with H₂O₂, MAPKp38 and JNK activities followed the same pattern seen with BJ alone, albeit at a slightly lower level, hence indicating a significant dampening of H₂O₂ effects (Figure 6 and 7). For both enzymes, NJ treatment gave results indistinguishable from vehicle control or H₂O₂ groups, respectively (data not show).

BJ inhibition of H₂O₂ toxicity is associated with protection of MEK1/2 and ERK1/2 activity

Baseline MEK1/2 phosphorylation exhibited a gradual and steady decline within the 4 h experimental period and this was not affected by either NJ or BJ treatments (Figure 8). In contrast, ERK1/2 activated state remained stable in control, NJ and BJ-treated groups (Figure 9). When H₂O₂ was added to N2a cells, MEK1/2 and ERK1/2 phosphorylation was rapidly and significantly decreased by half within 30 min (Figure 8 and 9). ERK1/2 then gradually increased to initial level by 2h while MEK1/2 remained stable at its new low level. In BJ-treated cells, there are no significant changes in MEK1/2 and ERK1/2 activity induced by H₂O₂ (Figure 8 and 9).

Discussion

Blueberry and blueberry products have been demonstrated to possess the potential to reduce age-related neurodegeneration and to enhance motor and cognitive functions [14, 17]. Our group has discovered a bacterium from the blueberry flora that can biotransform blueberry juice [26]. This greatly accentuates its antioxidant potential [26, 31] and endows it with novel anti-inflammatory [27] and antidiabetic [28] biological activities. In the present study, we sought to explore the effect of such biotransformation on the neuroprotective potential of blueberry juice. We chose H_2O_2 as a source of oxidative stress because it is formed endogenously as a natural byproduct of enzymatic oxidase action or as a product of the dismutation of superoxide anion catalyzed by SOD [3]. It contributes to the background level of cellular oxidative stress [32]. It is generally accepted that the antioxidant enzymes catalase and glutathione peroxidase can protect cells from the effects of basal H_2O_2 production [33]. The administration of exogenous H_2O_2 can elevate oxidative stress beyond the protective capacities of endogenous antioxidant defense systems, resulting in apoptosis or necrosis of cultured neurons [34].

We also chose murine neuroblastoma cells of the N2a line because they have been widely employed to investigate the mechanisms involved in neurotoxicity, neuroprotection and neuronal repair [8, 35, 36]. In this study, H_2O_2 (0.75 mM) caused a significant decrease in cell viability (35%) but pretreatment of N2a cells with BJ blocked this oxidative stress-induced cytotoxicity in a dose-dependant manner. Similar protection was not found with NJ.

One of the first line defense mechanisms against H_2O_2 -induced toxicity is the antioxidant enzyme catalase. We found that BJ treatment alone significantly increased catalase activity by 44%, and this was consistent with the parallel protection of neuronal cells against oxidative stress attack by H_2O_2 . The mechanism through which BJ increased catalase activity is unknown. However, since the increase of catalase activity in BJ-treated neurons required at least 4h to be fully expressed, BJ might act via both transcriptional and translational mechanisms.

Another important enzymatic anti-oxidant defense mechanism involves SOD. Indeed, up-regulation of SOD activity has been associated with neuroprotective capabilities in certain studies [37]. However, since SOD-catalyzed reactions also elevate endogenous H_2O_2 , an overexpression of SOD can also cause deleterious effects [11]. In fact, excessive H_2O_2 production caused by SOD-overexpression has been implicated in the brain injury observed after perinatal hypoxia-ischemia [38]. In our study, H_2O_2 clearly increased SOD activity, which was maintained at a high level over 24h. This may appear paradoxical but could simply be indicative of the state of oxidative stress induced in neuronal cells by our experimental conditions. When cells were pretreated with BJ however, the rise H_2O_2 -induced in SOD activity was blunted and activity returned to normal levels within 24h. These results further support the notion that BJ protected neurons from H_2O_2 -induced oxidative stress.

Aside from enzymatic anti-oxidant system, non-enzymatic protective mechanisms exist, one of the most important being the GSH/GSSG system [10]. In our experimental conditions, GSH/GSSG ratio was reduced by H_2O_2 treatment, as expected if oxidative

stress overcomes the capacity of this anti-oxidant system. In cells pretrated with BJ this reduction of GSH/GSSG ratio was lost. Surprisingly, BJ alone did not modulate the GSH/GSSG ratio and similarly had no impact on GSH production (data not shown). One can speculate that GSH reductase (GR) and GSH peroxidase (GPx) activities may have been modulated by BJ and further studies will be necessary to address this point. Nonetheless, it is well known that phenolic compounds, such as quercetin, epicatechin, mangiferin, patuletin, nepetin, and axillarin can increase both GR and GPx activity [39-41].

Although H₂O₂ has been widely used to study the underlying molecular mechanisms of neurotoxicity and neuroprotection in N2a cells, detailed information on the cell death pathways involved is still lacking, notably at the level of the three branches of the MAPK family, namely ERK1/2, JNK, and p38 MAPK. The current study investigated the kinetics of these members of the MAPK family after H₂O₂ challenge. To our knowledge, this has not been reported previously in the N2a cell system.

We found that H₂O₂ first induced a transient inactivation of both JNK and ERK1/2 while increasing MAPKp38 activity within 30 min. Then ERK1/2 activity gradually returned to basal levels by 4h whereas JNK and MAPKp38 activities were both decreased to exhibit prolonged inactivation after 4h. Both transient activation of MAPKp38 and prolonged activation of ERK1/2 have been correlated to H₂O₂-induced neurotoxicity in PC12 cells [42, 43].

The mechanisms by which H₂O₂ decreased both JNK and ERK1/2 phosphorylation are unknown. However, since MEK1/2 phosphorylation was also observed to decrease, this inactivation may be regulated by phosphatases with or without cross-talk between MAPKs pathways. Recently, dual specificity phosphatases, generally termed MAPK phosphatases (MKPs), were found to control the spatiotemporal regulation of ERK1/2 and cross-talk between MAPKs pathways [44]. Further studies will be necessary to clarify the involvement of MKPs in the effects observed herein.

Normal blueberry juice was without effect on either basal or H₂O₂ induced MAPK member phosphorylations and results were generally similar to respective controls. In contrast, pretreatment with biotransformed blueberry juice rapidly increased basal p38 and JNK phosphorylations, which remained elevated for up to 4h. Conversely, BJ did not have any influence on the basal behavior of MEK1/2 or ERK phosphorylations observed in vehicle controls over the 4h experimental period. In general, BJ significantly reduced the initial changes in MAPK family member phosphorylation state described above after treatment with H₂O₂. Therefore, modifications in MAPK family enzymes appear to contribute to the protection of neurons against H₂O₂-induced cell death afforded by BJ. Indeed, although the role of JNK and MAPKp38 in apoptosis has been established in some cell lines, they have also been shown to contribute to survival, development and differentiation [13]. Further studies are needed to address the involvement of MAPKp38 and JNK stimulation and ERK1/2 inactivation in the neuroprotective effect of BJ. For instance, in the case of H₂O₂ induced-inactivation of MEK1/2 and ERK1/2, BJ could have prevented these effects of the oxidant stress by blocking MPKs activity; future studies should address this possibility.

One of the first hypotheses that comes to mind to explain the neuroprotective action of BJ relates to direct antioxidant mechanisms. Indeed, the total phenolic content in BJ was increased more than 4 times as compared to NJ, such compounds being well known for their antioxidant potential [26]. For example, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a phenolic compound from green tea, was recently found to accumulate in the mitochondria where it acts locally as a free radical scavenger to protect neurons [45]. In view of the heightened content in BJ, such accumulation of phenolic compounds in the mitochondria may have been enhanced, with an expected increase in the free radical scavenging capacity to protect neurons against oxidative stress.

Another hypothesis to explain the observed BJ neuroprotective activity is the pro-oxidant hypothesis. Indeed, some phenolic compounds present in BJ may act as weak oxidants, thereby activating anti-oxidant defense mechanisms as observed herein for catalase. If neuronal cells defense systems were so prepared by BJ before H₂O₂ was added, H₂O₂-induced deleterious effects may thus have been inhibited.

In summary, the results of the present study indicate that BJ possesses a strong neuroprotective potential against H₂O₂-induced oxidative stress in the N2a neuron cell line *in vitro*. BJ increased antioxidant enzyme activity as well as MAPK p38 and JNK activation while blocking H₂O₂-induced ERK1/2-activity modifications. We speculate that it is a combination of these various actions of BJ that contributed to protect neurons against cell death induced by oxidative stress. Although the active principles and their precise mechanisms of action remain to be identified, biotransformed blueberry juice may represent a promising approach to prevent and treat neurodegenerative disorders and a source of novel therapeutic agents against these diseases.

References

- [1] Le Forestier, N.; Lacomblez L.; Meininger V. [Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis.]. *Rev Neurol (Paris)*. 2008.
- [2] Mancuso, M.; Orsucci D.; Siciliano G.; Murri L. Mitochondria, mitochondrial DNA and Alzheimer's disease. What comes first? *Curr Alzheimer Res*. 5:457-468; 2008.
- [3] Pratico, D. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol Sci*. 2008.
- [4] Yacoubian, T. A.; Standaert D. G. Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2008.
- [5] Busija, D. W.; Gaspar T.; Domoki F.; Katakam P. V.; Bari F. Mitochondrial-mediated suppression of ROS production upon exposure of neurons to lethal stress: mitochondrial targeted preconditioning. *Adv Drug Deliv Rev*. 60:1471-1477; 2008.
- [6] Cadet, J.; Douki T.; Ravanat J. L. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. *Acc Chem Res*. 41:1075-1083; 2008.
- [7] Heo, H. J.; Choi S. J.; Choi S. G.; Shin D. H.; Lee J. M.; Lee C. Y. Effects of banana, orange, and apple on oxidative stress-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J Food Sci*. 73:H28-32; 2008.
- [8] Pizarro, J. G.; Yeste-Velasco M.; Rimbau V.; Casadesus G.; Smith M. A.; Pallas M.; Folch J.; Camins A. Neuroprotective effects of SB-415286 on hydrogen peroxide-induced cell death in B65 rat neuroblastoma cells and neurons. *Int J Dev Neurosci*. 26:269-276; 2008.
- [9] Yang, L. X.; Zhang L. J.; Huang K. X.; Kun Li X.; Hu L. H.; Wang X. Y.; Stockigt J.; Zhao Y. Antioxidant and neuroprotective effects of synthesized sintonin derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 1; 2008.
- [10] Valko, M.; Leibfritz D.; Moncol J.; Cronin M. T.; Mazur M.; Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39:44-84; 2007.
- [11] Lindenau, J.; Noack H.; Possel H.; Asayama K.; Wolf G. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia*. 29:25-34; 2000.
- [12] Murphy, L. O.; Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci*. 31:268-275; 2006.
- [13] Krishna, M.; Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci*. 2008.

- [14] Joseph, J. A.; Shukitt-Hale B.; Lau F. C. Fruit polyphenols and their effects on neuronal signaling and behavior in senescence. *Ann N Y Acad Sci.* **1100**:470-485; 2007.
- [15] Galli, R. L.; Shukitt-Hale B.; Youdim K. A.; Joseph J. A. Fruit polyphenolics and brain aging: nutritional interventions targeting age-related neuronal and behavioral deficits. *Ann N Y Acad Sci.* **959**:128-132; 2002.
- [16] Joseph, J. A.; Shukitt-Hale B.; Casadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am J Clin Nutr.* **81**:313S-316S; 2005.
- [17] Shukitt-Hale, B.; Carey A. N.; Jenkins D.; Rabin B. M.; Joseph J. A. Beneficial effects of fruit extracts on neuronal function and behavior in a rodent model of accelerated aging. *Neurobiol Aging.* **28**:1187-1194; 2007.
- [18] Ramassamy, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol.* **545**:51-64; 2006.
- [19] Singh, M.; Arseneault M.; Sanderson T.; Murthy V.; Ramassamy C. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J Agric Food Chem.* **56**:4855-4873; 2008.
- [20] Wang, J. Y.; Wen L. L.; Huang Y. N.; Chen Y. T.; Ku M. C. Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Curr Pharm Des.* **12**:3521-3533; 2006.
- [21] Wolfe, K. L.; Kang X.; He X.; Dong M.; Zhang Q.; Liu R. H. Cellular antioxidant activity of common fruits. *J Agric Food Chem.* **56**:8418-8426; 2008.
- [22] Duffy, K. B.; Spangler E. L.; Devan B. D.; Guo Z.; Bowker J. L.; Janas A. M.; Hagepanos A.; Minor R. K.; DeCabo R.; Mouton P. R.; Shukitt-Hale B.; Joseph J. A.; Ingram D. K. A blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats. *Neurobiol Aging.* **29**:1680-1689; 2008.
- [23] Shukitt-Hale, B.; Lau F. C.; Carey A. N.; Galli R. L.; Spangler E. L.; Ingram D. K.; Joseph J. A. Blueberry polyphenols attenuate kainic acid-induced decrements in cognition and alter inflammatory gene expression in rat hippocampus. *Nutr Neurosci.* **11**:172-182; 2008.
- [24] McGuire, S. O.; Sortwell C. E.; Shukitt-Hale B.; Joseph J. A.; Hejna M. J.; Collier T. J. Dietary supplementation with blueberry extract improves survival of transplanted dopamine neurons. *Nutr Neurosci.* **9**:251-258; 2006.

- [25] Lau, F. C.; Bielinski D. F.; Joseph J. A. Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia. *J Neurosci Res.* **85**:1010-1017; 2007.
- [26] Martin, L.; Matar C. Increase of antioxidant capacity of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) during fermentation by a novel bacterium from the fruit microflora. *J Sci Food Agri.* **85**:1477-1484; 2005.
- [27] Vuong, T.; Martin L.; Matar C. Antioxidant activity of fermented berry juices and their effects on nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in macrophage 264.7 gamma NO(-) cell line. *Journal of Food Biochemistry.* **30**:249-268; 2006.
- [28] Vuong, T.; Martineau L. C.; Ramassamy C.; Matar C.; Haddad P. S. Fermented Canadian lowbush blueberry juice stimulates glucose uptake and AMP-activated protein kinase in insulin-sensitive cultured muscle cells and adipocytes. *Can J Physiol Pharmacol.* **85**:956-965; 2007.
- [29] Matchett, M. D.; MacKinnon S. L.; Sweeney M. I.; Gottschall-Pass K. T.; Hurta R. A. Inhibition of matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells by flavonoids from lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*): possible roles for protein kinase C and mitogen-activated protein-kinase-mediated events. *J Nutr Biochem.* **17**:117-125; 2006.
- [30] Sun, A. Y.; Wang Q.; Simonyi A.; Sun G. Y. Botanical phenolics and brain health. *Neuromolecular Med.* **10**:259-274; 2008.
- [31] Seeram, N. P.; Aviram M.; Zhang Y.; Henning S. M.; Feng L.; Dreher M.; Heber D. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J Agric Food Chem.* **56**:1415-1422; 2008.
- [32] Fatokun, A. A.; Stone T. W.; Smith R. A. Oxidative stress in neurodegeneration and available means of protection. *Front Biosci.* **13**:3288-3311; 2008.
- [33] Fourquet, S.; Huang M. E.; D'Autreaux B.; Toledano M. B. The dual functions of thiol-based peroxidases in H₂O₂ scavenging and signaling. *Antioxid Redox Signal.* **10**:1565-1576; 2008.
- [34] Whittemore, E. R.; Loo D. T.; Watt J. A.; Cotman C. W. A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neuroscience.* **67**:921-932; 1995.
- [35] Filiz, G.; Caragounis A.; Bica L.; Du T.; Masters C. L.; Crouch P. J.; White A. R. Clioquinol inhibits peroxide-mediated toxicity through up-regulation of phosphoinositol-3-kinase and inhibition of p53 activity. *Int J Biochem Cell Biol.* **40**:1030-1042; 2008.

- [36] Kemmerling, U.; Munoz P.; Muller M.; Sanchez G.; Aylwin M. L.; Klann E.; Carrasco M. A.; Hidalgo C. Calcium release by ryanodine receptors mediates hydrogen peroxide-induced activation of ERK and CREB phosphorylation in N2a cells and hippocampal neurons. *Cell Calcium*. **41**:491-502; 2007.
- [37] Kolla, N.; Wei Z.; Richardson J. S.; Li X. M. Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from cell death induced by hydrogen peroxide. *J Psychiatry Neurosci*. **30**:196-201; 2005.
- [38] Ditelberg, J. S.; Sheldon R. A.; Epstein C. J.; Ferriero D. M. Brain injury after perinatal hypoxia-ischemia is exacerbated in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice. *Pediatr Res*. **39**:204-208; 1996.
- [39] Mahakunakorn, P.; Tohda M.; Murakami Y.; Watanabe H.; Matsumoto K. Effects of Choto-san and its related constituents on endogenous antioxidant systems. *Biol Pharm Bull*. **28**:53-57; 2005.
- [40] Amazzal, L.; Lapotre A.; Quignon F.; Bagrel D. Mangiferin protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity mediated by oxidative stress in N2A cells. *Neurosci Lett*. **418**:159-164; 2007.
- [41] Kim, S. R.; Park M. J.; Lee M. K.; Sung S. H.; Park E. J.; Kim J.; Kim S. Y.; Oh T. H.; Markelonis G. J.; Kim Y. C. Flavonoids of *Inula britannica* protect cultured cortical cells from necrotic cell death induced by glutamate. *Free Radic Biol Med*. **32**:596-604; 2002.
- [42] Wu, X. J.; Zheng Y. J.; Cui Y. Y.; Zhu L.; Lu Y.; Chen H. Z. Propofol attenuates oxidative stress-induced PC12 cell injury via p38 MAP kinase dependent pathway. *Acta Pharmacol Sin*. **28**:1123-1128; 2007.
- [43] Colognato, R.; Laurenza I.; Fontana I.; Coppede F.; Siciliano G.; Coecke S.; Aruoma O. I.; Benzi L.; Migliore L. Modulation of hydrogen peroxide-induced DNA damage, MAPKs activation and cell death in PC12 by ergothioneine. *Clin Nutr*. **25**:135-145; 2006.
- [44] Caunt, C. J.; Armstrong S. P.; Rivers C. A.; Norman M. R.; McArdle C. A. Spatiotemporal regulation of ERK2 by dual specificity phosphatases. *J Biol Chem*. **283**:26612-26623; 2008.
- [45] Schroeder, E. K.; Kelsey N. A.; Doyle J.; Breed E.; Bouchard R. J.; Loucks A.; Harbison A.; Linseman D. A. Green tea epigallocatechin 3-gallate accumulates in mitochondria and displays a selective anti-apoptotic effect against inducers of mitochondrial oxidative stress in neurons. *Antioxid Redox Signal*. 2008.

Figure legends

Figure 1: Effect of 0.75 mM hydrogen peroxide (HP) on N2a cells viability after pretreatment with either 0, 10, or 30 μ M GAE of NJ or BJ by WST-1. All values are means of 4 separated experiments \pm SEM. * indicates a significant difference ($p \leq 0.05$) vs. control.

Figure 2: Effect of 0.75 mM hydrogen peroxide (HP) on N2a cells viability after pretreatment with 30 μ M GAE of NJ or BJ by LDH. All values are means of 4 separated experiments \pm SEM. Between-group differences, as determined by two way ANOVA, are illustrated by different letters (a-e) with significance defined as $p < 0.05$.

Figure 3: GSH/GSSG ratio in N2a cells after treatment with 0.75 mM hydrogen peroxide (HP) for 0.5 and 4h. All values are means 3 separated experiments \pm SEM. Between-group differences, as determined by two way ANOVA, are illustrated by different letters (a-d) with significance defined as $p < 0.05$.

Figure 4: Catalase activity in N2a cells after treatment with 0.75 mM hydrogen peroxide (HP) for 0, 4, 24h. All values are means of 3 separated experiments \pm SEM. Between-group differences, as determined by two way ANOVA, are illustrated by different letters (a-b) with significance defined as $p < 0.05$.

Figure 5: SOD activity in N2a cells after treatment with hydrogen peroxide for 0, 4, 24h. All values are means of 3 separated experiments \pm SEM. Between-group differences, as

determined by two way ANOVA, are illustrated by different letters (a-e) with significance defined as $p < 0.05$.

Figure 6: Phosphorylation of MAPK p38 in N2a cells after treatment with 0.75 mM hydrogen peroxide (HP) for 0.5, 2, 4h. All values are means of 4 separated Western Blot experiments \pm SEM. Between-group differences, as determined by two way ANOVA, are illustrated by different letters (a-d) with significance defined as $p < 0.05$.

Figure 7: Phosphorylation of JNK in N2a cells after treatment with 0.75 mM hydrogen peroxide (HP) for 0.5, 2, 4h. All values are means \pm SEM of 4 separated Western Blot experiments. Between-group differences, as determined by two way ANOVA, are illustrated by different letters (a-c) with significance defined as $p < 0.05$.

Figure 8: Phosphorylation of MEK1/2 in N2a cells after treatment with 0.75 mM hydrogen peroxide (HP) for 0.5, 2, 4h. All values are means of 3 separated Western Blot experiments \pm SEM. Between-group differences, as determined by two way ANOVA, are illustrated by different letters (a-b) with significance defined as $p < 0.05$.

Figure 9: Phosphorylation of ERK1/2 in N2a cells after treatment with 0.75 mM hydrogen peroxide (HP) for 0.5, 2, 4h. All values are means of 3 separated Western Blot experiments \pm SEM. Between-group differences, as determined by two way ANOVA, are illustrated by different letters (a-c) with significance defined as $p < 0.05$.

Figure 1

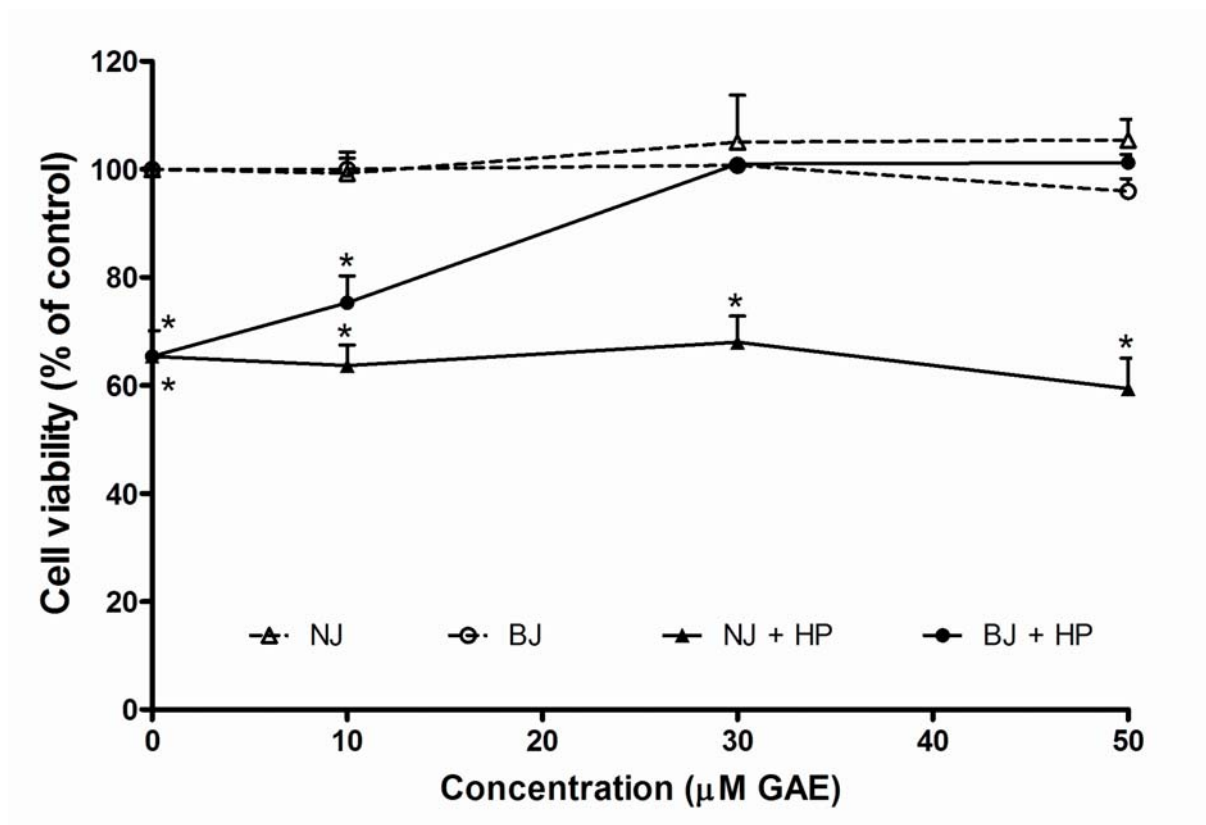


Figure 2

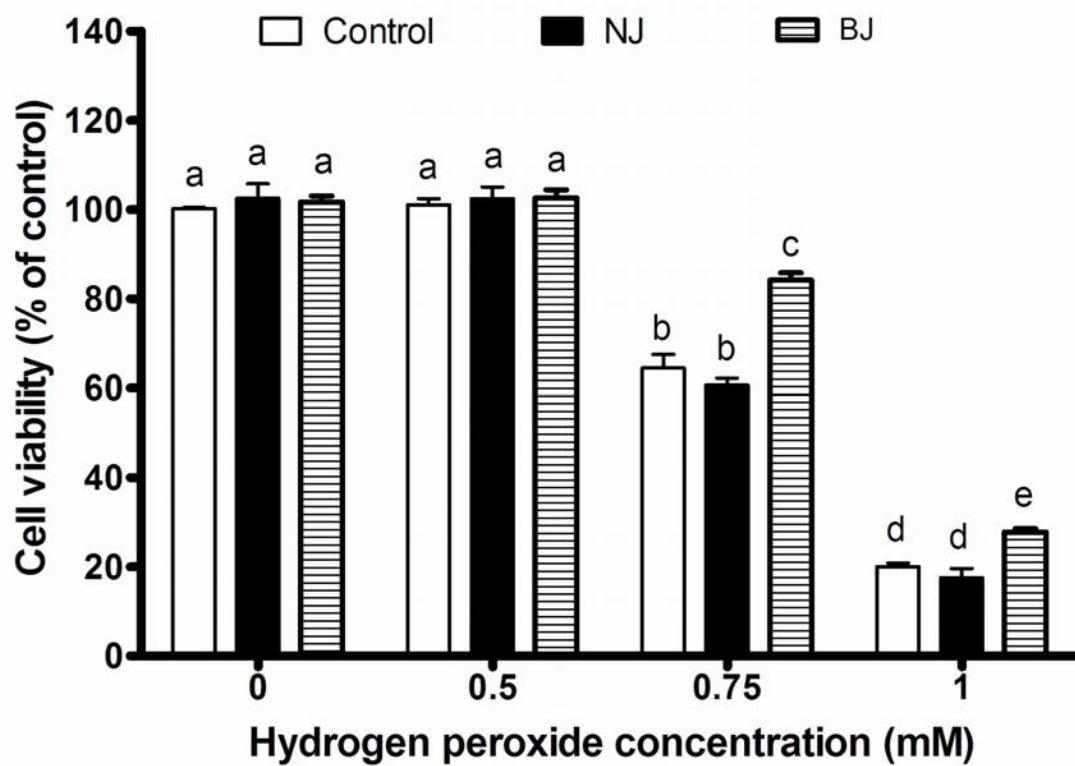


Figure 3

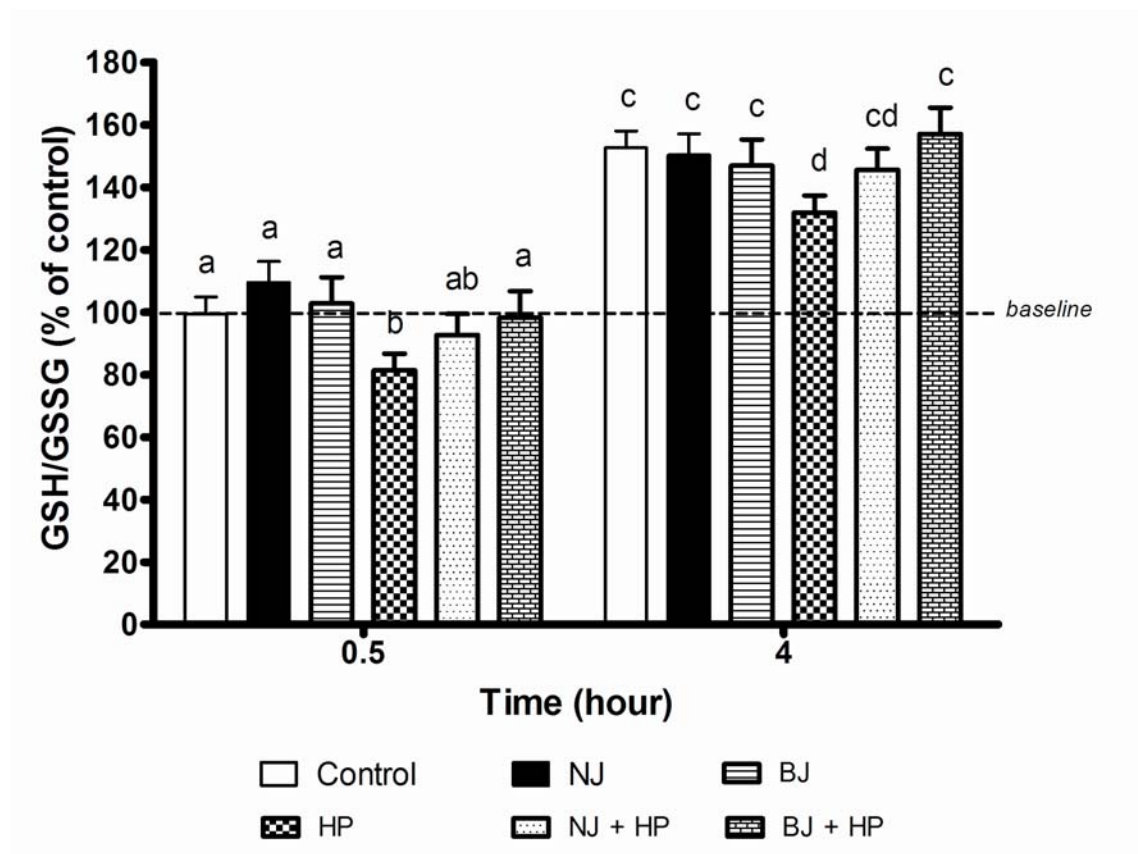


Figure 4

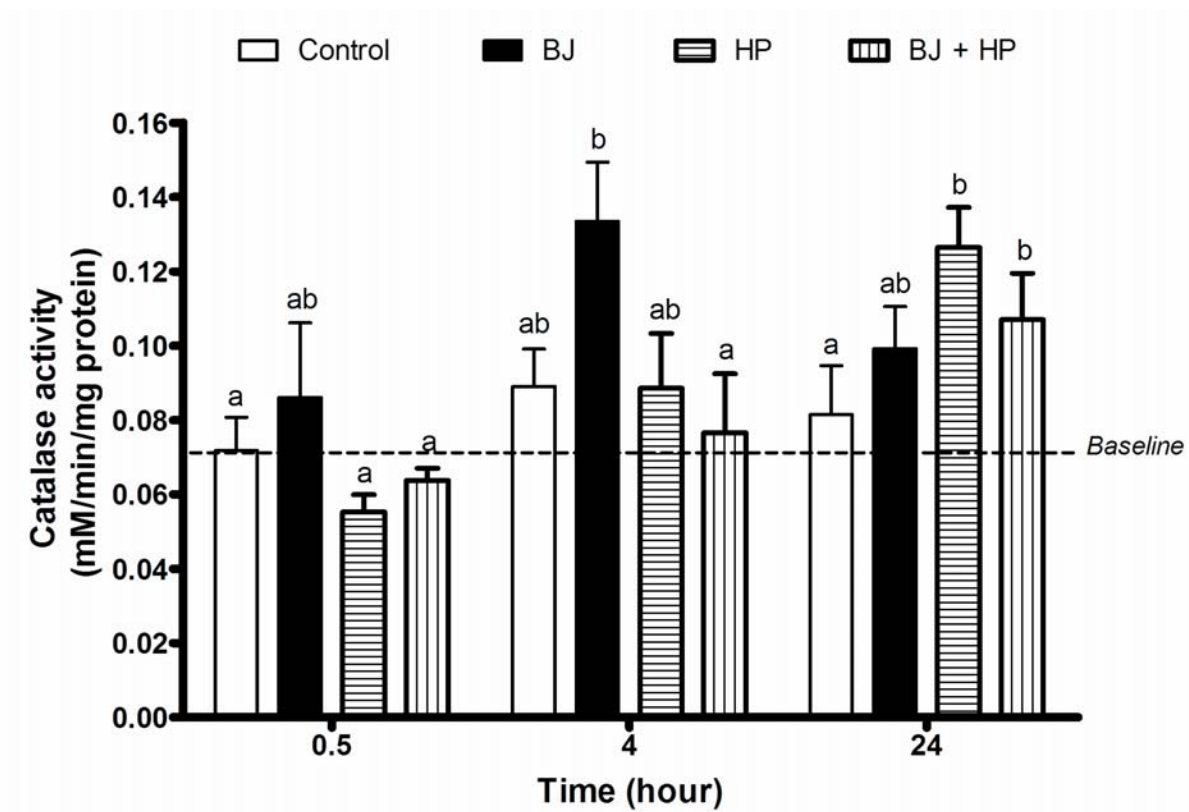


Figure 5

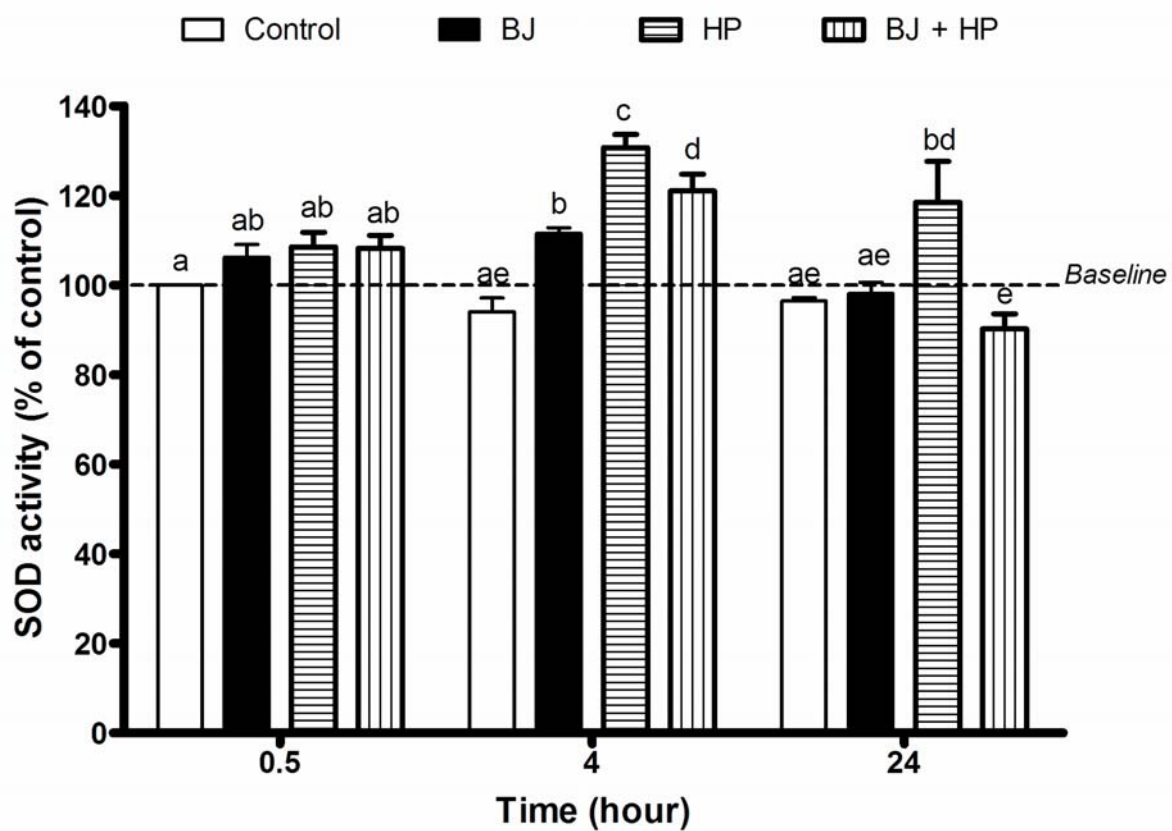


Figure 6

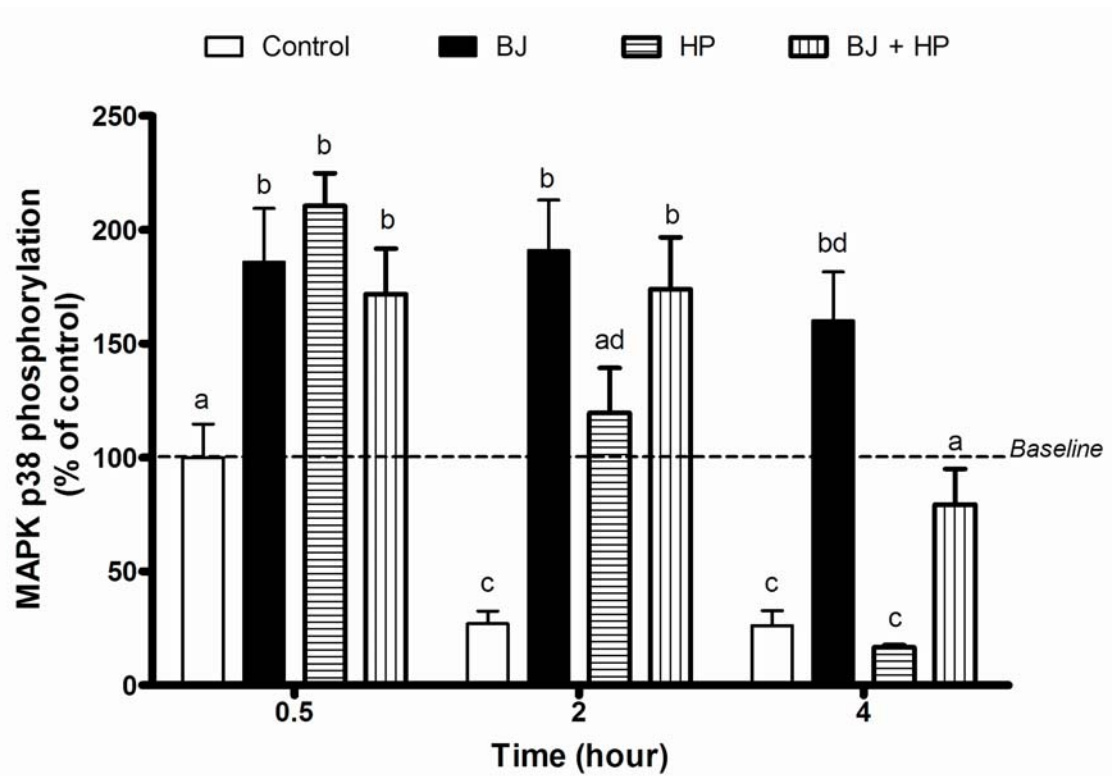
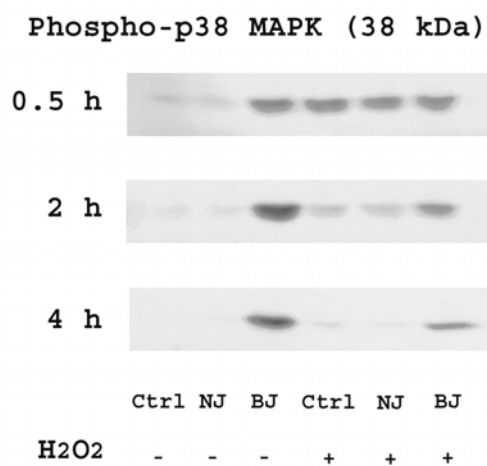


Figure 7

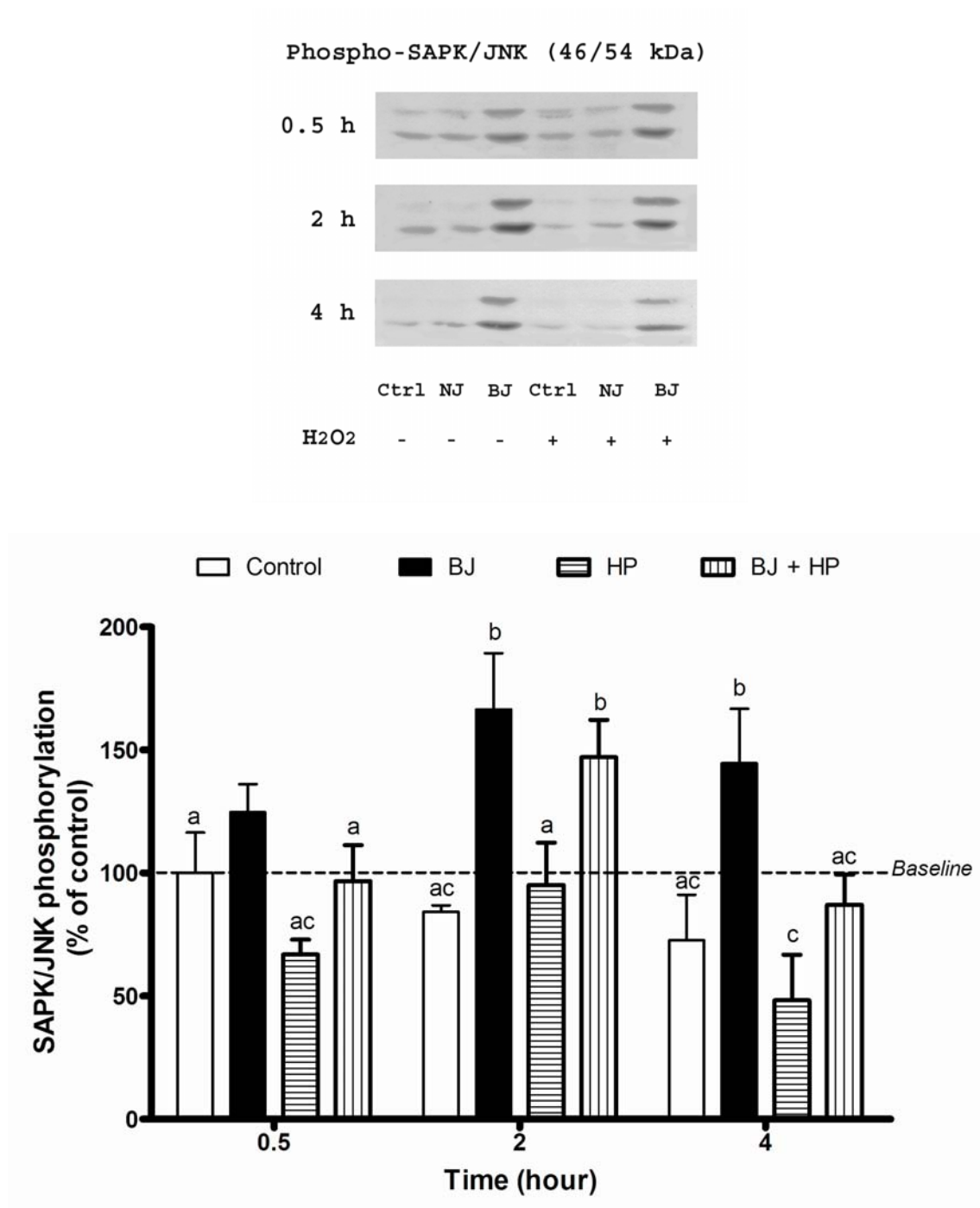


Figure 8

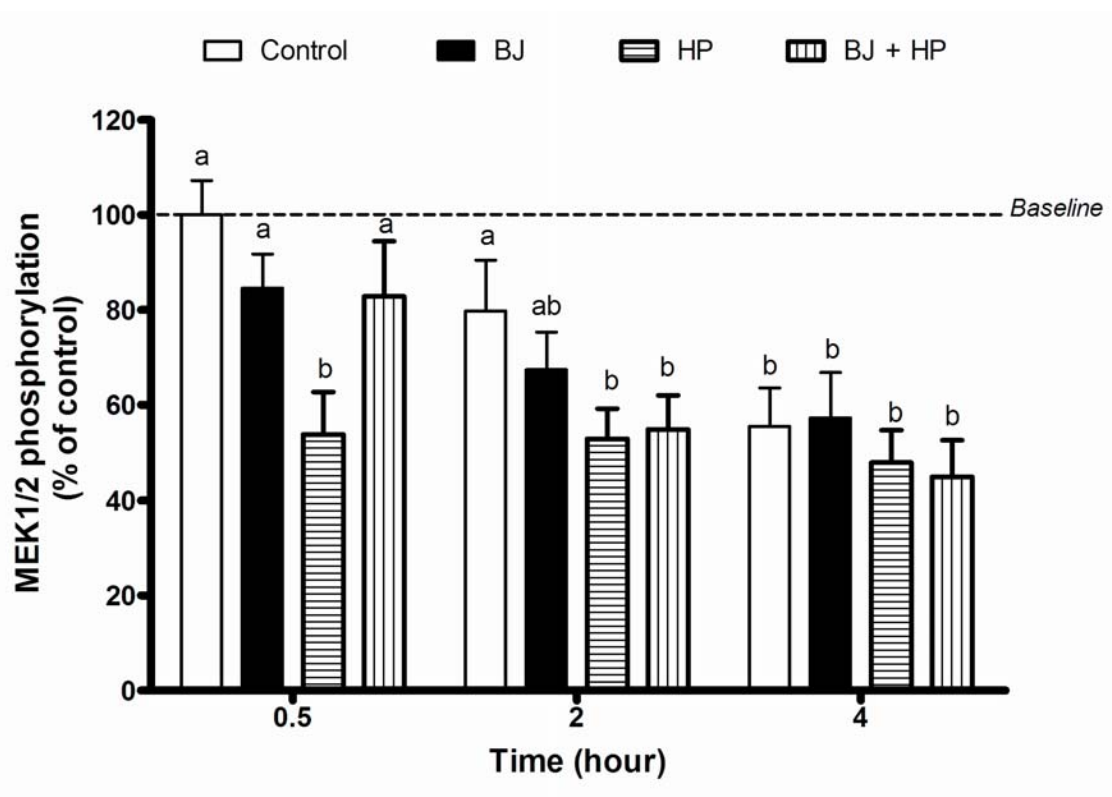
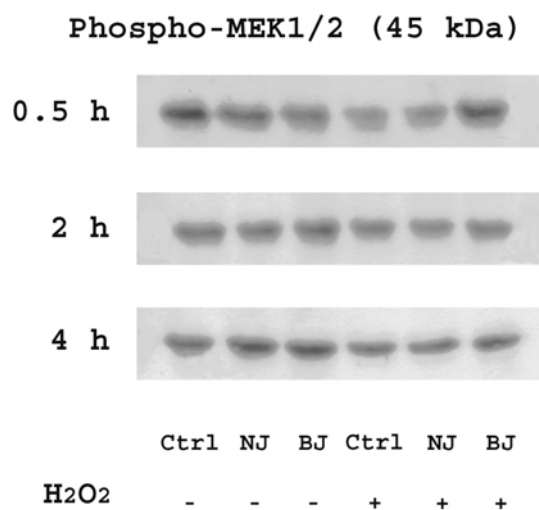
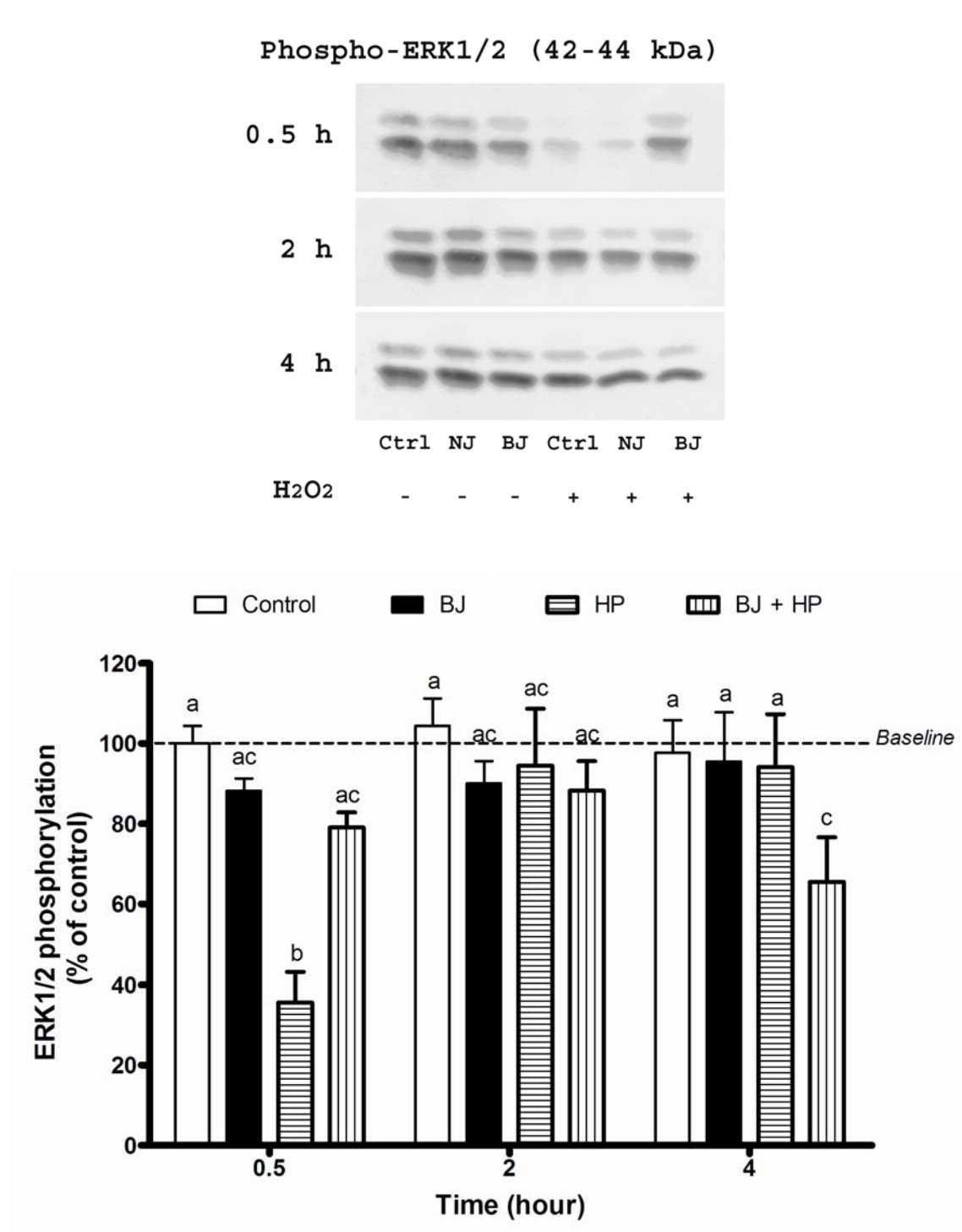


Figure 9



Chapitre 3

**Fermented Canadian lowbush blueberryjuice stimulates
glucose uptake and AMP-activated protein kinase
in insulin-sensitive cultured muscle cells and adipocytes.**

Role de chaque co-auteur dans cet article

Cet article est publié dans la revue “*Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*” (CJPP 2007 Sept; 85(9) : 956-965). Les travaux expérimentaux, l’analyse des données et la rédaction de l’article ont été effectués par Tri Vuong. Dr. Louis Martineau a contribué dans la correction de l’article. Dr. Pierre S. Haddad est mon directeur de recherche. Dre. Chantal Matar est ma co-directrice de recherche. Dr. Charles Ramassamy est mon co-directeur de recherche.

Title

Fermented Canadian lowbush blueberry juice stimulates glucose uptake and AMP-activated protein kinase in insulin-sensitive cultured muscle cells and adipocytes.

Authors

Tri Vuong^{1,2}, Louis C. Martineau^{1,2}, Charles Ramassamy^{2,3}, Chantal Matar^{2,4}, Pierre S. Haddad^{1,2}

Affiliation

¹Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada;

²Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels, Université Laval, Québec City, Québec, Canada.

³Institut Armand-Frappier, Institut National de Recherche Scientifique, Laval, Québec, Canada.

⁴Department of chemistry and biochemistry, Université de Moncton, Moncton, Canada.

Address for correspondence

Pierre S. Haddad, PhD.

Department of Pharmacology

Université de Montréal

P.O. Box 6128, Downtown Station

Montréal, Québec, Canada

H3C 3J7

Email : Pierre.haddad@umontreal.ca

Phone : 514-343-6590

Fax : 514-343-2291

Abstract

Extracts of the Canadian lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) have recently been demonstrated to possess significant antidiabetic potential, in accordance with the traditional use of this plant as an antidiabetic natural health product. Fermentation of blueberry juice with the *Serratia vacinii* bacterium is known to modify the phenolic content and increase antioxidant activity. The present study evaluated the effects of fermented blueberry juice on glucose uptake, adipogenesis, and the signaling pathways that regulate glucose transport in muscle cells and adipocytes. A 6 h treatment with fermented juice potentiated glucose uptake by 48% in C2C12 myotubes and by 142% in 3T3-L1 adipocytes, in the presence or absence of insulin, whereas nonfermented juice had no effect on transport. Fermented juice dramatically inhibited triglyceride content during adipogenesis of 3T3-L1 cells. Chlorogenic acid and gallic acid, both major phenolic components of fermented juice, had no effect on glucose uptake. Western blot analysis of the insulin-independent AMPK revealed increased phosphorylation resulting from a 6 h treatment. This activation or the increase in glucose uptake could not be explained by increased cytosolic calcium. Fermentation with *Serratia vacinii* is concluded to confer antidiabetic activities to blueberry juice. Although the active principles and their mechanisms of action remain to be identified, transformed blueberry juice may nevertheless represent a novel complementary therapy and a source of novel therapeutic agents against diabetes mellitus.

Résumé

Récemment, des travaux ont démontré le potentiel antidiabétique du bleuet sauvage Canadien (*Vaccinium angustifolium* Ait.), en accord avec l'utilisation traditionnelle de cette plante comme produit de santé naturel antidiabétique. La fermentation du jus de bleuet avec la bactérie *Serratia vaccinii* est connue pour modifier la concentration phénolique et augmenter l'activité antioxydante. La présente étude a évalué des effets du jus de bleuet fermenté sur la capture de glucose, l'adipogenèse et les voies de signalisation qui régulent le transport de glucose dans les cellules musculaires et les adipocytes. Un traitement de 6 h avec le jus fermenté a potentialisé la capture de glucose de 48 % dans les myotubes C2C12 et de 142 % dans les adipocytes 3T3-L1, en présence et en absence d'insuline, alors que le jus non fermenté n'a aucun effet sur le transport. Le jus fermenté a inhibé de façon significative la concentration de triglycérides durant l'adipogenèse des cellules 3T3-L1. L'acide chlorogénique et l'acide gallique, deux composants phénoliques majeurs du jus fermenté, n'ont pas eu d'effet sur la capture de glucose. L'analyse de l'AMPK par immunobuvardage de type Western a révélé une augmentation de la phosphorylation après un traitement de 6 h. Cette activation ou l'augmentation de la capture de glucose n'a pu être liée à une augmentation du calcium cytosolique. On conclut que la fermentation avec *S. vaccinii* confère des activités antidiabétiques au jus de bleuet. Les principes actifs et leurs mécanismes d'action doivent être identifiés; cependant, le jus de bleuet transformé pourrait représenter un traitement complémentaire novateur du diabète ainsi qu'une source de nouveaux agents thérapeutiques pour traiter la maladie.

Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM), a multi-faceted disease characterized by deregulation of energy metabolism, has reached epidemic proportions throughout the world. It is the leading cause of new cases of blindness, renal failure and non-traumatic limb amputation (Ray et al. 2005, Tripathi and Srivastava 2006). Moreover, T2DM is associated with cardiovascular diseases and the metabolic syndrome (Cusick et al. 2005, Calkin and Allen 2006). Peripheral insulin resistance is an important component of this disease and results in impaired insulin-stimulated glucose transport and disposal in muscle and fat, and impaired suppression of hepatic glucose output (Bjornholm and Zierath 2005, Valverde et al. 2005, Lazar and Saltiel 2006). Current antidiabetic medications are not optimal : they have low activity and must often be prescribed in combination, they can provoke hypoglycemia, and often result in weight gain (Cheng and Fantus 2005).

Members of *Vaccinium* family, including *Vaccinium myrtillus* L (billberry), *Vaccinium angustifolium* Ait (Canadian lowbush blueberry), and *Vaccinium macrocarpon* Ait (cranberry), are reputed to possess antidiabetic activity and have been used as traditional medicines for the treatment of diabetic symptoms (Chambers and Camire 2003, Haddad et al. 2003, Jellin et al. 2005). Recently, extracts of various parts of the *V. angustifolium* plant have been shown to possess insulin-like and glitazone-like properties, while also protecting cells against glucose toxicity (Martineau et al. 2006).

Striated muscle cells and adipocytes are characterized by a specialized mechanism for regulating glucose-uptake: in response to insulin receptor activation and downstream intracellular signaling, glucose transporters 4 (GLUT4) translocate to the plasma

membrane and mediate the facilitated diffusion of glucose (Bjornholm and Zierath 2005, Wijesekara et al. 2006). In addition to insulin, AMP-activated protein kinase (AMPK), an enzyme highly sensitive to energy status and central in the regulation of fuel preference, can also signal the translocation of GLUT4 in response to an increase in the AMP:ATP ratio. A rise in cytosolic calcium can also activate AMPK and induce glucose uptake (Woods et al. 2005, Jorgensen et al. 2006, Witters et al. 2006). Metformin and other biguanide antidiabetic drugs mediate their effects by acting on the AMPK pathway (Zou et al. 2004, Davis et al. 2006, Foretz et al. 2006). Thiazolidinediones, on the other hand, act on PPAR (peroxisome proliferators-activated receptor) nuclear receptors to upregulate genes involved in glucose and lipid metabolism including effectors of the insulin pathway such as phosphoinositide-3 kinase (PI3K) and GLUT4 (Halimi 2005, Li et al. 2005).

The blueberry fruit is rich in phenolic compounds such as hydrocinnamic acids, flavonoids and proanthocyanidines (Kahkonen et al. 2001, Matchett et al. 2006, Yi et al. 2006). Fermentation of blueberry juice with a novel strain of bacteria isolated from the blueberry flora and named *Serratia vacinii*, increases its phenolic content and antioxidant activity (Martin and Matar 2005) and modifies its biological activity (Vuong et al. 2006). Since fermentation modifies the properties of blueberry juice and since blueberry extracts are known to possess antidiabetic activities, the aim of this study was to assess the antidiabetic potential of transformed blueberry juice. Specifically investigated were its insulin-like activity, glitazone-like activity, and its effects on signaling pathways that regulate glucose uptake.

Materials and Methods

Preparation of fermented Blueberry juice

Mature lowbush blueberries (*V. angustifolium* Ait.) were purchased from Cherryfield Foods Inc. (Cherryfield, Me.) as fresh and untreated fruits. Blueberry juice was extracted by blending the fruit (100g) in a Braun Type 4259 food processor with an equivalent quantity (100g) of Minimal Broth Davis without dextrose (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). The fruit mixture was then centrifuged at 500 x g for 6 min to remove fruit skin and insoluble particles. The resulting juice was sterilized using 0.22 µm Express Millipore filters (Millipore, Etobicoke, Ont.).

S. vaccinii bacteria were cultured as previously described (Martin and Matar 2005). The juice was inoculated with a saturated culture of *S. vaccinii* to 2% of the total juice volume. After a 4-day fermentation period, the transformed juice was sterilized by 0.22 µm filtration. The total phenolic content was then measured by the Folin-Ciocalteu method using gallic acid as standard and hence expressed as gallic acid equivalent (GAE). The total phenolic content was increased from 4.58 mmol/L GAE to 19.34 mmol/L GAE, confirming successful transformation. Blueberry and fermented blueberry juice have been partially characterized elsewhere (Martin and Matar 2005, Calkin and Allen 2006, Matchett et al. 2006).

Cell culture

C2C12 murine skeletal myoblasts and 3T3-L1 murine preadipocytes were obtained from American Type Cell Collection (ATCC; Chicago, Ill.). All cells were cultured and differentiated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ air in 12-well plates for

deoxyglucose uptake experiments, 24-well plates for adipogenesis experiments, and 6 well plates for signaling experiments. For uptake and signaling experiments, myoblasts were differentiated into myotubes over a 7-day period and preadipocytes were differentiated into adipocytes over a 8- to 10-day period, as previously described (Martineau et al. 2006, Spoor et al. 2006). For adipogenesis experiments, preadipocytes were differentiated for 5 days.

Cytotoxicity experiments were conducted to determine the maximal non-toxic dose of blueberry juice. Cell morphology was assessed by phase-contrast microscopy and viability was evaluated by Trypan Blue dye exclusion. Fermented blueberry juice at a concentration of 30 μ M GAE was found to have no effect on cell morphology or viability of C2C12 myotubes and 3T3-L1 adipocytes after a 24-hour treatment (data not shown) Nonfermented juice at this same concentration was also non-cytotoxic. This dose was selected for all further experiments. Control cells were cultured as described above for each type of experiment but received no treatment.

Glucose transport assay

To test insulin-like activity and potentiation of insulin activity, deoxyglucose uptake was measured in differentiated C2C12 myotubes and 3T3-L1 adipocytes treated with blueberry juices in the presence (stimulated state) or absence (basal state) of insulin. Cells were treated with blueberry juice in complete differentiation medium for fixed durations between 1 and 24 h prior to assay. The last 3 h of incubation was performed in either complete differentiation medium or serum-free medium. For 1 h treatments in

serum-free medium, differentiation medium was replaced with serum-free medium 2 h before the incubation period.

Following the treatment period, cells were rinsed twice with a Krebs-phosphate buffer (20 mmol/L HEPES, 4.05 mmol/L Na₂HPO₄, 0.95 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.4, 136 mmol/L NaCl, 5 mmol/L glucose, 4.7 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgSO₄) at 37°C. Cells were then stimulated with 0 or 100 nmol/L insulin in this buffer for 30 min at 37°C, followed by rinses in glucose-free Krebs-phosphate buffer. This was followed by the addition of 1 µCi/mL of 2-deoxy-D-[-1-³H]-glucose (TRK-383, Amersham Biosciences, UK), 0.5 µCi/well, for exactly 10 min. Cells were then placed on ice and immediately washed three times with ice-cold buffer. Cells were lysed with 0.1 mol/L NaOH for 30 min and scraped. The lysate was added to 4 mL of liquid scintillation cocktail (Ready-Gel 586601, Beckman Coulter, Mississauga, Ont.) and incorporated radioactivity was measured in a scintillation counter (LKB1219 RACKBETA, Wallac, Perkin-Elmer, St-Laurent, Que.).

Adipogenesis assay

Differentiating adipocytes were treated with blueberry juices and the accumulation of triglycerides was assessed at the end of the 5th day of differentiation. This assay is often employed as a screen for PPAR γ activity (Kang et al. 2003, Norisada et al. 2004) since the stimulation of the PPAR γ receptor during differentiation accelerates adipogenesis and the accumulation of triglycerides (Fève 2005, Farmer 2006).

Cells were treated with juice or with rosiglitazone (positive control) in differentiation medium, or with proliferation medium (negative control) throughout the 5-day experimental period and medium was replaced every 24 h. At the end of the 5th day of treatment, intracellular triglycerides were stained with AdipoRed fluorescent reagent (Cambrex Bio Science, Walkersville, Md.) as described previously (Martineau et al. 2006). Briefly, cells were washed with PBS, and then 1 mL of PBS was added to each well followed by 30 μ L of reagent. After a 15 min incubation at 37°C, 485/572 fluorescence was measured in a plate reader (Wallac Victor 2, Perkin-Elmer, St-Laurent, Que.). The average fluorescence value of the wells treated with proliferation medium was considered background and was subtracted from all other values.

Western Blot analysis

Differentiated C2C12 myotubes and 3T3-L1 adipocytes were treated for 6 h with or without blueberry juices in differentiation medium and subsequently stimulated for 5, 15, and 30 min with either 100 nM insulin or 2 mM 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR). Cells were then placed on ice and washed three times with ice-cold Krebs-phosphate buffer. Cells were lysed in a RIPA lysis buffer (50 mmol/L HEPES, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EGTA, 2 mmol/L MgCl₂, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing protease inhibitors (2 mmol/L PMSF and Complete Mini protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Laval, Que.)) and phosphatase inhibitors (0.5 mmol/L NaF, 2 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L Na₄P₂O₇). Lysed cells were then scraped and transferred to microcentrifuge tubes. Samples were allowed to lyse for an additional 15 min on ice with periodic vortexing. Lysates were

then centrifuged at 4500 x g and supernatants were collected and stored at -80°C until further analysis.

Protein concentration of lysates was assessed using the bicinchoninic acid colorimetric method (Pierce, Rockford, Ill.), using the procedure supplied by the manufacturer. One hundred and twenty micrograms of total protein from each sample were loaded onto an 8% acrylamide gel and separated at 4°C for 3 h at 75 mA, followed by 15 h at 20 mA, using a Protean II electrophoresis apparatus (BioRad, Missisauga, Ont.). Separated samples were then electro-transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore) at 4°C for 90 min at 1A using a Transblot apparatus (BioRad). Membranes were stained with Ponceau red solution (5%, in acetic acid, Sigma), photographed and then washed in TBST (50 mmol/L Tris, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 0.5% Tween-20), followed by blocking in TBST + 5% non-fat dried milk for 1 h at ambient temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with the following antibodies : rabbit anti-phospho-Akt (Ser 473), mouse anti-phospho-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204), rabbit anti-phospho-AMPK α (Thr 171) (cat # 9271, #4377, #2531 respectively, Cell Signaling Tech. Inc., Danvers, Mass.) at 1:1000 dilution in TBST + 5% BSA. Membranes were then incubated 60 min at ambient temperature with HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, Penn.) at 1:100 000 dilution in TBST + 5% milk. After washing with TBST, the blots were revealed using the enhanced chemiluminescence method (ECL, Amersham, Piscataway, N.J.) on blue-light-sensitive film (Amersham). Densitometric analysis was performed using a Hewlett-Packard flatbed scanner and NIH Image software.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data by two-way ANOVA and Fisher post hoc tests were performed using StatView software (Cary, N.C.). Statistical significance was set at $p \leq 0.05$. Data are reported as mean \pm SD.

Results

Increase of deoxyglucose uptake in differentiated C2C12 muscle cells and 3T3-L1 adipocytes

Insulin-like or insulin-sensitizing activities of blueberry juices were tested with a deoxyglucose uptake assay in two insulin-responsive and GLUT4-containing cell lines: differentiated C2C12 muscle cells and 3T3-L1 adipocytes. A time-course analysis of treatment duration was performed with fermented and nonfermented blueberry juice containing 30 $\mu\text{mol/L}$ GAE and the peak effect was produced by a 6-hour treatment (Figs. 1 and 2); this treatment duration was selected for all additional experiments.

At this 6-hour treatment time point, insulin increased deoxyglucose uptake by $33 \pm 4 \%$ and by $60 \pm 13 \%$ in C2C12 and 3T3-L1 cells respectively, when compared to control cells. Similarly, fermented blueberry juice increased glucose transport by $49 \pm 7 \%$ in C2C12 cells and $142 \pm 8 \%$ in 3T3-L1 cells as compared to control. In contrast, the nonfermented juice had no effect above control. Moreover, when fermented blueberry juice and insulin treatments were combined, glucose transport in both cell lines increased to $81 \pm 10 \%$ in C2C12 and to $223 \pm 6 \%$ in 3T3-L1, levels that was similar to the sum of each treatment alone, indicating an additive effect (Figs. 1 and 2).

Because serum contains endogenous insulin, deoxyglucose uptake was also performed in cells treated for 3 h in complete medium followed by 3 h in serum-free medium. As expected, basal and insulin-stimulated rates of uptake were decreased in controls groups by 13 % in C2C12 cells and by 55 % in 3T3-L1 cells in these conditions. Moreover, glucose transport was reduced by an equivalent extent in all experimental groups, in the presence or absence of insulin. Hence, fermented juice still increased uptake by a proportion similar to that observed in complete medium, namely by 39 ± 4 % in C2C12 and by 152 ± 2 % in 3T3-L1, as compared to nonfermented juice (Fig. 3).

Inhibition of adipogenesis and of PPAR γ activation

Activation of the nuclear receptor PPAR γ can increase the expression of genes involved in metabolism of glucose and lipids (Li et al. 2005, Finck 2006) and thereby increase insulin sensitivity. The thiazolidinediones class of antidiabetic drugs, including rosiglitazone, acts at least in part by this mechanism. To test for insulin-sensitizing glitazone-like activity, adipocytes undergoing differentiation were treated with blueberry juices and assayed for accelerated accumulation of triglycerides, as an indirect indication of PPAR γ stimulation (Kang et al. 2003, Norisada et al. 2004). As illustrated in Fig. 4, rosiglitazone, used as positive control, enhanced the accumulation of triglyceride by 2.1-fold on day 5 of differentiation. Nonfermented juice did not affect adipogenesis, as compared to differentiation medium alone. Treatment with fermented blueberry juice decreased triglyceride accumulation to 10% of nonfermented juice, a level comparable to that seen in proliferation medium alone (not shown).

Activation of AMPK by fermented blueberry juice

Translocation of GLUT4 can be stimulated by activation of the AMPK pathway, independently of insulin. Since the baseline activity of AMPK is increased by serum starvation (unpublished observation), AMPK phosphorylation was thus measured in complete (serum-containing) medium. The positive control AICAR stimulated AMPK phosphorylation by over 4-fold in C2C12 cells while had no effect in 3T3-L1 cells as measured by Western Blot analysis of phosphorylated-AMPK α content. A 6 h treatment with fermented blueberry juice increased the phosphorylation of AMPK by 1.9-fold in C2C12 cells and 3.2-fold in 3T3-L1 cells. Treatment with nonfermented juice did not affect total AMPK content in either cell line (Fig. 5).

Lack of contribution of cytosolic calcium to enhancement of deoxyglucose uptake

Among insulin-independent mechanisms, cytosolic calcium is known to be a modulator of glucose transport in muscle cells, notably in response to contraction. C2C12 cells were thus treated with blueberry juices in the presence of 50 $\mu\text{mol/L}$ of the cell-permeable calcium chelator BAPTA-AM prior to the deoxyglucose uptake assay, in order to assess the contribution of cytosolic calcium to the effects of fermented blueberry juice. At 50 $\mu\text{mol/L}$, BAPTA-AM decreased basal deoxyglucose uptake proportionately in treated and untreated cells, which amounted to a reduction of 20-25% (Fig. 6). Hence, the presence of BAPTA-AM did not affect the fold-increase of glucose transport induced by fermented blueberry juice.

Lack of effect of blueberry juices on insulin-dependent pathway

Binding of insulin results in autophosphorylation and activation of its receptor (IR) and induces the phosphorylation of its downstream effectors, including Akt and ERK1/2. In order to test whether the fermented blueberry juice increased glucose uptake via this insulin-dependant pathway, western blot analyses of Akt and ERK1/2 phosphorylation was conducted on C2C12 and 3T3-L1 cell extracts after a 6 h treatment with blueberry juices, with or without subsequent stimulation with insulin. In these conditions, nonfermented and fermented blueberry juices did not modulate the basal phosphorylation of Akt or of ERK1/2, and did not potentiate the insulin-induced phosphorylation of these proteins (data not illustrated).

Lack of involvement of chlorogenic acid and gallic acid in the action of fermented blueberry juice

Since chlorogenic acid exists naturally at a high concentration in blueberry juice and since gallic acid was produced during fermentation with the *Serratia vaccinii* bacterium (Martin and Matar 2005), these two compounds were tested in the deoxyglucose uptake assay to determine whether they can account for the activity of fermented blueberry juice. When C2C12 cells were treated with chlorogenic and gallic acids at a concentration of 30 $\mu\text{mol/L}$, the same concentration of GAE used for blueberry juices, basal and insulin-stimulated deoxyglucose uptake was similar to that observed in control cells or cells treated with nonfermented juice (Fig. 7).

Discussion

The *S. vaccinii* bacterium is a component of the natural microflora of *V. angustifolium*. Fermentation of juices from blueberry, cranberry (*V. macrocarpon* Ait.), Saskatoon berries (*Amelanchier* sp.), strawberry (*Fragaria* sp.), and grapes (*Vitis* sp.) with this bacterium increases total phenolic content (Vuong et al. 2006). Fermentation also increases the antioxidant activity of blueberry and cranberry juices (Martin and Matar 2005, Vuong et al. 2006). The present study demonstrates that transformation by fermentation with the *S. vaccinii* bacterium confers antidiabetic activities to blueberry juice.

Fermented blueberry juice increased deoxyglucose uptake in two lines of insulin-sensitive cells by as much as 2-fold. Several lines of evidence suggest that this effect was largely insulin-independent. Firstly, whereas the time-course and amplitude of the effect of fermented blueberry juice on glucose transport was roughly similar to that of insulin in both muscle and adipose cell lines, its effect was found to be additive to that of 100 nM insulin. Since this concentration of insulin is known to be supraphysiological in these cell lines (Kumar and Dey 2003, Haasch et al. 2006), only weak or non-existent increases would have been expected if fermented blueberry juice had acted as an agonist on the insulin receptor (insulin-like properties). Secondly, the proportionate effect of fermented blueberry juice on basal and insulin-stimulated deoxyglucose uptake (relative to the respective control) was not significantly affected by serum starvation, which removes the impact of endogenous insulin normally present in serum (Huang et al. 2005, Sasaoka et al. 2005, Vainio et al. 2005, Haasch et al. 2006). Again, this argues for an additive effect between insulin (here endogenously present in serum) and fermented

blueberry juice in conditions where complete medium was used. Finally, experiments that assessed the phosphorylation state of Akt and ERK1/2 failed to show any effect of blueberry juices, in either basal or insulin-stimulated conditions. These proteins are key effectors of the insulin signaling pathway inducing the translocation of GLUT4 and deoxyglucose uptake, and promoting mitogenic effects (Bjornholm and Zierath 2005).

One of the most important results in this study is the finding that treatment of cells with fermented blueberry juice activates AMPK. Derivatives of biguanides, one of the major classes of antidiabetic drugs that includes Metformin, achieve their effect through the AMPK pathway (Davis et al. 2006, Guigas et al. 2006). Activation of AMPK signals the translocation of GLUT4 to the plasma membrane and promotes oxidation of glucose and fatty acids while also stimulating mitochondrial biogenesis (Long and Zierath 2006).

The mechanism by which AMPK is activated by fermented juice is unclear. An increase in cytosolic calcium is known in some cell types to activate AMPK through its upstream kinase CaMKK (Woods et al. 2005, Jorgensen et al. 2006, Witters et al. 2006). The involvement of calcium was investigated in the present study by treating cells with the calcium chelator BAPTA-AM prior to the deoxyglucose assay. BAPTA treatment decreased uptake proportionally well in all experimental conditions, thereby indicating that a rise in cytosolic calcium is unlikely to contribute to uptake induced by fermented juice. Alternatively, Metformin has been shown to activate AMPK by an indirect effect involving an increase in the AMP:ATP ratio secondary to a mild inhibition of mitochondrial respiration (Zou et al. 2004). Further studies are needed to address the

involvement of mitochondria and cellular ATP content in the metabolic effects of fermented juice.

The compound(s) responsible for the activity of fermented juice is(are) not known. However, fermentation with *Serratia* is known to introduce only a few new phenolics to blueberry and cranberry juice (Martin and Matar 2005, Vuong et al. 2006) . In the present study, chlorogenic acid and gallic acid, both important polyphenolic components of fermented blueberry juice, were tested and ruled out as active ingredients in the context of the antidiabetic activity presented herein. Nevertheless, it is acknowledged that other compounds may also contribute to the observed activities. For instance, the organic acid quinic acid was previously measured in blueberry wine made by fermentation of fresh or heat-extracted blueberry juice (Zee and Simard, 1973) and 5-Caffeoyl quinic acid contributes to the hypoglycemic effects of *Viburnum dilatatum* Thunb (Iwai et al. 2006). It is also known that caffeic acid increases glucose uptake via the phospholipase C/PKC pathway (Cheng and Liu 2000).

Fermented blueberry juice also failed to stimulate adipocyte lipogenesis (measured as triglyceride accumulation), as would have been expected for a glitazone-like, PPAR γ -mediated, insulin-sensitizing pathway. In fact, fermented blueberry juice had the opposite effect, in that it decreased adipocyte lipogenesis. Similar inhibition has been reported for several polyphenolic compounds, including green tea catechins, genistein and baicalein (Hwang et al. 2005, Cha et al. 2006, Wolfram et al. 2006), and is therefore not a novel finding. Other compounds introduced by the fermentation process could also contribute to this effect. Further studies will be necessary to identify the active principles

and their mechanisms of action in this regard. However, such an inhibition of adipogenesis, in combination with antidiabetic properties, could represent a beneficial effect if it translates into a prevention of weight gain *in vivo*.

The results of the present study indicate that fermentation of blueberry juice with *S. vaccinii* bacterium, previously shown to affect its composition (Martin and Matar 2005, Vuong et al. 2006), also modifies its biological activity, conferring potentially antidiabetic properties to the fermented juice. Because fermented blueberry juice stimulates AMPK phosphorylation and does not appear to have insulin-mimetic activities, all results strongly suggest that such an insulin-independent pathway represents the major mechanism by which fermented blueberry juice exerts its antidiabetic potential. Although the active principles and their precise mechanisms of action remain to be identified, these promising *in vitro* results support the need for *in vivo* testing of fermented blueberry juice in diabetic animals. Moreover, the identification of active compounds in fermented blueberry juice may result in the discovery of promising new antidiabetic molecules.

References

- Bjornholm, M. and Zierath, J. R. 2005. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochem. Soc. Trans.*, **33**: 354-357.
- Calkin, A. C. and Allen, T. J. 2006. Diabetes mellitus-associated atherosclerosis: mechanisms involved and potential for pharmacological invention. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, **6**: 15-40.
- Cha, M. H., Kim, I. C., Lee, B. H. and Yoon, Y. 2006. Baicalein inhibits adipocyte differentiation by enhancing COX-2 expression. *J. Med. Food*, **9**: 145-153.
- Chambers, B. K. and Camire, M. E. 2003. Can cranberry supplementation benefit adults with type 2 diabetes? *Diabetes Care*, **26**: 2695-2696.
- Cheng, A. Y. and Fantus, I. G. 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*, **172**: 213-226.
- Cheng, J. T. and Liu, I. M. 2000. Stimulatory effect of caffeic acid on alpha1A-adrenoceptors to increase glucose uptake into cultured C2C12 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **362**: 122-7.
- Cusick, M., Meleth, A. D., Agron, E., Fisher, M. R., Reed, G. F., Knatterud, G. L., Barton, F. B., Davis, M. D., Ferris, F. L., 3rd and Chew, E. Y. 2005. Associations of mortality and diabetes complications in patients with type 1 and type 2 diabetes: early treatment diabetic retinopathy study report no. 27. *Diabetes Care*, **28**: 617-625.
- Davis, B. J., Xie, Z., Viollet, B. and Zou, M. H. 2006. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes*, **55**: 496-505.
- Farmer, S. R. 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell. Metab.*, **4**: 263-273.
- Feve, B. 2005. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **19**: 483-499.
- Finck, B. N. 2006. Effects of PPARalpha on cardiac glucose metabolism: a transcriptional equivalent of the glucose-fatty acid cycle? *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.*, **4**: 161-171.
- Foretz, M., Taleux, N., Guigas, B., Horman, S., Beauloye, C., Andreelli, F., Bertrand, L. and Viollet, B. 2006. [Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]. *Med. Sci. (Paris)*, **22**: 381-388.

- Guigas, B., Bertrand, L., Taleux, N., Foretz, M., Wiernsperger, N., Vertommen, D., Andreelli, F., Viollet, B. and Hue, L. 2006. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside and metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation. *Diabetes*, **55**: 865-874.
- Haasch, D., Berg, C., Clampit, J. E., Pederson, T., Frost, L., Kroeger, P. and Rondinone, C. M. 2006. PKC θ is a key player in the development of insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**: 361-368.
- Haddad, P.S., Depot, M., Settaf, A., Chabli, A. and Cherrah, Y. 2003. Comparative study on the Medicinal Plants. Most recommended by traditional practitioners in Morocco and Canada. *J. Herbs, Spices and Medicinal Plants*, **10**: 25-45.
- Halimi, S. 2005. [The glitazones]. *Rev. Med. Interne*, **26**: 54-57.
- Huang, J., Imamura, T., Babendure, J. L., Lu, J. C. and Olefsky, J. M. 2005. Disruption of microtubules ablates the specificity of insulin signaling to GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.*, **280**: 42300-42306.
- Hwang, J. T., Park, I. J., Shin, J. I., Lee, Y. K., Lee, S. K., Baik, H. W., Ha, J. and Park, O. J. 2005. Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**: 694-699.
- Iwai, K., Kim, M-Y., Onodera, A. and Matsue, H. 2006. Alpha-glucosidase inhibitory and antihyperglycemic effects of polyphenols in the fruit of *Viburnum dilatatum* Thunb. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 4588-92.
- Jellin, J., Gregory, P., Batz, F. and Hitchens, K. 2005. *Natural Medicines Comprehensive Database*. ed. Pharmacist's Letter/Prescriber's Letter. pp. 2239. Stockton, CA: Therapeutic Research Faculty.
- Jorgensen, S. B., Richter, E. A. and Wojtaszewski, J. F. 2006. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J. Physiol.*, **574**: 17-31.
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I. and Heinonen, M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 4076-4082.
- Kang, K., Liu, W., Albright, K. J., Park, Y. and Pariza, M. W. 2003. trans-10,cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **303**: 795-799.
- Kumar, N. and Dey, C. S. 2003. Development of insulin resistance and reversal by thiazolidinediones in C2C12 skeletal muscle cells. *Biochem. Pharmacol.*, **65**: 249-257.

Lazar, D. F. and Saltiel, A. R. 2006. Lipid phosphatases as drug discovery targets for type 2 diabetes. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **5**: 333-342.

Li, X., Hansen, P. A., Xi, L., Chandraratna, R. A. and Burant, C. F. 2005. Distinct mechanisms of glucose lowering by specific agonists for peroxisomal proliferator activated receptor gamma and retinoic acid X receptors. *J. Biol. Chem.*, **280**: 38317-38327.

Long, Y. C. and Zierath, J. R. 2006. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest.*, **116**: 1776-1783.

Martin, L. and Matar, C. 2005. Increase of antioxidant capacity of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) during fermentation by a novel bacterium from the fruit microflora. *J. Sci. Food Agri.*, **85**: 1477-1484.

Martineau, L. C., Couture, A., Spoor, D., Benhaddou-Andaloussi, A., Harris, C., Meddah, B., Leduc, C., Burt, A., Vuong, T., Mai Le, P., Prentki, M., Bennett, S. A., Arnason, J. T. and Haddad, P. S. 2006. Antidiabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Phytomedicine*, **13**: 612-623.

Matchett, M. D., MacKinnon, S. L., Sweeney, M. I., Gottschall-Pass, K. T. and Hurta, R. A. 2006. Inhibition of matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells by flavonoids from lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*): possible roles for protein kinase C and mitogen-activated protein-kinase-mediated events. *J. Nutr. Biochem.*, **17**: 117-125.

Norisada, N., Masuzaki, H., Fujimoto, M., Inoue, G., Hosoda, K., Hayashi, T., Watanabe, M., Muraoka, S., Yoneda, F. and Nakao, K. 2004. Antidiabetic and adipogenic properties in a newly synthesized thiazolidine derivative, FPF5-410. *Metabolism*, **53**: 1532-1537.

Ray, J. A., Valentine, W. J., Secnik, K., Oglesby, A. K., Cordony, A., Gordoys, A., Davey, P. and Palmer, A. J. 2005. Review of the cost of diabetes complications in Australia, Canada, France, Germany, Italy and Spain. *Curr. Med. Res. Opin.*, **21**: 1617-1629.

Sasaoka, T., Fukui, K., Wada, T., Murakami, S., Kawahara, J., Ishihara, H., Funaki, M., Asano, T. and Kobayashi, M. 2005. Inhibition of endogenous SHIP2 ameliorates insulin resistance caused by chronic insulin treatment in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia*, **48**: 336-344.

Spoor, D.C., Martineau, L. C., Leduc, C., Benhaddou-Andaloussi, A., Meddah, B., Harris, C., Burt, A., Fraser, M.H., Coonishish, J., Joly, E., Cuerrier, A., Bennett, S.A., Johns, T., Prentki, M., Arnason, J.T. and Haddad, P.S. 2006. Selected plant species from the Cree pharmacopoeia of northern Quebec possess antidiabetic potential. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **84**: 847-858.

Tripathi, B. K. and Srivastava, A. K. 2006. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *Med. Sci. Monit.*, **12**: RA130-147.

Vainio, S., Bykov, I., Hermansson, M., Jokitalo, E., Somerharju, P. and Ikonen, E. 2005. Defective insulin receptor activation and altered lipid rafts in Niemann-Pick type C disease hepatocytes. *Biochem. J.*, **391**: 465-472.

Valverde, A. M., Benito, M. and Lorenzo, M. 2005. The brown adipose cell: a model for understanding the molecular mechanisms of insulin resistance. *Acta Physiol. Scand.*, **183**: 59-73.

Vuong, T., Martin, L. and Matar, C. 2006. Antioxidant activity of fermented berry juices and their effects on nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in macrophage 264.7 gamma NO(-) cell line. *Journal of Food Biochemistry*, **30**: 249-268.

Wijesekara, N., Thong, F. S. L., Anonescu, C. N. and Klip, A. 2006. Diverse Signals Regulate Glucose Uptake into Skeletal Muscle. *Canadian journal of diabetes*, **30**: 80-88.

Witters, L. A., Kemp, B. E. and Means, A. R. 2006. Chutes and Ladders: the search for protein kinases that act on AMPK. *Trends Biochem. Sci.*, **31**: 13-16.

Wolfram, S., Wang, Y. and Thielecke, F. 2006. Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol. Nutr. Food Res.*, **50**: 176-187.

Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M. and Carling, D. 2005. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell. Metab.*, **2**: 21-33.

Yi, W., Akoh C., Fischer, J. and Krewer, G. 2006. Effects of phenolic compounds in blueberries and muscadine grapes on HepG2 cell viability and apoptosis. *Food Research International*, **39**: 628-638.

Zee, J. A. and Simard, R. E. 1973. Evolution of organic acids during the fermentation of lowbush blueberry in the wine-making. *Am. J. Enol. Vitic.*, **24**:86-90.

Zou, M. H., Kirkpatrick, S. S., Davis, B. J., Nelson, J. S., Wiles, W. G. th, Schlattner, U., Neumann, D., Brownlee, M., Freeman, M. B. and Goldman, M. H. 2004. Activation of the AMP-activated protein kinase by the antidiabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.*, **279**: 43940-43951.

Figure legends

Figure 1: ^3H -deoxyglucose uptake by C2C12 cells treated with fermented (F) and nonfermented (NF) blueberry juice (both at $30\ \mu\text{mol/L}$ GAE), in the presence of 0 (solid line) or 100 (dashed line) nmol/L insulin, after 1, 3, 6, 9, 12 or 24 h treatment. Results are expressed as percentage of control (untreated cell). Means \pm SD are presented for 6-12 replicates. *indicates a significant difference ($p \leq 0.05$) vs. control.

Figure 2: ^3H -deoxyglucose uptake by 3T3-L1 cells treated with fermented (F) and nonfermented (NF) blueberry juice (both at $30\ \mu\text{mol/L}$ GAE), in the presence of 0 (solid line) or 100 (dashed line) nmol/L insulin, after 1, 3, 6 or 24 h treatment. Results are expressed as percentage of control (untreated cell). Means \pm SD are presented for 3-12 replicates. *indicates a significant difference ($p \leq 0.05$) vs. control.

Figure 3: ^3H -deoxyglucose uptake by C2C12 and 3T3-L1 cells treated with $30\ \mu\text{M}$ GAE fermented (F) and nonfermented (NF) blueberry juice (both at $30\ \mu\text{mol/L}$ GAE) in the presence of 0 or 100 nmol/L insulin after 3 h treatment followed by 3 h treatment with or without a serum deprivation. Results are expressed as percentage of control (untreated cell). Means \pm SD are presented for 6-12 replicates. Columns with different letters denote significant difference ($p \leq 0.05$) from each other.

Figure 4: Lipid accumulation, quantified using AdipoRed fluorescent dye, in differentiating 3T3-L1 adipocytes treated for 5 days with 30 $\mu\text{mol/L}$ GAE of blueberry juice. Rosiglitazone (10 nmol/L) was used as a positive control. Results are expressed as percentage of control (untreated cell). Means \pm SD are presented for 4 replicates. *indicates a significant difference ($p \leq 0.05$) vs. control.

Figure 5: Content of phosphorylated-AMPK α measured by Western Blot analysis, expressed as percentage of untreated cells. Means \pm SD are presented for 3 separate experiments. *indicates a significant difference ($p \leq 0.05$) vs. control.

Figure 6: Increase of ^3H -deoxyglucose uptake by 30 $\mu\text{mol/L}$ GAE fermented blueberry juice in C2C12 cells in the presence of 0 or 50 nmol/L BAPTA-AM after 6 h treatment. Results are expressed as percentage of control (untreated cell). Means \pm SD are presented for 6 replicates. Columns with different letters denote significant difference ($p \leq 0.05$) from each other.

Figure 7: Effects of 30 $\mu\text{mol/L}$ GAE fermented blueberry juice, chlorogenic acid, and gallic acid on ^3H -deoxyglucose uptake in C2C12 cells, in the presence of 0 or 100 nmol/L insulin, after 6 h treatment. Results are expressed as percentage of control (untreated cell). Means \pm SD are presented for 6 replicates. Columns with different letters denote significant difference ($p \leq 0.05$) from each other.

Figure 1 :

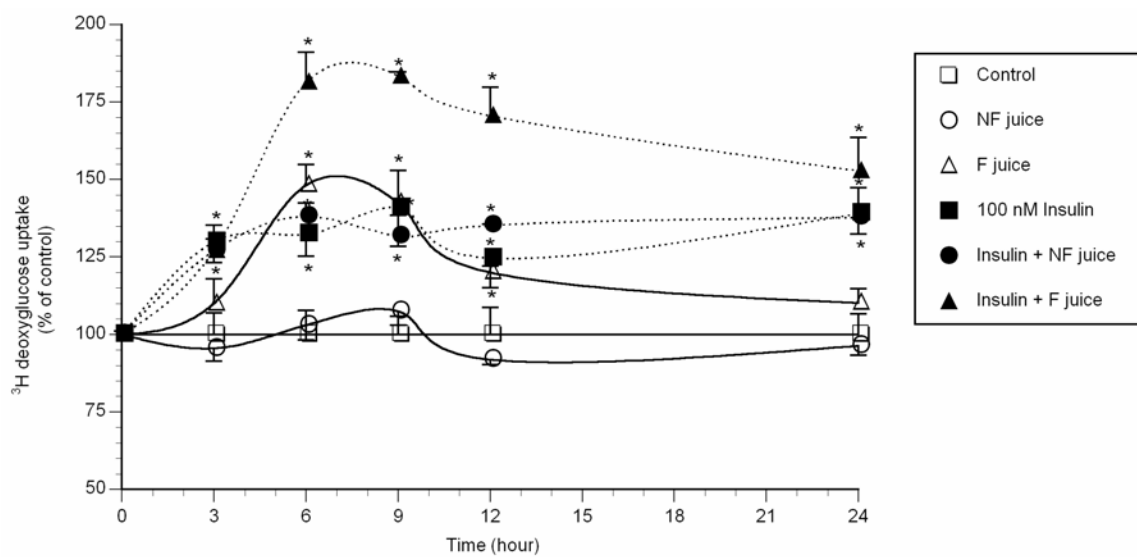


Figure 2 :

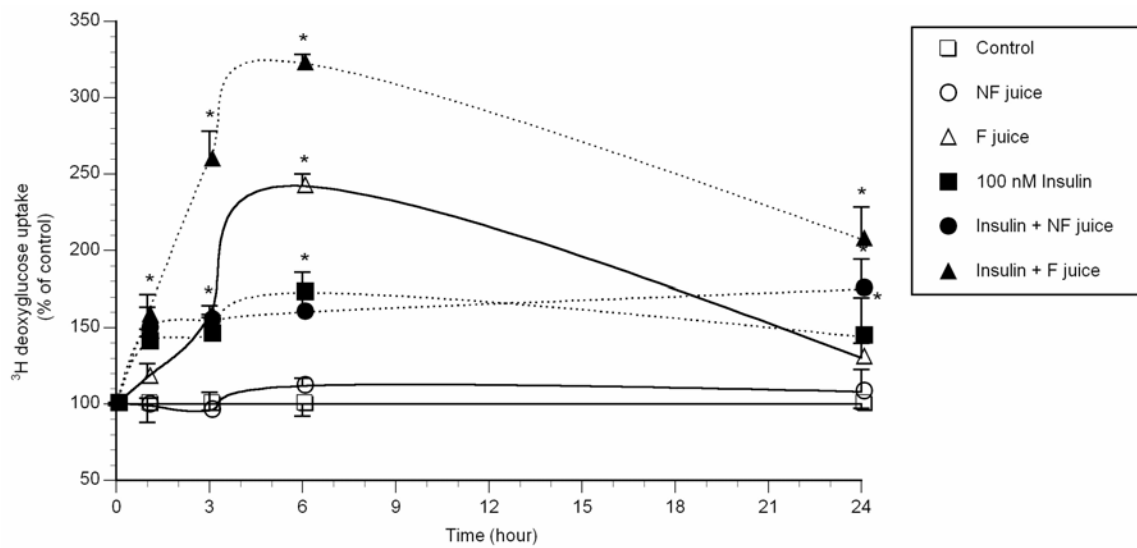


Figure 3

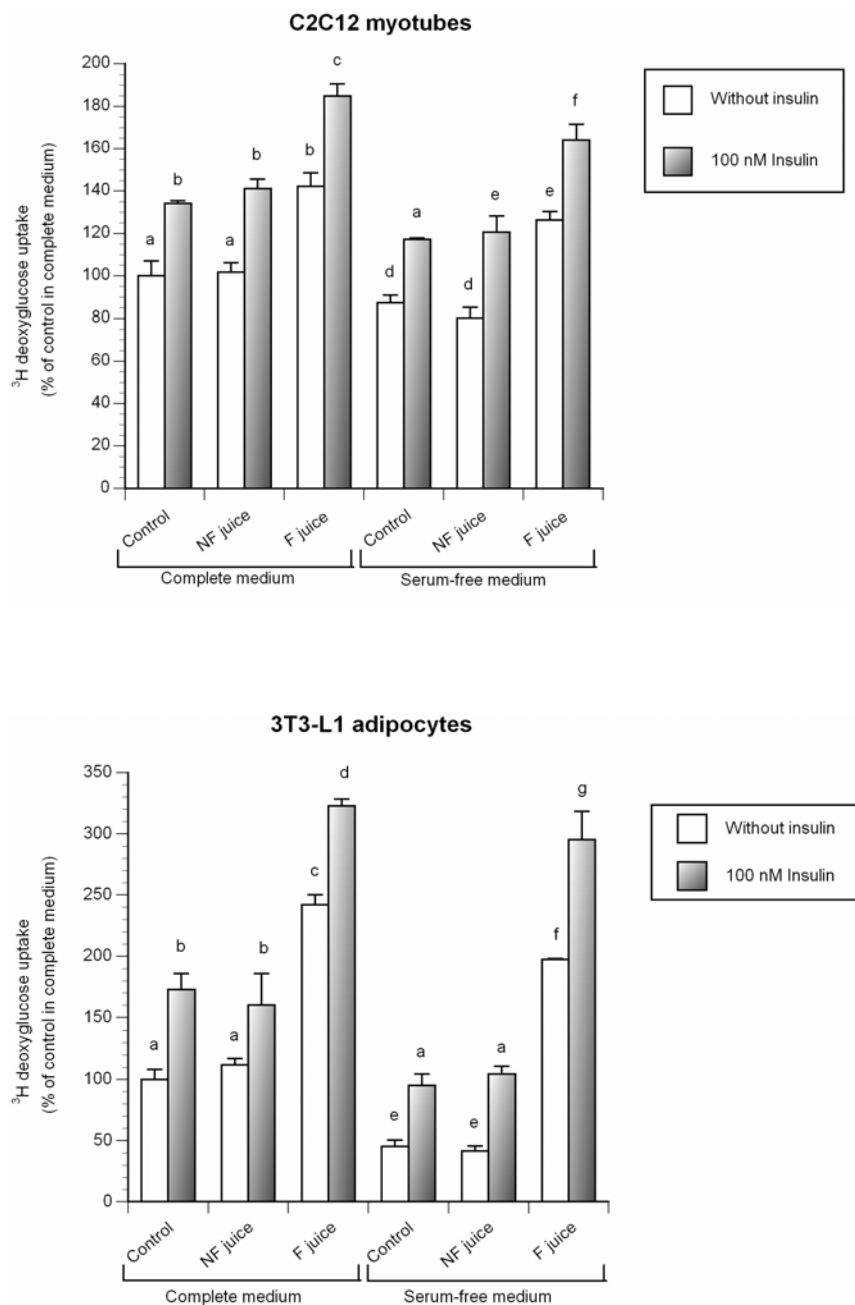


Figure 4

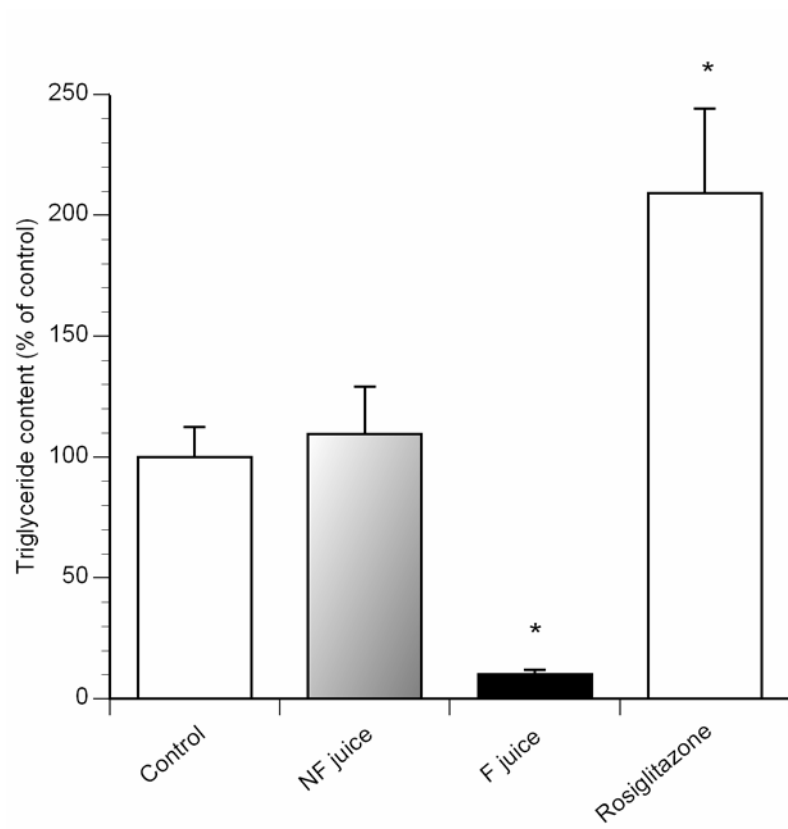


Figure 5

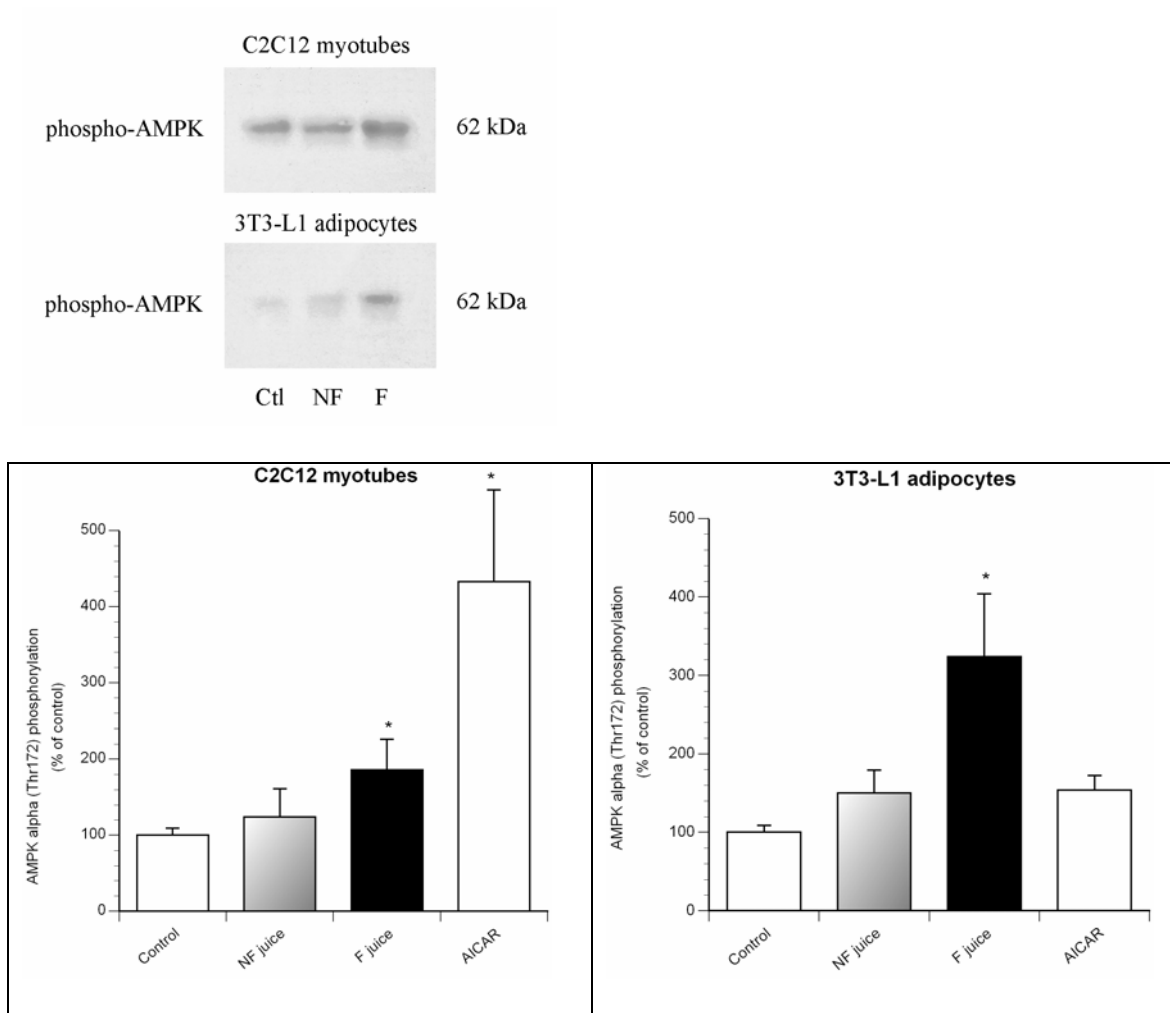


Figure 6

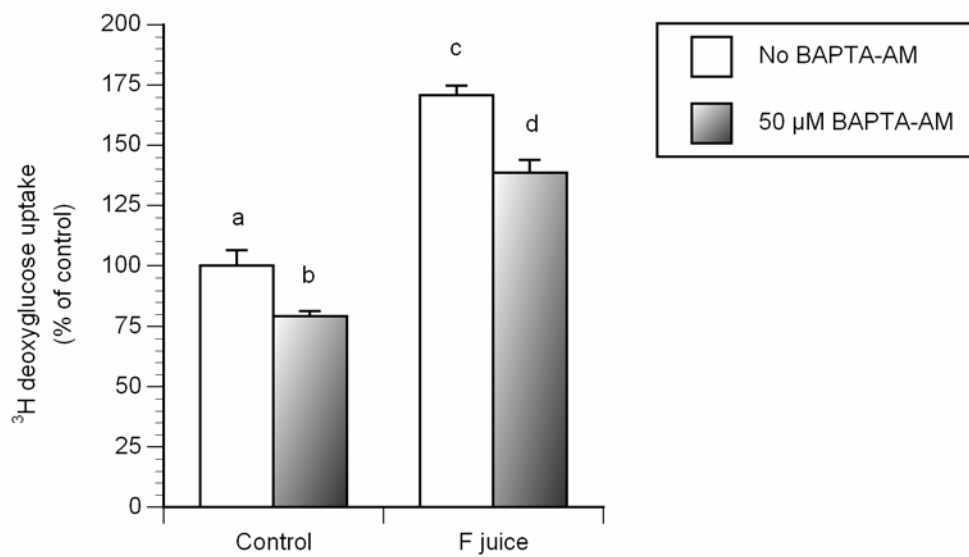
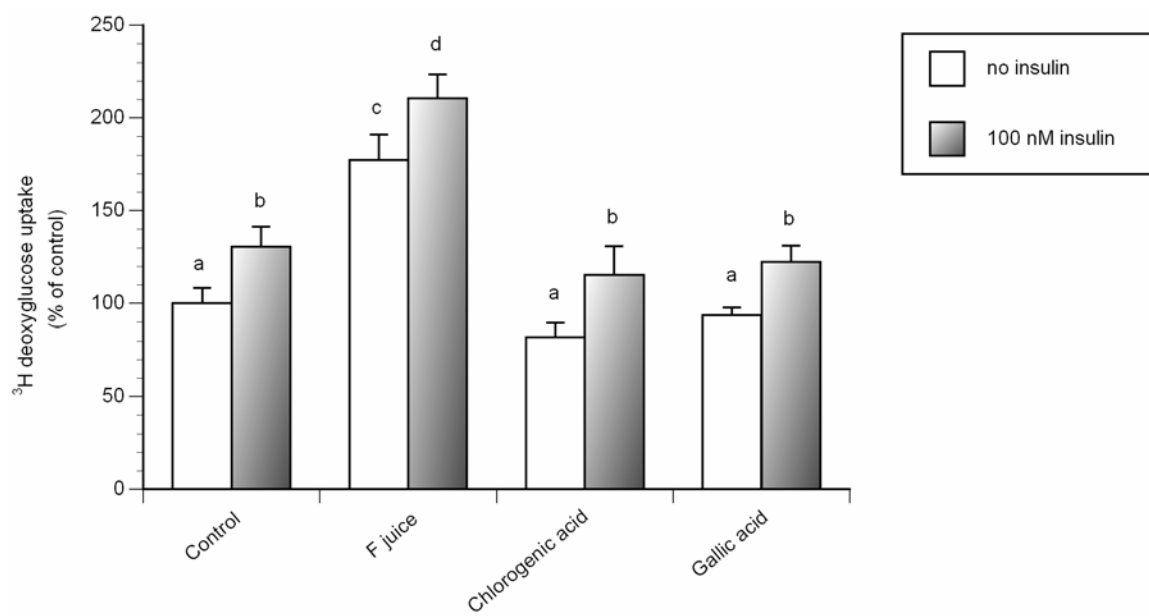


Figure 7

Chapitre 4

**Anti-hyperglycemic effect of biotransformed blueberry juice
in diabetic KKA^y mice.**

Role de chaque co-auteur dans cet article

Cet article a été accepté pour publication à la revue “*International Journal of Obesity*”. Les travaux expérimentaux, l’analyse des données et la rédaction de l’article ont été effectués par Tri Vuong. Ali Benhaddou-Andaloussi, Antoine Brault, Despina Harbilas, Louis C. Martineau et Diane Vallerand ont contribué dans la mise au point du modèle animal. Dr. Pierre S. Haddad est mon directeur de recherche. Dre. Chantal Matar est ma co-directrice de recherche. Dr. Charles Ramassamy est mon co-directeur de recherche.

Title

Anti-hyperglycemic effect of biotransformed blueberry juice in diabetic KKA^y mice

Authors

Tri Vuong^{1,2}, Ali Benhaddou-Andaloussi^{1,2}, Antoine Brault^{1,2}, Despina Harbilas^{1,2}, Louis C. Martineau^{1,2}, Diane Vallerand^{1,2}, Charles Ramassamy^{2,3}, Chantal Matar^{2,4}, Pierre S. Haddad^{1,2}

Affiliation

¹Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada;

²Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels, Université Laval, Québec City, QC, Canada.

³Institut Armand-Frappier, Institut National de Recherche Scientifique, Laval, QC, Canada.

⁴Department of chemistry and biochemistry, Université de Moncton, Moncton, NB, Canada.

Address for correspondence

Pierre S. Haddad, PhD.

Department of Pharmacology

Université de Montréal

P.O. Box 6128, Downtown Station

Montréal, Québec, Canada

H3C 3J7

Email: pierre.haddad@umontreal.ca

Phone: 514-343-6590

Fax: 514-343-2291

Abstract

Aim: Biotransformation of blueberry juice by the *Serratia vaccinii* bacterium gave rise to enhanced AMP-activated protein kinase phosphorylation and glucose uptake in muscle cells and adipocytes (Vuong et al., 2007). The present study investigated the anti-hyperglycemic potential of biotransformed blueberry juice (BJ) in KKA^y mice, a Type II diabetes animal model.

Methods: BJ was administered by intragastric gavage (5ml/kg – acute study) or incorporated in drinking water for 4 weeks in diabetic KKA^y mice (80ml/kg/day – chronic study) or 3 weeks in pre-diabetic young KKA^y mice (40ml/kg/day – preventive study). Parameters of diabetes control, plasma insulin, leptin, adiponectin was measured. Before and after therapy, animals were subjected to an oral glucose tolerance test. At the end of treatment, liver, muscle, kidney, epididymal fat pad, abdominal fat pad and dorsal fat pad were collected and weighed.

Results: Acute administration of BJ reduced glycemia by 27% while chronic administration reduced glycemia in a sustained manner by 35% in KKA^y mice as compared to control animals. BJ also improved glucose tolerance in diabetic mice. Chronic BJ administration reduced food intake and body weight. This effect could not fully explain the associated anti-hyperglycemic effect since BJ-treated mice still showed lower blood glucose level when compared to pair-fed controls. The adipokines pathway also appears to be involved since BJ significantly increased adiponectin levels in diabetic mice. Incorporating BJ in drinking water protected pre-diabetic KKA^y mice

from hyperphagia and reduced their weight gain. Moreover, BJ protected young KKA^y mice against the development of diabetes mellitus.

Conclusions: This study demonstrates that BJ decreases hyperglycemia in diabetic mice, by a mechanism that may involve reversing adiponectin levels. BJ also protects young pre-diabetic mice from developing obesity and diabetes. Thus, biotransformed blueberry juice may represent a promising approach for the prevention and treatment of diabetes mellitus and a source of novel therapeutic agents against this disease.

Keywords

Vaccinium angustifolium, *Serratia vaccinii*, KKA^y mice, blueberry juice, adiponectin, diabetes, obesity.

Résumé

Objectifs : La biotransformation du jus de bleuet par les bactéries *Serratia vaccinii* augmente la phosphorylation de l'AMPK et la capture de glucose dans les cellules musculaires et adipeuses (Vuong et al., 2007). Le présent travail étudie le potentiel anti-hyperglycémique du jus de bleuet biotransformé (BJ) chez les souris KKA^y, un modèle animal du diabète de type II.

Méthodes : BJ est administré par gavage (5ml/kg – étude aiguë) ou incorporé dans l'eau pendant 4 semaines chez les souris KKA^y (80ml/kg/day – étude chronique) ou 3 semaines chez les jeunes souris prédiabétiques KKA^y (40ml/kg/day – étude préventive). Les paramètres de contrôle du diabète, l'insuline, l'adiponectine, la leptine plasmatique, sont mesurés. Avant et après le traitement, les animaux ont passé un test de tolérance au glucose oral. À la fin de l'étude, le foie, le muscle, les reins, le gras épидидymal, abdominal et dorsal sont prélevés et pesés.

Résultats : L'administration aiguë du BJ réduit la glycémie de 27% tandis que l'administration chronique diminue la glycémie d'une manière soutenue de 35% comparé aux animaux témoins. Le BJ améliore aussi la tolérance au glucose chez les souris diabétiques. L'administration chronique du BJ réduit la consommation de nourriture et le poids corporel. Cet effet ne peut pas expliquer l'effet anti-hyperglycémique parce que les souris traitées avec le BJ démontrent une glycémie plus basse que celle des animaux dans le groupe de contrôle "pair-fed". La voie des adipokines pourrait être impliquée puisque le BJ augmente significativement l'adiponectinémie chez les animaux diabétiques. L'incorporation du BJ dans l'eau de boisson protège des jeunes souris

KKA^y prédiabétiques contre l'hyperphagie et réduit leur gain de poids. De plus, le BJ protège les jeunes souris KKA^y contre le développement du diabète.

Conclusions : Cette étude démontre que le BJ diminue l'état hyperglycémique chez les souris diabétiques, probablement par l'amélioration d'adiponectinémie. Le BJ protège aussi les jeunes souris prédiabétiques contre le développement de l'obésité et du diabète. Ainsi, le jus de bleuet biotransformé pourrait représenter une approche prometteuse pour la prévention et le traitement du diabète et une nouvelle source des agents thérapeutiques contre cette maladie.

Introduction

Obesity and diabetes have reached epidemic proportions throughout the world [1]. Adipose tissue is now recognized as an endocrine organ that contributes to the pathophysiology of type 2 diabetes. Adipokines, proteins produced by adipose tissue, have been identified as potential contributors to insulin resistance in humans [2]. Adiponectin is produced by differentiated adipocytes and circulates at high levels in the bloodstream [3]. Low levels of circulating adiponectin are associated with insulin resistance and the presence of metabolic syndrome [4, 5]. Increasing adiponectin expression may be integral to the therapeutic effect of anti-diabetic medications such as PPAR γ agonists (Thiazolidinediones) [6, 7] or CB1 blocker (Rimonabant) [8, 9]. The best-characterized molecular mechanism mediating the metabolic and vascular actions of adiponectin involved stimulation of AMP kinase (AMPK) activity [10].

Members of the genus *Vaccinium* have been used traditionally for the treatment of diabetic symptoms and are hence reputed to be antidiabetic [11-13]. Extracts of various parts of the *V. angustifolium* plant were shown to possess insulin- and glitazone-like properties while also protecting cells against glucose toxicity [14]. The blueberry fruit is rich in phenolic compounds such as hydroxycinnamic acids, flavonoids and proanthocyanidines [15-17]. Biotransformation of blueberry juice with a novel strain of bacteria isolated from the blueberry flora and named *Serratia vaccinii*, increases its phenolic content and antioxidant activity [18] and modifies its biological activity [14]. Biotransformed juice (BJ) increased AMP-activated protein kinase phosphorylation and glucose uptake in muscle cells and adipocytes [19]. Since BJ showed potential anti-

diabetic activities *in vitro*, the aim of this study was to assess the anti-diabetic potential of BJ *in vivo*.

KKA^y mice are a cross between glucose-intolerant black KK female mice and yellow obese A^y male mice. They are characterized by hyperphagia due to leptin resistance. Their phenotype is characterized by obesity and the development of hyperleptinemia, insulin resistance, hyperinsulinemia, diabetes, dyslipidemia and hypertension. Therefore, KKA^y mice are an excellent model that closely resembles obesity-linked type 2 diabetes in humans who express several disorders within a single individual [20]. This model was thus selected to evaluate the *in vivo* antidiabetic activity of BJ.

Materials and methods

Preparation of biotransformed blueberry juice

Mature lowbush blueberries (*Vaccinium angustifolium* Ait.) were purchased from Cherryfield Foods Inc. (Cherryfield, Maine, USA) as fresh and untreated fruits. Blueberry juice was extracted by blending the fruit (100g) with an equivalent quantity (100g) of Minimal Broth Davis without dextrose (MM) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). The fruit mixture was then centrifuged to remove insoluble particles. The resulting juice was sterilized using 0.22 μm Express Millipore filters (Millipore, Etobicoke, Ontario, Canada).

Serratia vaccinii bacteria were cultured as previously described [18]. The juice was inoculated with a saturated culture of *Serratia* corresponding to 2% of the total juice volume. After a four day fermentation period, the transformed juice was sterilized by 0.22 μm filtration. Blueberry and biotransformed blueberry juice have been partially characterized elsewhere [17, 18, 21]

Blueberry juice contains low yet known amounts of sugars (7.9% w/w). Therefore, we prepared a sugar water (SW) solution that mimicked the sugar composition of normal blueberry juice (NJ) [22] and therefore contained : 100g of MM, 85.6g of water, 3.1g of Glucose, 4.1g of Fructose, 0.5g of Maltose and 0.4g of Sucrose. We specifically used this solution as a vehicle control in pair-feeding experiments (see further below).

Animals

Male non-diabetic C57BL/6 mice were obtained from Charles River Laboratories (Saint-Constant, QC, Canada). KKA^y mice were derived from an in-house colony established using breeding pairs obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, US). All mice were housed individually and maintained on a 12h light-dark cycle in a temperature-controlled animal room. All animals were allowed *ad libitum* access to solid food and water. All experimental protocols were approved by the animal experimentation ethics committee of the Université de Montréal and we carried out in full respect of the guidelines from the Canadian Council for the Protection of Animals.

Acute study

Fifteen 6-7 week-old KKA^y mice were randomly divided into 3 groups (n=5) that received 5 ml/kg of either water or biotransformed blueberry juice (BJ) by intragastric gavage. Metformin (0.283g/kg) was administered similarly as a positive control; this concentration was selected from a dose-effect curve [23]. The non-fasting blood glucose concentration was measured using an Accu-Chek glucose meter (Roche, Montreal, QC, Canada) at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 h after the juices were administered by collecting blood from the tip of the tail vein. In preliminary experiments, it was found that the period of fasting required to obtain fasting glycemia had a profound impact on KKA^y mice which prevented the maintenance of a steady state in the diabetic model. We therefore measured non-fasting blood glucose but were strict in measuring blood glucose at a fixed time of the day throughout the experimental protocols (detailed below).

Chronic treatment study

In preliminary experiments, three different doses of BJ, namely 20, 40, 80 ml/kg/day, were incorporated in the drinking water and provided to mice for one week. The best anti-hyperglycemic effect was obtained with the 80ml/kg/day dose (data not show). Therefore, this dose was used for chronic treatment studies. Forty-two 6-7 week-old KKA^y mice were thus randomly divided into 6 groups (n=7) which received either water, normal blueberry juice (NJ) (80ml/kg/day), biotransformed blueberry juice (BJ) (80ml/kg/day), or Metformin (0.85g/kg/day) [23] in drinking water. Each mouse in the BJ group had a matched “twin” which constituted the paired-fed KKA^y group (BJ’); animals in this group received sugar water (SW) (80ml/kg/day – to control for the sugar intake associated with BJ) and the amount of food consumed by their BJ “twin” the previous day. The sixth and final group received SW but had unrestricted access to solid food. Baseline measurements of fed blood glucose levels, body weight, food intake and water consumption were taken daily at 11.00 a.m. At the onset of experiments and after 4 weeks, an oral glucose tolerance test (OGTT) was performed (see further below).

Preventive study

Four-week-old C57BL/6 and KKA^y mice were randomly divided into 4 groups. The C57BL/6 mice constituted the non-diabetic control group (n=10). Three KKA^y mice groups (n=10) received either water (diabetic control group), normal blueberry juice (NJ) or biotransformed blueberry juice (BJ) (40 ml/kg/day in drinking water). The dose was halved relative to the treatment group because it was felt that lower amounts of blueberry juice should be sufficient during the development of obesity and diabetes than once these states have been established; it was nonetheless planned that the dose could

be increased if necessary. Baseline measurements of fed blood glucose levels, body weight, food intake and water consumption were taken every two days at 11 am. At the onset of experiments and after 2 weeks, an oral glucose tolerance test (OGTT) was performed (see further below). After the third week, the mice were anaesthetized, sacrificed by exsanguination, and organs such as the liver, muscle (right femoral muscle), kidney, epididymal fat pad, abdominal fat pad and dorsal fat pad were immediately removed and weighed.

Oral glucose tolerance test (OGTT)

Mice were fasted for 16h. A glucose solution was administered by intragastric gavage at a dose of 1g/kg body weight. The blood glucose concentration was measured at 0, 30, 60, 90, 120 min after glucose administration in the blood collected from the tip of the tail vein, using an Accu-Chek glucose meter (Roche, Montreal, QC, Canada).

Biochemical assays

At the end of experiments, blood samples were collected from renal artery during exsanguinations carried out under anesthesia using heparinized tools. The samples were centrifuged at 3000 g for 10 min at 4⁰C. The plasma samples were used for the analyses of biochemical parameters. Plasma adiponectin, insulin and leptin were measured using radio immuno assay (RIA) kits (Millipore, Montreal, QC, Canada).

Statistical analysis

Statistical analysis of the data by one-way or two-way ANOVA (as appropriate) as well as Fisher post-hoc tests were performed using StatView software (Cary, NC, USA). Statistical significance was set at $p < 0.05$. Data are reported as mean \pm SEM.

Results

BJ acute effect

Administration of a single dose of BJ (5 ml/kg) caused a decline in blood glucose that reached the lowest value three hours after the onset of administration and only slowly returned to the initial state thereafter over a 24h period (Figure 1). The maximum effect amounted to a decrease of blood glucose by 27% as compared to controls. Metformin (0.283g/kg) administration yielded similar results.

Chronic anti-hyperglycemic effect

As illustrated in Figure 2 (Panel A), when administered chronically over a 4-week period, normal blueberry juice (NJ) did not significantly influence blood glucose in diabetic KKA^y mice, which oscillated in the 25 to 30 mM range as in control animals. In contrast, the positive control Metformin significantly reduced then maintained the glycemia of diabetic KKA^y mice at a normal level (10mM in the fed state) within 4 days. BJ gradually and significantly reduced the high blood glucose level of diabetic mice and the maximum effect was reached after 3 days. BJ then maintained KKA^y mice glycemia level at a level 35% lower than that of control animals until the end of the study.

Moreover, both BJ and Metformin improved glucose tolerance in these diabetic mice. Indeed, the glycemic response to an OGTT, assessed by the area under the glycemia-versus-time curve (AUC), dropped by 38% between the onset and the end of the 4-week treatment in both groups (Figure 3, $p < 0.05$ by two-way ANOVA), suggesting an improvement in insulin sensitivity. In comparison, control and NJ-treated animals had similar responses to an OGTT at weeks 0 and 4 (N.S. by two-way ANOVA). The positive impact of Metformin on insulin sensitivity was reflected in plasma insulin levels that were normalized by the end of the 4-week treatment as compared to the hyperinsulinemic values of controls (Table 1, $p < 0.05$ by ANOVA). Chronic BJ treatment also had a tendency to reduce circulating insulin levels by nearly 50%, but this effect failed to reach statistical significance.

Table 1 also presents plasma leptin and adiponectin values in all experimental groups. None of the treatments was able to affect the expected hyperleptinemia observed in KKA^y mice. However, whereas neither NJ nor Metformin treatments could modify the low level of adiponectin measured in KKA^y mice, animals consuming BJ over a 4-week period showed a significant increase in circulating adiponectin level, which amounted to a 65% rise above values of control animals (Table 1; $p < 0.05$).

Whereas NJ and control mice consumed similar amounts of solid food, both Metformin- and BJ-treated groups exhibited a significant anorexic effect. Indeed, the food intake of Metformin- and BJ-treated mice was significantly reduced by 30% and 17% respectively as compared to controls (Figure 4). However, only Metformin-treated mice showed a slight but significant body weight loss, which amounted to 4% by the end of the 4-week

treatment period, as compared to controls, whereas no significant difference was observed in BJ-treated mice (Figure 5A).

Pair-feeding effect

In order to control for the effect of BJ on food intake, pair-feeding studies were carried out in parallel with BJ treatment. Moreover, to control for the slight sugar content of NJ, SW, having the same composition of sugars and diluted in MM as was done for normal blueberry juice, was used as a vehicle control. Restricting food intake to the amount consumed by BJ-treated animals (BJ' group) did not have any significantly effect on the body weight of KKA^y mice (Figure 5B). Similarly, supplying SW in drinking water without pair-feeding did not significantly alter body weight. In contrast, pair-feeding reduced the glycemia of diabetic mice by 13% by the end of the 4-week treatment period as compared to SW- or water-fed controls (Figure 2B). This antihyperglycemic effect was roughly half as important as observed in the BJ-treated group. Despite the reduction in glycemia induced by pair-feeding, such treatment failed to improve the response to an OGTT as observed in BJ-treated animals (Figure 3). Similarly, pair-feeding failed to increase circulating adiponectin levels in contrast to BJ treatment (Table 1).

Preventive effect

Figure 6 presents the distribution of blood glucose values for groups treated with NJ or BJ during the crucial 3-week period where the development of diabetic hyperglycemia is observed in KKA^y mice in our laboratory (4 to 7 weeks of age). As expected, all groups (except the non-diabetic C57/BL6 mice) had equivalent glycemia at the onset of the studies. After 3 weeks, all animals in the diabetic control group and in the NJ-treated

group had a non-fasting glycemia at or above 20 mM (averages of 25.9 ± 4.7 and 24.9 ± 3.8 mM, respectively, NS). In contrast, only 20% of mice in the BJ group exhibited such hyperglycemia (average of 13.9 ± 5.3 mM, $p < 0.05$). As expected, the glycemia of non-diabetic mice remained stable over time. Moreover, the glyceamic response to an OGTT was found to be significantly lower in BJ-treated mice as compared to control or NJ-treated mice (reduction of 24% in AUC of BJ group compared to control, $p < 0.05$ – Figure 7). As observed in the treatment studies described above, BJ treatment significantly reduced the cumulative food intake of KKA^y mice as compared to parallel control diabetic or NJ-treated groups (Figure 8A) and hence also reduced the cumulative body weight gain (Figure 8B). Correspondingly, the weight of abdominal fat pads and the relative liver weight were significantly lower in BJ-treated mice as compared to control animals, whereas NJ-treated mice exhibited values very similar to control mice (Table 2). In contrast, BJ preventive treatment failed to affect plasma insulin, leptin or adiponectin values.

Discussion

In previous recent studies, biotransformed blueberry juice (BJ) was found to increase glucose uptake in muscle cells and adipocytes. We therefore conducted the current study to confirm its *in vivo* anti-hyperglycemic potential in KKA^y mice, a model of type 2 diabetes. The results convincingly show that BJ as apposed to NJ indeed holds great promise as an anti-diabetic agent. When administered acutely at a single oral dose of 5ml/kg, BJ was essentially as powerful as Metformin to reduce hyperglycemia in diabetic KKA^y mice. In contrast, when given in a chronic manner at a dose of 80 ml/kg,

BJ also significantly reduced glycemia in these diabetic mice, but the effect was roughly half as powerful as the oral hypoglycemic drug Metformin.

Part of the metabolic effects of chronic BJ treatment could be attributed to the significant anorexic effect it exerted, despite the fact that this effect failed to induce a change in body weight. Indeed, glycemia was also lowered in pair-fed BJ' animals, but the intensity of the effect was significantly lower than that of BJ, indicating that other factors additional to reduced caloric intake were necessarily involved. Similarly, the normalization of insulin sensitivity induced by chronic BJ treatment, as assessed by the AUC of the glycemic response to an OGTT, was not due to the simple slight caloric restriction associated with the reduction of food intake since BJ' animals failed to show this effect. Likewise, BJ but not BJ' treatment was able to significantly increase the low circulating levels of adiponectin observed in diabetic KKA^y mice.

In fact, the reversal of low circulating levels of adiponectin provides, at least in part, an explanation for the correction of insulin resistance by BJ in the diabetic mice. The same mechanism has indeed been observed with PPAR γ agonists (Thiazolidinediones) [6, 7] and CB1 receptor antagonists (Rimonabant) [8, 9]. Adiponectin normally enhances lipid catabolism, leading to reduced tissue triglyceride content and improved insulin sensitivity [24]. It also reduces hepatic glucose production [25]. AMPK has been confirmed to be a major downstream component of adiponectin signalling [10]. These published data are consistent with our previous observations that BJ stimulated AMPK in muscle cells and adipocytes [19]. Further studies will be necessary to unravel the possible causal relationship of these observations.

The mechanism by which adiponectin was increased by BJ is unclear. Adiponectin production by adipocytes is a multistep process that can be regulated at the level of gene expression, secretion and/or formation of the multimeric forms of the protein. The molecular mechanisms involved in adiponectin secretion and multimerization as well as their regulation have not been deciphered [10]. However, it is clear that reactive-oxygen species (ROS) [26] and pro-inflammatory cytokines [27] are potent inhibitors of adiponectin gene expression. Since BJ has a very high anti-oxidant activity, more than 4 times greater than NJ [18, 28], it could reduce oxidative stress in obese diabetic mice. This, in turn could contribute to increasing adiponectin release by adipose tissue. Further studies are needed to address the involvement of antioxidant activity, adiponectin content and AMPK stimulation in the *in vivo* metabolic effects of biotransformed juice.

KKA^y mice represent a model that closely resembles obesity-linked type 2 diabetes in humans. In our hands, between 4 and 7 weeks of age, KKA^y mice develop hyperphagia, hyperleptinemia, hypo-adiponectinemia, hyperinsulinemia, hyperglycemia and reduced glucose tolerance as compared to non-diabetic control C57BL/6 mice. We therefore further assessed the preventive potential of BJ by administering it chronically during this crucial life period of KKA^y mice. Such administration was found to prevent the development of diabetes mellitus. Indeed, only 20% of mice reached the diabetic levels of glycemia, as compared to 100% of control or NJ-fed animals. Moreover, BJ significantly reduced hyperphagia and, consequently, the development of obesity as seen by a significantly reduced cumulative body weight gain. In parallel, the relative liver weight and abdominal fat pad weight were significantly lower than those of control

animals. Both increased visceral fat and steatotic liver (a probable cause of increased relative liver weight in this model – unpublished observation) have been implicated in the development of insulin resistance in the context of obesity [29-31]. It was thus not surprising that the response to an OGTT was reduced by preventive BJ administration, as seen in the treatment study, indicating an improved glucose tolerance possibly related to enhanced insulin sensitivity. In contrast, it was less expected that BJ could not prevent the increased insulinemia or reduced adiponectinemia that develops during this 3-week crucial period in KKA^y mice. Future experiments should attempt to detail the mechanisms underlying the beneficial effects of BJ to prevent the development of obesity and diabetes.

Nonetheless, anthocyanins present in abundance in blueberry fruits may have been implicated. Indeed, feeding purified anthocyanins from blueberries has been shown to reduce obesity in mice [32]. However, feeding similar amounts of anthocyanins as whole blueberries did not prevent and may have actually increased obesity [32]. These results are consistent with the lack of beneficial effects of NJ in the present studies. In contrast, the process of preparing BJ greatly increases the content in total phenolic compounds and this was associated with greatly enhanced biological activity to treat obesity and related diabetes, as well as to protect pre-diabetic mice from the same. It thus appears worthwhile and imperative to explore the novel compounds and /or the changes in the content of known phenolics induced by the fermentation of NJ with *Serratia vaccinii* and to test their effectiveness as anti-obesity and anti-hyperglycemic agents.

In summary, the results of the present study clearly demonstrate that biotransformed blueberry juice has strong anti-diabetic potential. BJ protected young pre-diabetic mice against obesity and diabetes. It potently reduced the high glucose blood level in adult diabetic mice. The mechanism of action might involve the reversal of low circulating levels of adiponectin in obese and diabetic animals. Although the active principles and their precise mechanisms of action remain to be identified, biotransformed blueberry juice may represent a novel complementary therapy against diabetes mellitus. Moreover, the identification of active compounds in BJ may result in the discovery of promising new anti-diabetic molecules.

References

1. James PT: Obesity: the worldwide epidemic. *Clin Dermatol* 2004; **22**: 276-280.
2. de Ferranti S, Mozaffarian D: The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* 2008; **54**: 945-955.
3. Kershaw EE, Flier JS: Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 2548-2556.
4. Mojiminiyi OA, Abdella NA, Al Arouj M, Ben Nakhi A: Adiponectin, insulin resistance and clinical expression of the metabolic syndrome in patients with Type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)* 2007; **31**: 213-220.
5. Hivert MF, Sullivan LM, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW, Meigs JB: Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor-alpha with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**: 3165-3172.
6. Yang B, Brown KK, Chen L, Carrick KM, Clifton LG, McNulty JA, Winegar DA, Strum JC, Stimpson SA, Pahl GL: Serum adiponectin as a biomarker for in vivo PPARgamma activation and PPARgamma agonist-induced efficacy on insulin sensitization/lipid lowering in rats. *BMC Pharmacol* 2004; **4**: 23.
7. Katsuda Y, Asano A, Murase Y, Chujo D, Yagi K, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M: Association of genetic variation of the adiponectin gene with body fat distribution and carotid atherosclerosis in Japanese obese subjects. *J Atheroscler Thromb* 2007; **14**: 19-26.
8. Van Gaal LF, Scheen AJ, Rissanen AM, Rossner S, Hanotin C, Ziegler O: Long-term effect of CB1 blockade with rimonabant on cardiometabolic risk factors: two year results from the RIO-Europe Study. *Eur Heart J* 2008; **29**: 1761-1771.
9. Scheen AJ, Van Gaal LF: Rimonabant as an adjunct therapy in overweight/obese patients with type 2 diabetes. *Eur Heart J* 2007; **28**: 1401-1402; author reply 1402.
10. Guerre-Millo M: Adiponectin: an update. *Diabetes Metab* 2008; **34**: 12-18.
11. Chambers BK, Camire ME: Can cranberry supplementation benefit adults with type 2 diabetes? *Diabetes Care* 2003; **26**: 2695-2696.

12. Jellin J, Gregory P, Batz F, Hitchens K: Natural Medicines Comprehensive Database. ed. Pharmacist's Letter/Prescriber's Letter. pp. 2239. Stockton, CA: Therapeutic Research Faculty. 2005.
13. Haddad PS, Depot M, Settaf A, Chabli A, Cherrah Y: Comparative study on the Medicinal Plants. Most recommended by traditional practitioners in Morocco and Canada. J. Herbs, Spices and Medicinal Plants 2003; **10**: 25-45.
14. Martineau LC, Couture A, Spoor D, Benhaddou-Andaloussi A, Harris C, Meddah B, Leduc C, Burt A, Vuong T, Mai Le P, Prentki M, Bennett SA, Arnason JT, Haddad PS: Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. Phytomedicine 2006; **13**: 612-623.
15. Kahkonen MP, Hopia AI, Heinonen M: Berry phenolics and their antioxidant activity. J Agric Food Chem 2001; **49**: 4076-4082.
16. Yi W, Akoh C., , Fischer J, Krewer G: Effects of phenolic compounds in blueberries and muscadine grapes on HepG2 cell viability and apoptosis. Food Research International 2006; **39**: 628-638.
17. Matchett MD, MacKinnon SL, Sweeney MI, Gottschall-Pass KT, Hurta RA: Inhibition of matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells by flavonoids from lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*): possible roles for protein kinase C and mitogen-activated protein-kinase-mediated events. J Nutr Biochem 2006; **17**: 117-125.
18. Martin L, Matar C: Increase of antioxidant capacity of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) during fermentation by a novel bacterium from the fruit microflora. J Sci Food Agri 2005; **85**: 1477-1484.
19. Vuong T, Martineau LC, Ramassamy C, Matar C, Haddad PS: Fermented Canadian lowbush blueberry juice stimulates glucose uptake and AMP-activated protein kinase in insulin-sensitive cultured muscle cells and adipocytes. Can J Physiol Pharmacol 2007; **85**: 956-965.
20. Srinivasan K, Ramarao P: Animal models in type 2 diabetes research: an overview. Indian J Med Res 2007; **125**: 451-472.

21. Calkin AC, Allen TJ: Diabetes mellitus-associated atherosclerosis: mechanisms involved and potential for pharmacological intervention. *Am J Cardiovasc Drugs* 2006; **6**: 15-40.
22. C.I. Nindo, J. Tang, J.R. Powers, P. Singh: Viscosity of blueberry and raspberry juices for processing applications. *Journal of Food Engineering* 2005; **69**: 343-350.
23. Meglasson MD, Wilson JM, Yu JH, Robinson DD, Wyse BM, de Souza CJ: Antihyperglycemic action of guanidinoalkanoic acids: 3-guanidinopropionic acid ameliorates hyperglycemia in diabetic KKAY and C57BL6Job/ob mice and increases glucose disappearance in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; **266**: 1454-1462.
24. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 2001; **7**: 941-946.
25. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L: Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001; **108**: 1875-1881.
26. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I: Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; **114**: 1752-1761.
27. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B: Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; **285**: E527-533.
28. Vuong T, Martin L, Matar C: Antioxidant activity of fermented berry juices and their effects on nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in

- macrophage 264.7 gamma NO(-) cell line. *Journal of Food Biochemistry* 2006; **30**: 249-268.
29. Kotronen A, Vehkavaara S, Seppala-Lindroos A, Bergholm R, Yki-Jarvinen H: Effect of liver fat on insulin clearance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; **293**: E1709-1715.
30. Laviola L, Perrini S, Cignarelli A, Natalicchio A, Leonardini A, De Stefano F, Cuscito M, De Fazio M, Memeo V, Neri V, Cignarelli M, Giorgino R, Giorgino F: Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes* 2006; **55**: 952-961.
31. Lazar MA: How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 2005; **307**: 373-375.
32. Prior RL, Wu X, Gu L, Hager TJ, Hager A, Howard LR: Whole berries versus berry anthocyanins: interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity. *J Agric Food Chem* 2008; **56**: 647-653.

Legends to figures

Figure 1: Effect of a single dose of BJ (5ml/kg) and Metformin (MET) (0.283g/kg) on glycemia of diabetic KKA^y mice. All values are means \pm SEM (n = 5).

Figure 2: (A) Glycemia of diabetic KKA^y mice treated with NJ, BJ (80ml/kg/day) and MET (0.85g/kg/day) during 4 weeks. (B) Each mouse in the BJ group had a matched “twin” which constituted the paired-fed group (BJ’); animals in this group received SW (80ml/kg/day – to control for the sugar intake associated with BJ) and the amount of food consumed by their BJ “twin” the previous day. The sixth and final group received SW but had unrestricted access to solid food. All values are means \pm SEM (n = 7).

Figure 3: AUC from OGTT of diabetic KKA^y mice treated with MET (0.85g/kg/day), NJ, BJ (80ml/kg/day) and SW, BJ (80ml/kg/day of SW) after 4 weeks. Results are expressed as % of control at week 0. All values are means \pm SEM (n = 7). *indicates a significant difference (p < 0.05) from control.

Figure 4: Food intake of diabetic KKA^y mice treated with MET (0.85g/kg/day), NJ, BJ (80ml/kg/day) and SW (80ml/kg/day) during 4 weeks. All values are means \pm SEM (n = 7).

Figure 5: (A) Body weight of diabetic KKA^y mice treated with NJ, BJ (80ml/kg/day) and MET (0.85g/kg/day) during 4 weeks. (B) Each mouse in the BJ group had a matched “twin” which constituted the paired-fed group (BJ’); animals in this group received SW (80ml/kg/day – to control for the sugar intake associated with BJ) and the

amount of food consumed by their BJ “twin” the previous day. The sixth and final group received SW but had unrestricted access to solid food. All values are means \pm SEM (n = 7).

Figure 6: Glycemia of young KKA^y and C57BL/6 mice treated with NJ and BJ (80ml/kg/day) at week 0 and week 3. All values are means \pm SEM (n = 10).

Figure 7: AUC from OGTT of KKA^y and C57BL/6 mice treated with NJ and BJ (80ml/kg/day) after 3 weeks. Results are expressed as % of control. All values are means \pm SEM (n = 10). *indicates a significant difference (p < 0.05) from control.

Figure 8: Cumulative food intake (A) and body weight gain (B) of young KKA^y and C57BL/6 mice treated with NJ and BJ (80ml/kg/day) at week 0 and week 3. All values are means \pm SEM (n = 10).

Table 1: Biochemical parameters of KKA^y mice after chronic treatment

Treatment	Insulin (ng/ml)	Adiponectin (μg/ml)	Leptin (ng/ml)
Control	21.9 \pm 6.5 ^a	4.3 \pm 0.4 ^a	29.1 \pm 1.9 ^a
SW	18.7 \pm 5.1 ^a	5.2 \pm 0.4 ^a	30.7 \pm 2.9 ^a
NJ	39.9 \pm 14.8 ^a	5.4 \pm 0.8 ^a	33.2 \pm 4.0 ^a
BJ	12.7 \pm 2.6 ^a	7.9 \pm 0.5 ^b	33.9 \pm 2.7 ^a
BJ'	21.6 \pm 7.4 ^a	5.9 \pm 0.9 ^{ab}	31.3 \pm 2.4 ^a
MET	1.7 \pm 0.5 ^b	5.9 \pm 0.6 ^a	27.6 \pm 2.9 ^a

Means \pm SEM (n = 7); Between-group differences, as determined by ANOVA, are illustrated by different letters (a-b) with significance defined as p<0.05.

Table 2: Physiological and biochemical parameters of mice in preventive study

	Control	NJ	BJ	C57BL/6
Tissue weight (g)				
<i>Liver</i>	2.0 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.1 ^b	1.6 ± 0.1 ^b
<i>Relative liver weight*</i>	0.06 ± 0.001 ^a	0.06 ± 0.001 ^a	0.05 ± 0.002 ^b	0.05 ± 0.001 ^b
<i>Kidney</i>	0.4 ± 0.01 ^a	0.4 ± 0.02 ^a	0.3 ± 0.02 ^a	0.4 ± 0.01 ^a
<i>Epididymal fat pad</i>	1.0 ± 0.04 ^a	1.1 ± 0.06 ^a	0.9 ± 0.06 ^a	0.9 ± 0.05 ^b
<i>Abdominal fat pad</i>	3.2 ± 0.1 ^a	2.8 ± 0.2 ^a	2.2 ± 0.1 ^b	nd
<i>Dorsal fat pad</i>	1.0 ± 0.08 ^a	1.0 ± 0.09 ^a	0.9 ± 0.07 ^a	0.4 ± 0.04 ^b
Biochemical parameters				
<i>Insulin (ng/ml)</i>	13.0 ± 2.4 ^a	12.7 ± 2.0 ^a	12.1 ± 2.0 ^a	1.3 ± 0.1 ^b
<i>Adiponectin (µg/ml)</i>	5.1 ± 0.6 ^a	5.2 ± 0.7 ^a	5.9 ± 0.6 ^a	8.8 ± 0.6 ^b
<i>Leptin (ng/ml)</i>	28.9 ± 2.4 ^a	28.3 ± 2.2 ^a	27.6 ± 1.4 ^a	13.1 ± 2.1 ^b

* *Relative liver weight = liver weight/body weight*

Means ± SEM (n = 10); Between-group differences, as determined by ANOVA, are illustrated by different letters (a-b) with significance defined as p<0.05.

Figure 1

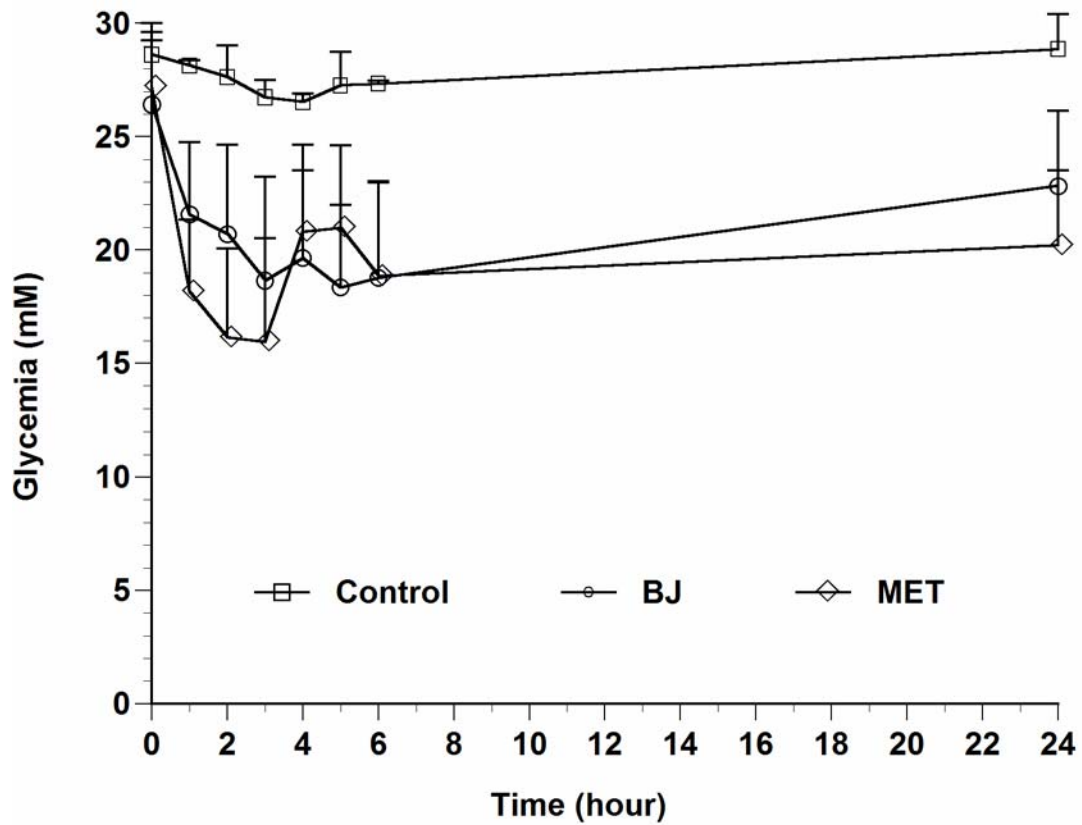


Figure 2A

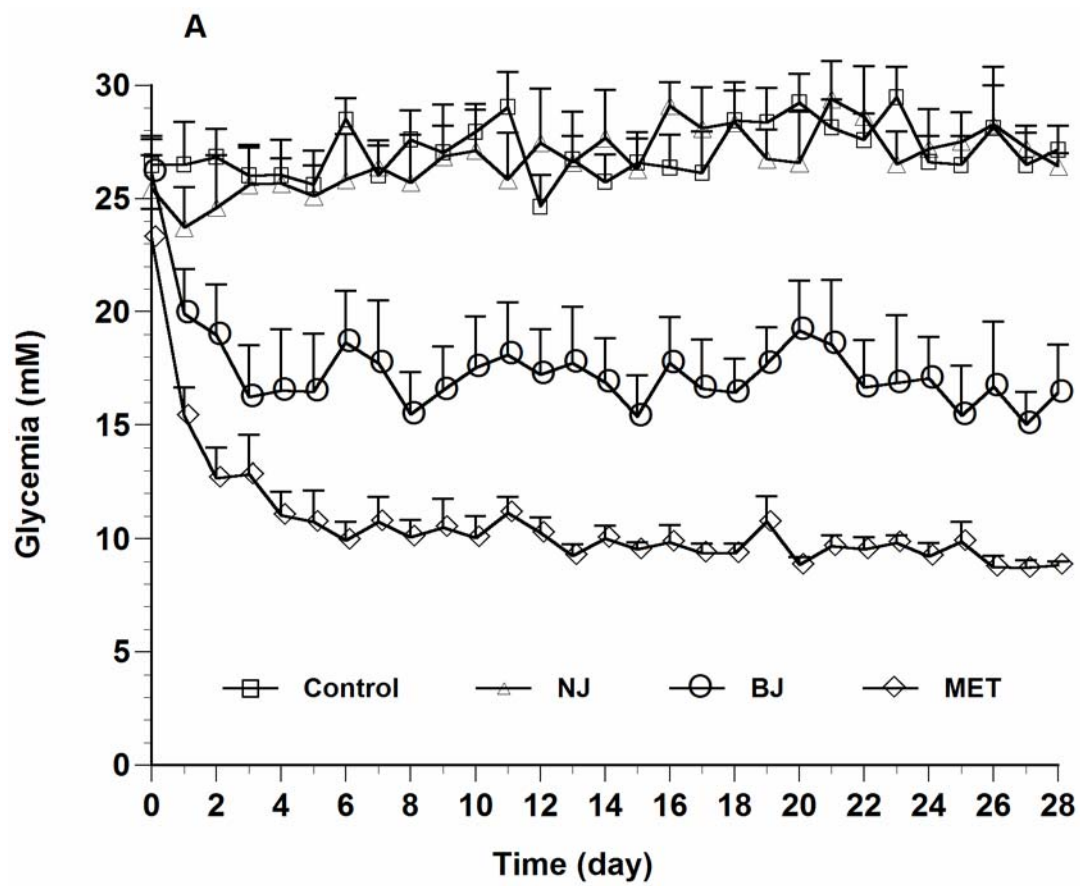


Figure 2B

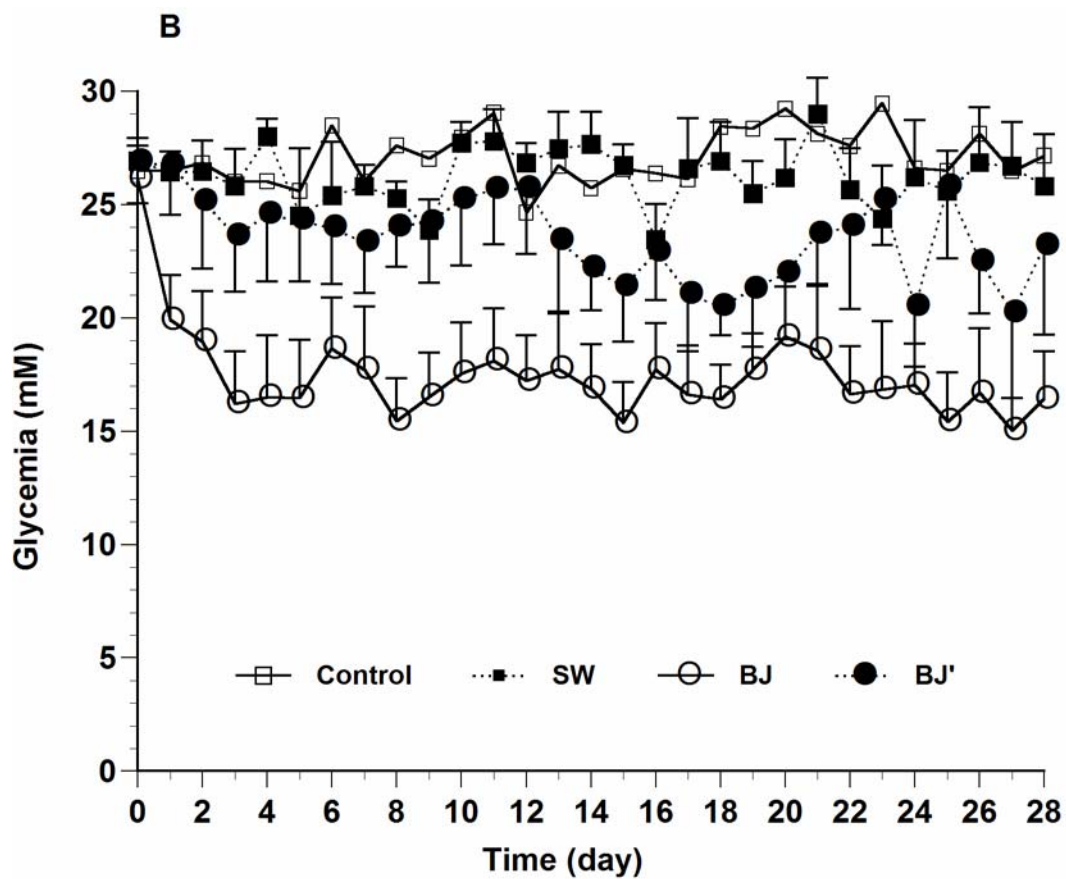


Figure 3

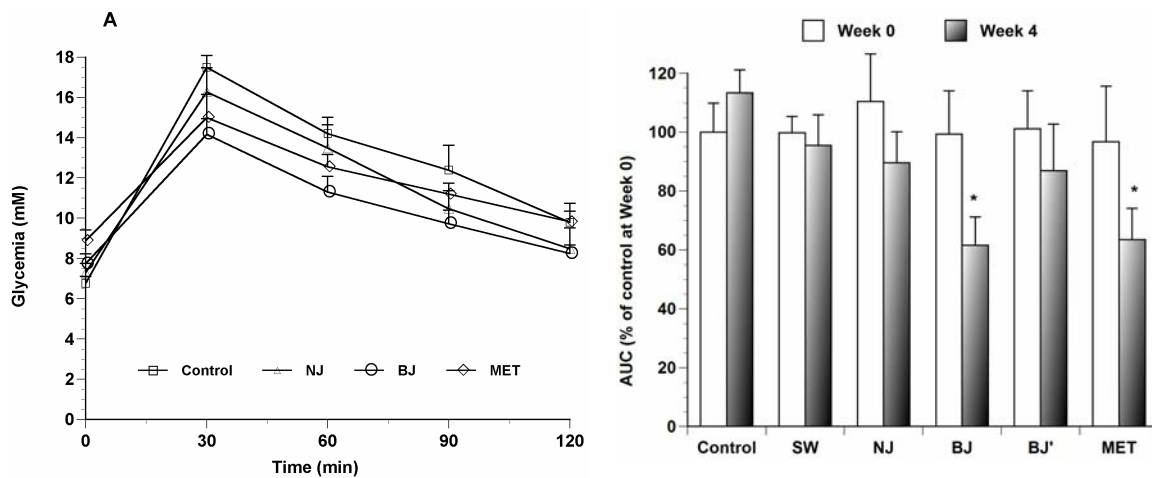


Figure 4

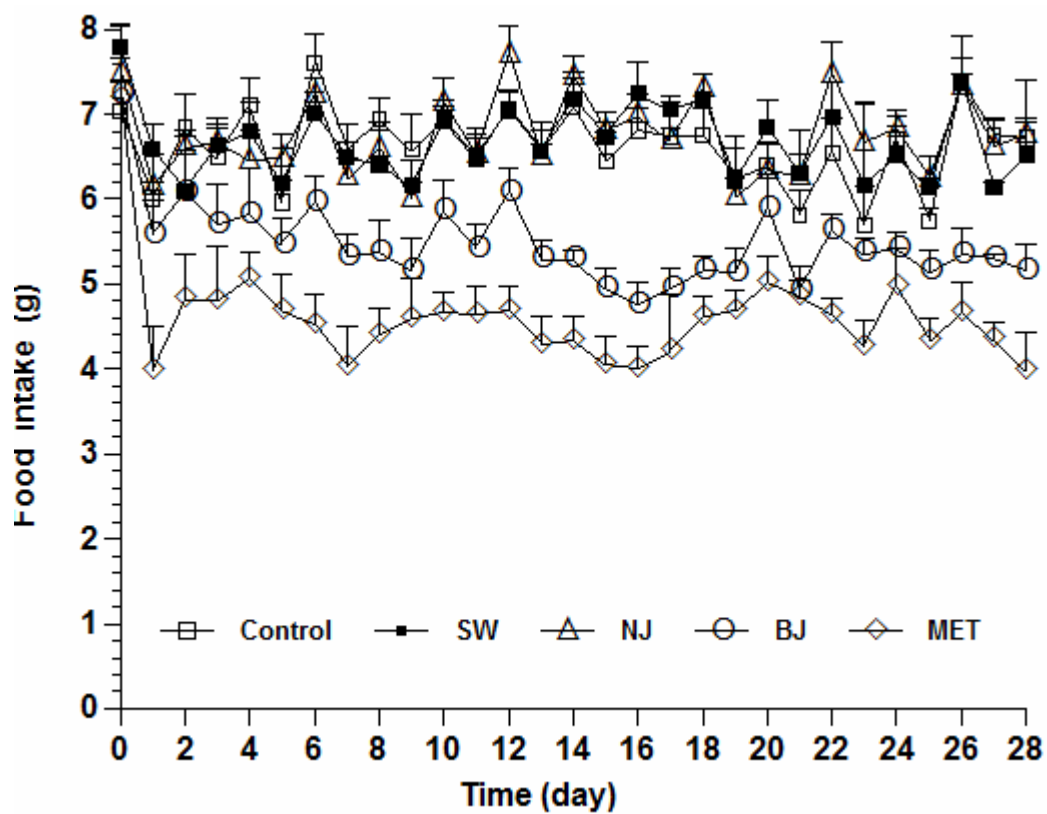


Figure 5A

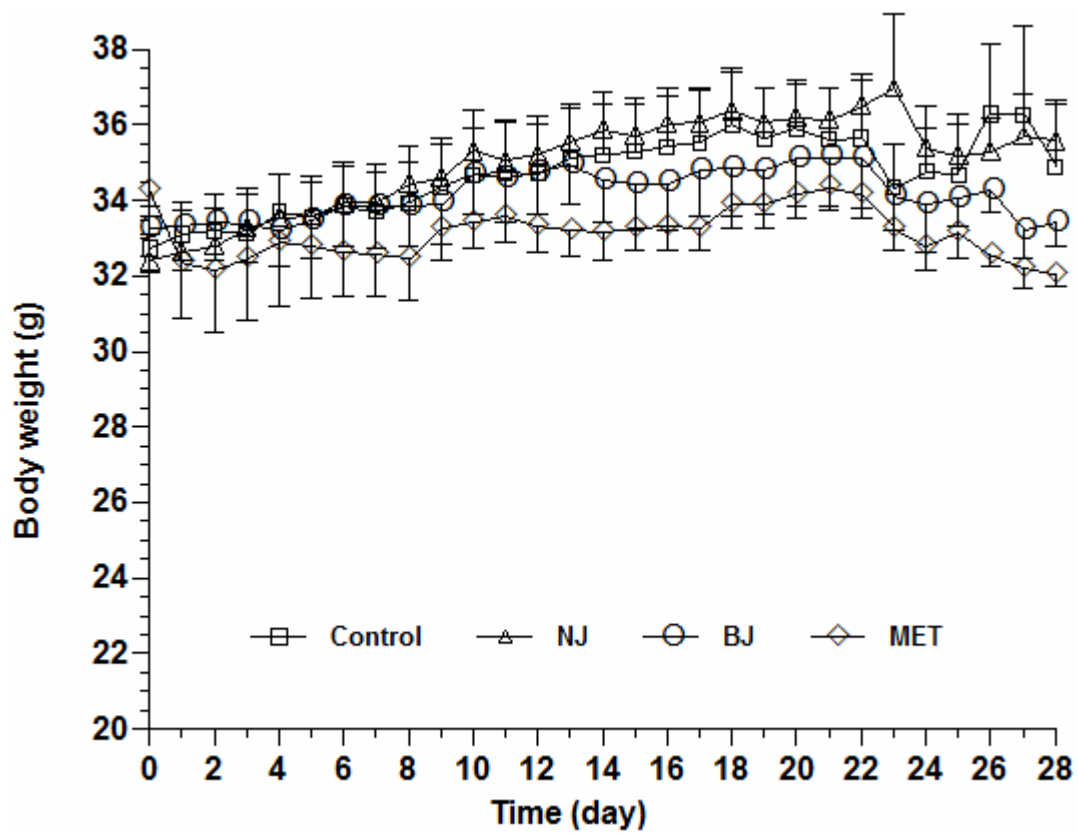


Figure 5B

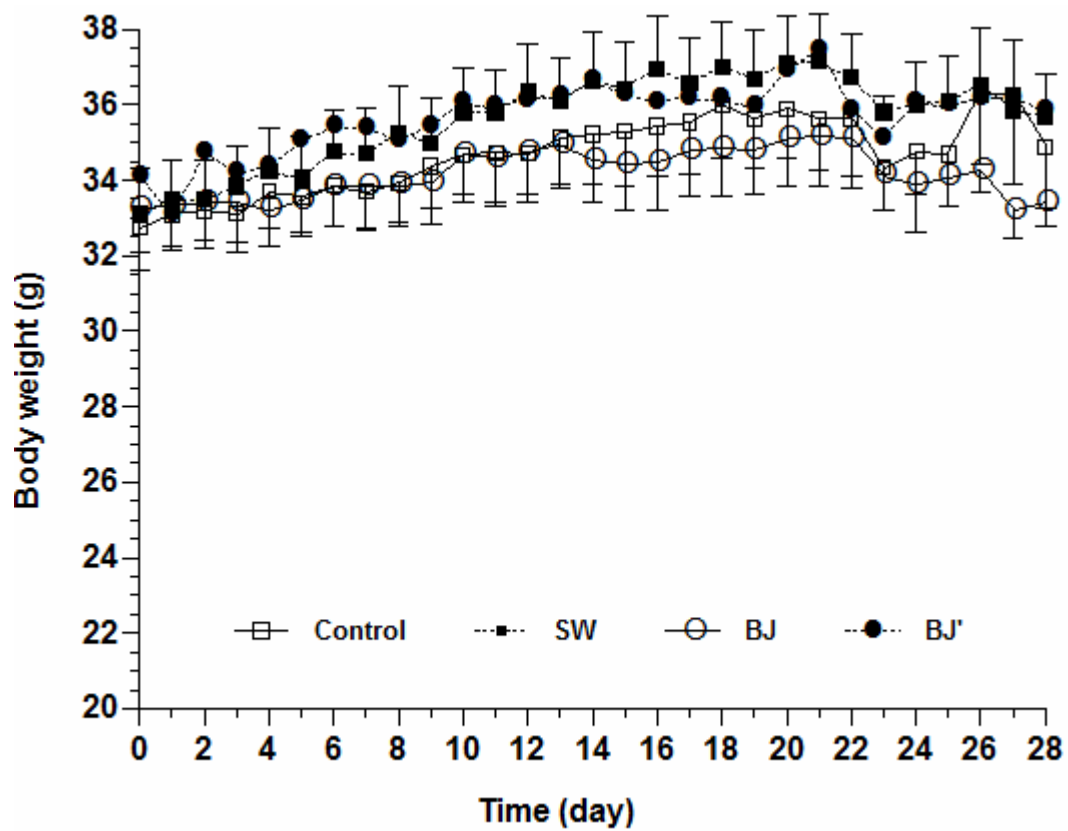


Figure 6

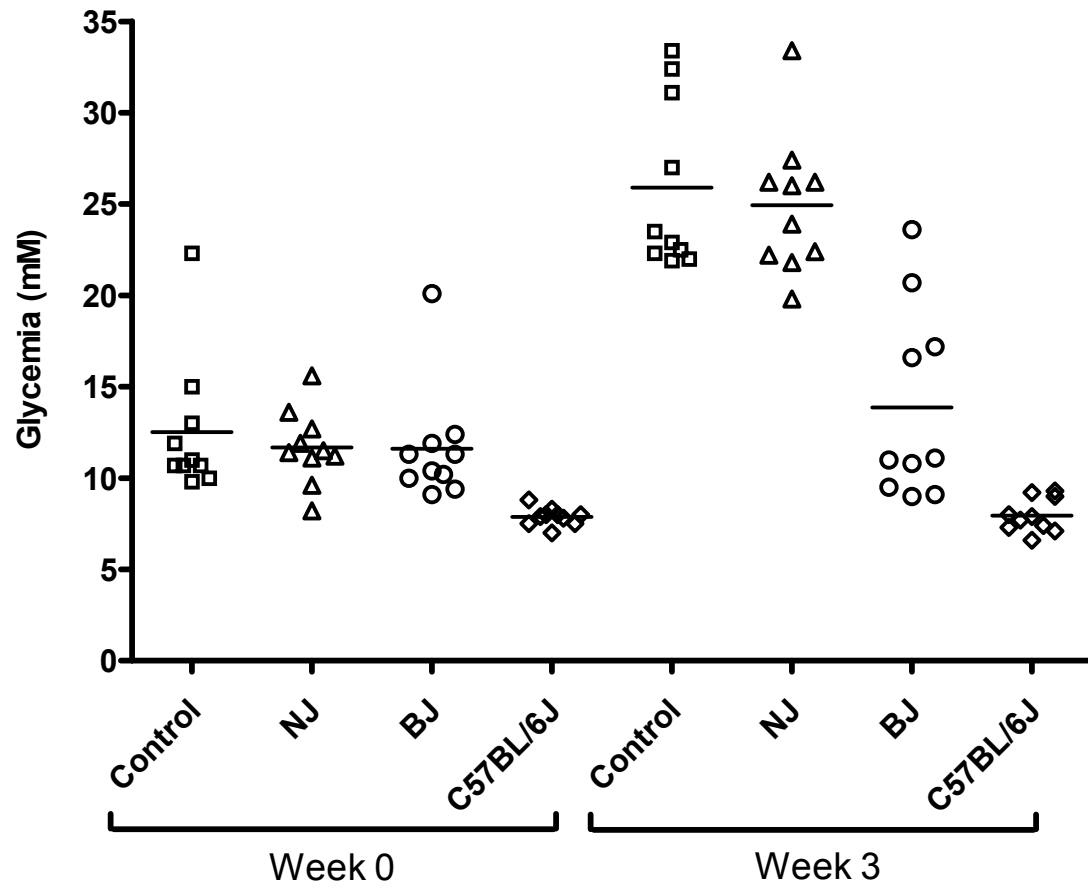


Figure 7

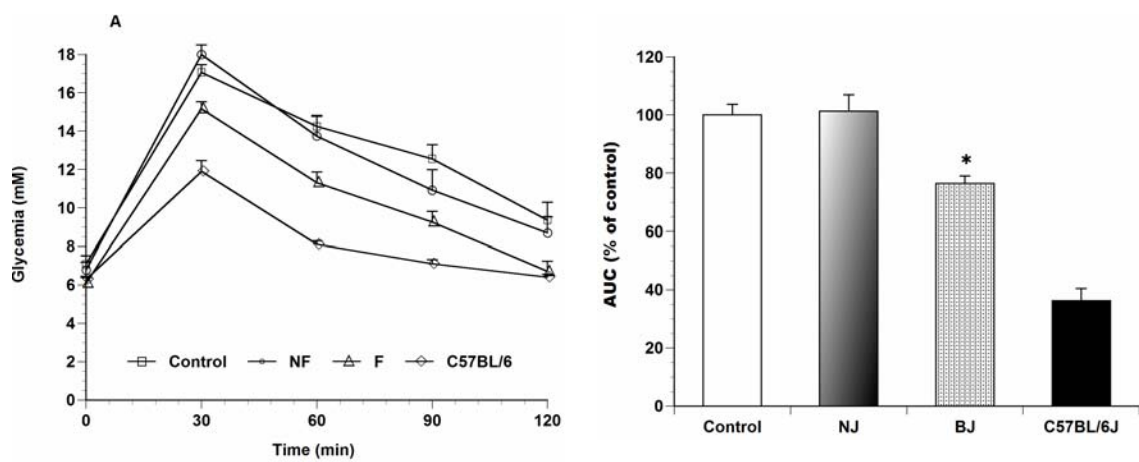


Figure 8A

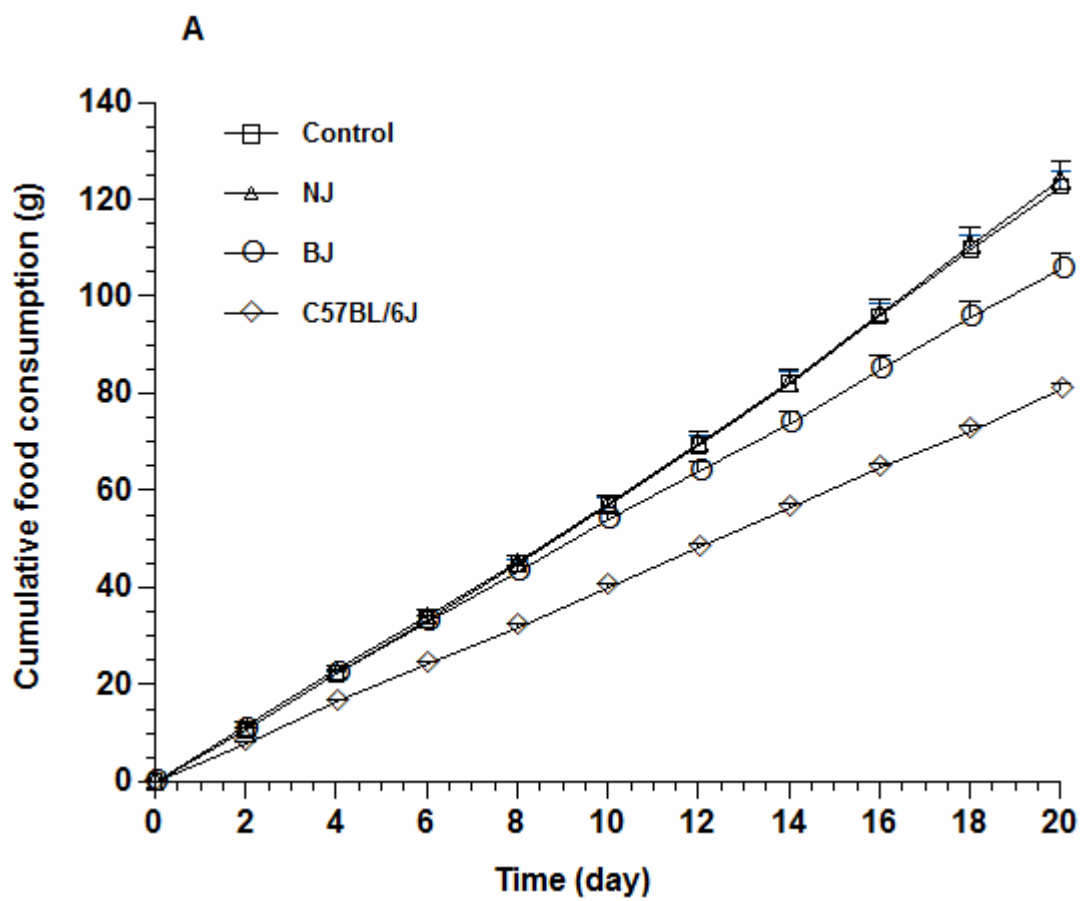
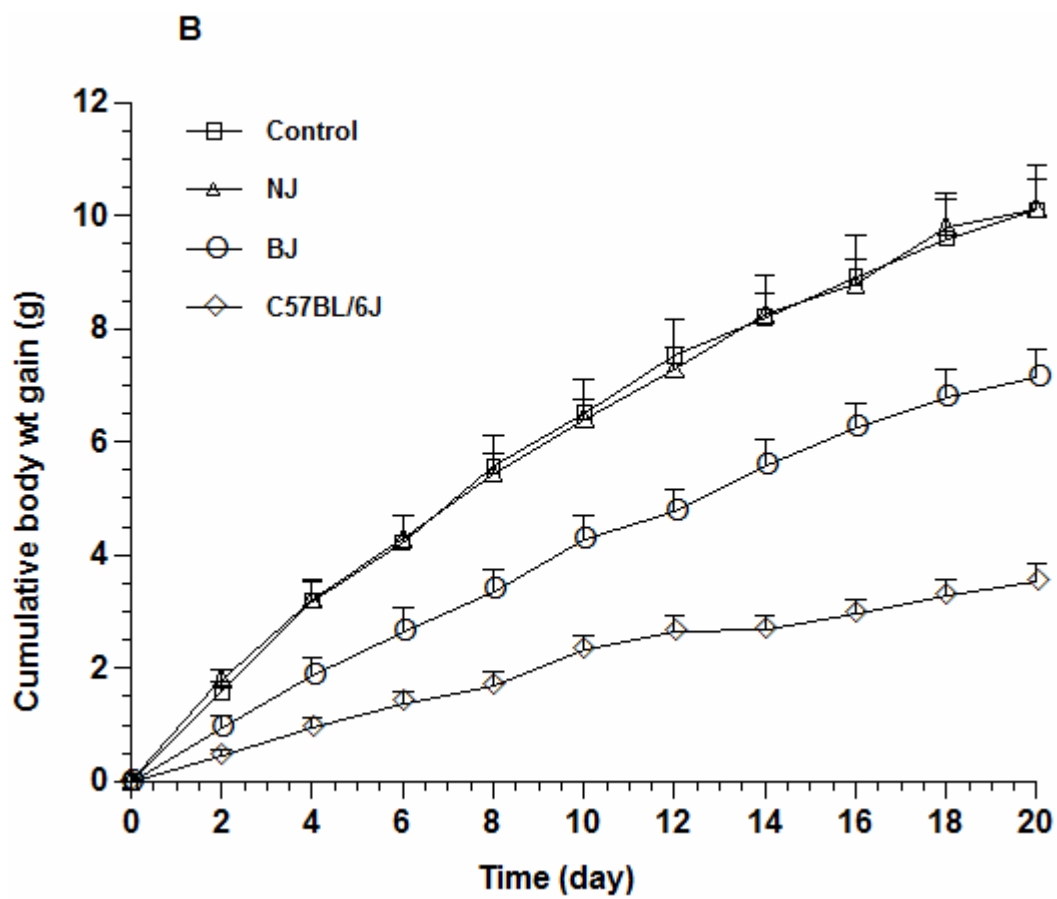


Figure 8B



Chapitre 5

Conclusion et perspectives

Le diabète de type II, dont le facteur de risque principal est l'obésité, est devenu un problème épidémique dans le monde. Le traitement du diabète lié à l'obésité peut être effectué par le traitement d'obésité en soi. Ainsi, la combinaison d'une alimentation saine et de l'activité physique est la meilleure stratégie pour traiter ainsi que prévenir le diabète associé à l'obésité. Cependant, les médicaments anti-diabétiques sont indispensables dans les cas où les modifications des habitudes de vie sont trop difficiles, insuffisantes ou inefficaces. Les plantes médicinales dont l'usage "clinique" est connu depuis des temps ancestraux représentent une source renouvelable pour la recherche de nouveaux agents thérapeutiques. Le bleuet, notamment l'extrait des feuilles ou des racines de bleuet, est utilisé depuis longtemps en Europe et en Amérique du Nord pour traiter le diabète (Haddad *et al.* 2003; Jellin *et al.* 2005). Les études récentes par bio-essais ont confirmé que non seulement l'extrait des racines, mais celui des tiges, des feuilles et des fruits ont aussi un potentiel antidiabétique (Haddad *et al.* 2003; Jellin *et al.* 2005). Ainsi, le bleuet représente une bonne matière pour la recherche de nouveaux agents antidiabétiques.

Ce travail révèle qu'en augmentant la teneur en composés phénoliques dans le jus de bleuet par le biais de la biotransformation, ce dernier acquiert des propriétés le rendant intéressant comme nouvelle approche contre le diabète de type II associé à l'obésité. En fait, le BJ agit de façon semblable à la metformine (Glucophage®), le médicament antidiabétique le plus connu, à plusieurs égards. Tout d'abord, le BJ est aussi efficace que la metformine pour diminuer l'hyperglycémie des animaux diabétiques. Deuxièmement, son effet anti-hyperglycémique provient d'une augmentation de l'absorption de glucose dans les tissus musculaires et adipeux via l'activation de

l'AMPK, le même mécanisme d'action indépendant à l'insuline de la metformine (Vuong *et al.* 2007). Troisièmement, le BJ ainsi que la metformine possèdent une activité anorexique, qui contribue partiellement à leur effet antidiabétique. Cependant, le BJ semble moins efficace que la metformine dans l'amélioration de la résistance à l'insuline chez les animaux diabétiques. En contre partie, seulement le BJ peut élever vers la normale la faible concentration de l'adiponectine, engendrée par l'obésité et négativement corrélée à la résistance à l'insuline (Mojiminiyi *et al.* 2007; Hivert *et al.* 2008).

L'augmentation de l'adiponectine est un mécanisme et/ou marqueur de l'amélioration de la résistance à l'insuline de plusieurs autres médicaments antidiabétiques tels que les agonistes du récepteur PPAR γ (Thiazolidinediones) ou les antagonistes du récepteur CB1 (Rimonabant) (Scheen & Van Gaal 2007; Van Gaal *et al.* 2008). Cependant, l'effet du BJ ressemble plus à celui de Rimonabant, un agent antidiabétique et anti-obésité, qu'aux thiazolidinediones (TZD) puisqu'il inhibe l'adipogenèse et semble pouvoir prévenir l'obésité. Cet effet est un avantage désirable par rapport aux antidiabétiques de la classe des TZD puisque la plupart de ces médicaments augmentent la prise de poids à long terme et peuvent ainsi potentiellement aggraver la maladie. De plus, nos résultats ouvrent une nouvelle avenue thérapeutique au BJ, pour le traitement et la prévention de l'obésité et éventuellement la prévention du diabète de type II.

Un autre potentiel thérapeutique remarquable du BJ est son effet neuroprotecteur contre le stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène. Ce résultat est en accord avec les études chez les animaux et les humains qui ont démontré que le bleuet et ses composés

phénoliques peuvent diminuer le stress oxydatif et être bénéfiques dans le traitement et la prévention des maladies neurodégénératives (Joseph *et al.* 2007; Lau *et al.* 2007b). Cette activité protectrice est encore une fois bénéfique pour les patients obèses et diabétiques puisque ces derniers subissent toujours un stress oxydatif très élevé qui cause éventuellement des complications comme la nécrose au niveau des extrémités (Robinson *et al.* 2009) et la dégénérescence des nerfs (Obrosova 2008).

Le dernier avantage du BJ est son approche nutraceutique/aliment fonctionnel. Alors que la commercialisation d'un nouveau médicament antidiabétique nécessite la découverte d'une molécule pure, qui pourrait être isolée à partir du BJ, et au moins 12-14 ans de recherche, le BJ en soi, étant un aliment fonctionnel, sera plus facilement et rapidement accessible aux patients. Il devrait toutefois répondre aux exigences de preuves d'innocuité et d'efficacité de Santé Canada, qui sont quand même moins sévères que pour les médicaments. Néanmoins, le BJ pourrait répondre bien à la demande thérapeutique urgente reliée à l'obésité, au diabète et leurs complications.

Les résultats de cette étude forment une base solide sur laquelle pourront s'appuyer des études cliniques faisant intervenir le BJ dans un contexte thérapeutique pour le diabète de type II et les maladies neurodégénératives. Les mécanismes d'action du BJ identifiés dans la présente thèse fournissent aussi des fondements scientifiques importants pour mieux expliquer les effets thérapeutiques et guider la recherche de principes actifs. D'ailleurs, la comparaison entre les compositions du jus de bleuet normal et du BJ permettra l'identification des composés responsables de ses effets thérapeutiques et pourra potentiellement mener au développement de nouveaux médicaments.

Bien entendu, le présent projet possède aussi certaines limites. Tout d'abord, il reste à déterminer si le BJ exerce ses effets via une seule molécule bioactive ou via un complexe de plusieurs composés qui agissent de façon synergique. S'il s'agit du dernier cas, une nouvelle formulation antidiabétique issue du jus de bleuet pourra prendre la forme d'une fraction active semi-purifiée. Un tel cas est connu pour le *Ginkgo biloba* dont l'extrait normalisé EGb-761 est un produit connu en Europe pour traiter la maladie d'Alzheimer (Ramassamy *et al.* 2007; Mahadevan & Park 2008; Yancheva *et al.* 2009). Ensuite, les mécanismes de l'effet neuroprotecteur nécessitent une compréhension complète de l'action du BJ sur le système glutathion des neurones, y compris toutes ses enzymes : glutathion réductase, glutathion peroxydase et glutathion S-transférase. Il faut élucider également comment le BJ arrive à augmenter l'activité enzymatique de la catalase et de la SOD. De plus, cette activité neuroprotectrice *in vitro* doit être validée *in vivo* puisque dans les essais *in vitro*, les cellules sont en contact direct avec les molécules bioactives.

En parallèle, les mécanismes de l'activité anti-hyperglycémique du BJ devraient être étudiés davantage par l'analyse de différentes voies de signalisation dans les tissus importants pour le contrôle de la glycémie chez les souris KKA^y, comme le pancréas, le muscle, le foie et les tissus adipeux. En particulier, la fonction des cellules β -pancréatiques dans ce modèle animal et l'effet du BJ sur leurs fonctions devraient être l'objectif principal de ces études même si le BJ n'a pas d'effet sur la sécrétion d'insuline ou la prolifération des cellules β -pancréatiques *in vitro* (données non publiées). Il faudrait étudier également l'effet du BJ sur la transcription du gène de l'adiponectine et d'autres adipokines chez ces animaux. Les mécanismes moléculaires de l'effet

anorexique, dont la voie de signalisation du CB1 est un candidat de choix, nécessitent aussi des études approfondies. Cependant, ces études demandent du temps et de l'argent. Elles pourront être justifiées par d'autres études *in vitro* afin de clarifier les mécanismes d'action du BJ. Finalement, ce travail subit également une limite commune de la recherche d'un extrait brut : l'information concernant la stabilité, l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination est faible ou simplement inexistante.

Malgré tout, il est clair que la biotransformation par les bactéries *S. vaccinii* confère de nouvelles activités physiologiques bénéfiques au jus de bleuet, probablement grâce à la formation de nouveaux composés phénoliques bioactifs. Cette activité pourrait également être étudiée et appliquée à d'autres produits du bleuet et à d'autres fruits comme la canneberge, le raisin, la fraise et d'autres baies.

Chapitre 6

Références

Albers, J. W., W. H. Herman, et al. (2007). "Subclinical neuropathy among Diabetes Control and Complications Trial participants without diagnosable neuropathy at trial completion: possible predictors of incident neuropathy?" *Diabetes Care* 30(10): 2613-8.

Alkon, D. L., M. K. Sun, et al. (2007). "PKC signaling deficits: a mechanistic hypothesis for the origins of Alzheimer's disease." *Trends Pharmacol Sci* 28(2): 51-60.

Andreozzi, F., C. D'Alessandris, et al. (2004). "Activation of the hexosamine pathway leads to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser307 and Ser612 and impairs the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin insulin biosynthetic pathway in RIN pancreatic beta-cells." *Endocrinology* 145(6): 2845-57.

Andres-Lacueva, C., B. Shukitt-Hale, et al. (2005). "Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory." *Nutr Neurosci* 8(2): 111-20.

Antolovich, M., P. D. Prenzler, et al. (2002). "Methods for testing antioxidant activity." *Analyst* 127(1): 183-98.

Arts, I. C. and P. C. Hollman (2005). "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies." *Am J Clin Nutr* 81(1 Suppl): 317S-325S.

Ascherio, A., M. G. Weisskopf, et al. (2005). "Vitamin E intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* 57(1): 104-10.

Atalay, M., G. Gordillo, et al. (2003). "Anti-angiogenic property of edible berry in a model of hemangioma." *FEBS Lett* 544(1-3): 252-7.

Bagchi, D., C. K. Sen, et al. (2004). "Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula." *Biochemistry (Mosc)* 69(1): 75-80, 1 p preceding 75.

Barros, D., O. B. Amaral, et al. (2006). "Behavioral and genoprotective effects of Vaccinium berries intake in mice." *Pharmacol Biochem Behav* 84(2): 229-34.

- Barsh, G., T. Gunn, et al. (2000). "Neuroendocrine regulation by the Agouti/Agrp-melanocortin system." *Endocr Res* 26(4): 571.
- Bartus, R. T. (1990). "Drugs to treat age-related neurodegenerative problems. The final frontier of medical science?" *J Am Geriatr Soc* 38(6): 680-95.
- Baur, J. A., K. J. Pearson, et al. (2006). "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet." *Nature* 444(7117): 337-42.
- Baur, J. A. and D. A. Sinclair (2006). "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence." *Nat Rev Drug Discov* 5(6): 493-506.
- Becker, J. V., G. O. Armstrong, et al. (2003). "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol." *FEMS Yeast Res* 4(1): 79-85.
- Beydoun, M. A., H. A. Beydoun, et al. (2008). "Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analysis." *Obes Rev* 9(3): 204-18.
- Bickford, P. C., T. Gould, et al. (2000). "Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats." *Brain Res* 866(1-2): 211-7.
- Bickford, P. C., B. Shukitt-Hale, et al. (1999). "Effects of aging on cerebellar noradrenergic function and motor learning: nutritional interventions." *Mech Ageing Dev* 111(2-3): 141-54.
- Bischoff, S. C. (2008). "Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11(6): 733-40.
- Bjornholm, M. and J. R. Zierath (2005). "Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 2): 354-7.
- Block, G., B. Patterson, et al. (1992). "Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence." *Nutr Cancer* 18(1): 1-29.

Boateng, J., M. Verghese, et al. (2007). "Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats." *Food Chem Toxicol* 45(5): 725-32.

Bodine, S. C., T. N. Stitt, et al. (2001). "Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo." *Nat Cell Biol* 3(11): 1014-9.

Boivin, D., M. Blanchette, et al. (2007). "Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFkappaB by edible berry juice." *Anticancer Res* 27(2): 937-48.

Boots, A. W., G. R. Haenen, et al. (2008). "Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical." *Eur J Pharmacol* 585(2-3): 325-37.

Boudet, A. M. (2007). "Evolution and current status of research in phenolic compounds." *Phytochemistry* 68(22-24): 2722-35.

Boulton, A. J. (1998). "Lowering the risk of neuropathy, foot ulcers and amputations." *Diabet Med* 15 Suppl 4: S57-9.

Brownmiller, C., L. R. Howard, et al. (2008). "Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products." *J Food Sci* 73(5): H72-9.

Buelga-Santos, C. and A. Scalbert (2000). "Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health." *J. Sci. Food Agric.* 80: 1094-1117.

C.I. Nindo, J. Tang, et al. (2005). "Viscosity of blueberry and raspberry juices for processing applications." *Journal of Food Engineering* 69: 343-350.

Calle, E. E. and R. Kaaks (2004). "Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms." *Nat Rev Cancer* 4(8): 579-91.

Calle, E. E., C. Rodriguez, et al. (2003). "Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults." *N Engl J Med* 348(17): 1625-38.

Cameron, N. E., S. E. Eaton, et al. (2001). "Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy." *Diabetologia* 44(11): 1973-88.

Casadesus, G., B. Shukitt-Hale, et al. (2004). "Modulation of hippocampal plasticity and cognitive behavior by short-term blueberry supplementation in aged rats." *Nutr Neurosci* 7(5-6): 309-16.

Cerda, B., J. C. Espin, et al. (2004). "The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans." *Eur J Nutr* 43(4): 205-20.

Cerda, B., R. Llorach, et al. (2003). "Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice." *Eur J Nutr* 42(1): 18-28.

Cerda, B., P. Periago, et al. (2005a). "Identification of urolithin a as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds." *J Agric Food Chem* 53(14): 5571-6.

Cerda, B., F. A. Tomas-Barberan, et al. (2005b). "Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability." *J Agric Food Chem* 53(2): 227-35.

Chang, L., S. H. Chiang, et al. (2004). "Insulin signaling and the regulation of glucose transport." *Mol Med* 10(7-12): 65-71.

Chang-Chen, K. J., R. Mullur, et al. (2008). "Beta-cell failure as a complication of diabetes." *Rev Endocr Metab Disord* 9(4): 329-43.

Chou, S. Y., P. J. Chien, et al. (2008). "Particle Size Reduction Effectively Enhances the Cholesterol-Lowering Activities of Carrot Insoluble Fiber and Cellulose." *J Agric Food Chem*.

Cichocki, M., J. Paluszczak, et al. (2008). "Pterostilbene is equally potent as resveratrol in inhibiting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activated NFkappaB, AP-1, COX-2, and iNOS in mouse epidermis." *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1: S62-70.

Cirillo, N., M. Lanza, et al. (2007). "Defining the involvement of proteinases in pemphigus vulgaris: evidence of matrix metalloproteinase-9 overexpression in experimental models of disease." *J Cell Physiol* 212(1): 36-41.

College, P. S. (2004). *Ericacea (Health) Family and Their Culture. Horticulture Fact Sheet*. C. H. Center. University Park, Pennsylvania State University.

Cooper, G. J., A. C. Willis, et al. (1987). "Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(23): 8628-32.

Dai, Q., A. R. Borenstein, et al. (2006). "Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project." *Am J Med* 119(9): 751-9.

D'Archivio, M., C. Filesi, et al. (2007). "Polyphenols, dietary sources and bioavailability." *Ann Ist Super Sanita* 43(4): 348-61.

Davis, B. J., Z. Xie, et al. (2006). "Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase." *Diabetes* 55(2): 496-505.

de Ferranti, S. and D. Mozaffarian (2008). "The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences." *Clin Chem* 54(6): 945-55.

de Rijk, M. C., M. M. Breteler, et al. (1997). "Dietary antioxidants and Parkinson disease. The Rotterdam Study." *Arch Neurol* 54(6): 762-5.

Deprez, S., I. Mila, et al. (2001). "Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells." *Antioxid Redox Signal* 3(6): 957-67.

Di Matteo, V. and E. Esposito (2003). "Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis." *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2(2): 95-107.

Donath, M. Y., J. A. Ehses, et al. (2005). "Mechanisms of beta-cell death in type 2 diabetes." *Diabetes* 54 Suppl 2: S108-13.

Donovan, J. L., C. Manach, et al. (2002). "Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B3." *Br J Nutr* 87(4): 299-306.

Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev* 82(1): 47-95.

Dudley, J. I., I. Lekli, et al. (2008). "Does white wine qualify for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol." *J Agric Food Chem* 56(20): 9362-73.

Duffy, K. B., E. L. Spangler, et al. (2008). "A blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats." *Neurobiol Aging* 29(11): 1680-9.

Dugo, L., M. Collin, et al. (2006). "Insulin reduces the multiple organ injury and dysfunction caused by coadministration of lipopolysaccharide and peptidoglycan independently of blood glucose: role of glycogen synthase kinase-3 β inhibition." *Crit Care Med* 34(5): 1489-96.

Ehses, J. A., A. Perren, et al. (2007). "Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes." *Diabetes* 56(9): 2356-70.

Erlund, I., R. Freese, et al. (2006). "Bioavailability of quercetin from berries and the diet." *Nutr Cancer* 54(1): 13-7.

Fernandez-Panchon, M. S., D. Villano, et al. (2008). "Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence." *Crit Rev Food Sci Nutr* 48(7): 649-71.

Ferreira, D., G. G. Gross, et al. (2008). "Tannins and related polyphenols: Perspectives on their chemistry, biology, ecological effects, and human health protection." *Phytochemistry*.

Ferreira, D., G. G. Gross, et al. (2005). "Tannins and related polyphenols: fascinating natural products with diverse implications for biological systems, ecology, industrial applications and health protection." *Phytochemistry* 66(17): 1969-71.

Figuroa-Romero, C., M. Sadidi, et al. (2008). "Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy." *Rev Endocr Metab Disord* 9(4): 301-14.

Flegal, K. M. (2005). "Epidemiologic aspects of overweight and obesity in the United States." *Physiol Behav* 86(5): 599-602.

Foretz, M., N. Taleux, et al. (2006). "[Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]." *Med Sci (Paris)* 22(4): 381-8.

Frigo, D. E., B. N. Duong, et al. (2002). "Flavonoid phytochemicals regulate activator protein-1 signal transduction pathways in endometrial and kidney stable cell lines." *J Nutr* 132(7): 1848-53.

Galli, R. L., D. F. Bielinski, et al. (2006). "Blueberry supplemented diet reverses age-related decline in hippocampal HSP70 neuroprotection." *Neurobiol Aging* 27(2): 344-50.

Galvano, F., P. Vitaglione, et al. (2008). "Protocatechuic acid: the missing human cyanidins' metabolite." *Mol Nutr Food Res* 52(3): 386-7; author reply 388.

Gao, Z., Q. He, et al. (2006). "Regulation of nuclear translocation of HDAC3 by I κ B α is required for tumor necrosis factor inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma function." *J Biol Chem* 281(7): 4540-7.

Garcia-Alonso, M., A. M. Minihane, et al. (2008). "Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma." *J Nutr Biochem*.

Gonthier, M. P., J. L. Donovan, et al. (2003). "Metabolism of dietary procyanidins in rats." *Free Radic Biol Med* 35(8): 837-44.

Gordillo, G., H. Fang, et al. (2009). "Oral administration of blueberry inhibits angiogenic tumor growth and enhances survival of mice with endothelial cell neoplasm." *Antioxid Redox Signal* 11(1): 47-58.

Goyarzu, P., D. H. Malin, et al. (2004). "Blueberry supplemented diet: effects on object recognition memory and nuclear factor-kappa B levels in aged rats." *Nutr Neurosci* 7(2): 75-83.

Graefe, E. U., H. Derendorf, et al. (1999). "Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans." *Int J Clin Pharmacol Ther* 37(5): 219-33.

Graefe, E. U., J. Wittig, et al. (2001). "Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans." *J Clin Pharmacol* 41(5): 492-9.

Grounds, M. D., H. G. Radley, et al. (2008). "Implications of cross-talk between tumour necrosis factor and insulin-like growth factor-1 signalling in skeletal muscle." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35(7): 846-51.

Gu, L., M. Kelm, et al. (2002). "Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method." *J Agric Food Chem* 50(17): 4852-60.

Gu, L., M. A. Kelm, et al. (2004). "Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption." *J Nutr* 134(3): 613-7.

Haddad, P. S., M. Depot, et al. (2003). "Comparative study on the Medicinal Plants. Most recommended by traditional practitioners in Morocco and Canada." *J. Herbs, Spices and Medicinal Plants* 10(3): 25-45.

Hakkinen, S. H., S. O. Karenlampi, et al. (1999). "Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries." *J Agric Food Chem* 47(6): 2274-9.

Halimi, S. (2005). "[The glitazones]." *Rev Med Interne* 26(1): 54-7.

- Halls, C. and O. Yu (2008). "Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis." *Trends Biotechnol* 26(2): 77-81.
- Halvorsen, B. L., K. Holte, et al. (2002). "A systematic screening of total antioxidants in dietary plants." *J Nutr* 132(3): 461-71.
- Hancock, J. F. (1989). "Blueberry research in North America." *Acta Hort* 241: 19-30.
- Hancock, J. F. and A. D. Draper (1989). "Blueberry culture to North America." *HortScience* 24: 551-556.
- Harman-Boehm, I., M. Bluher, et al. (2007). "Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity." *J Clin Endocrinol Metab* 92(6): 2240-7.
- Harris, C. S., A. J. Burt, et al. (2007). "A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*." *Phytochem Anal* 18(2): 161-9.
- He, L., T. M. Gunn, et al. (2001). "A biochemical function for attractin in agouti-induced pigmentation and obesity." *Nat Genet* 27(1): 40-7.
- Hedley, A. A., C. L. Ogden, et al. (2004). "Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002." *Jama* 291(23): 2847-50.
- Hivert, M. F., L. M. Sullivan, et al. (2008). "Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor-alpha with insulin resistance." *J Clin Endocrinol Metab* 93(8): 3165-72.
- Hofbauer, K. G., J. R. Nicholson, et al. (2007). "The obesity epidemic: current and future pharmacological treatments." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 565-92.
- Holland, W. L., J. T. Brozinick, et al. (2007). "Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance." *Cell Metab* 5(3): 167-79.

Holst, B. and G. Williamson (2008). "Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants." *Curr Opin Biotechnol* 19(2): 73-82.

Holt, R. R., S. A. Lazarus, et al. (2002). "Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa." *Am J Clin Nutr* 76(4): 798-804.

Hope Smith, S., P. L. Tate, et al. (2004). "Antimutagenic activity of berry extracts." *J Med Food* 7(4): 450-5.

Hoppener, J. W. and C. J. Lips (2006). "Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus." *Int J Biochem Cell Biol* 38(5-6): 726-36.

Hosseinian, F. S. and T. Beta (2007). "Saskatoon and wild blueberries have higher anthocyanin contents than other Manitoba berries." *J Agric Food Chem* 55(26): 10832-8.

Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." *Nature* 444(7121): 860-7.

Hotamisligil, G. S. and E. Erbay (2008). "Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases." *Nat Rev Immunol* 8(12): 923-34.

Houstis, N., E. D. Rosen, et al. (2006). "Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance." *Nature* 440(7086): 944-8.

Huang, H. C., C. Y. Huang, et al. (2008). "Ursolic acid inhibits IL-1beta or TNF-alpha-induced C6 glioma invasion through suppressing the association ZIP/p62 with PKC-zeta and downregulating the MMP-9 expression." *Mol Carcinog*.

Hur, H. G., J. O. Lay, Jr., et al. (2000). "Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin." *Arch Microbiol* 174(6): 422-8.

Jellin, J., P. Gregory, et al. (2005). "Natural Medicines Comprehensive Database. ed. Pharmacist's Letter/Prescriber's Letter. pp. 2239. Stockton, CA: Therapeutic Research Faculty."

Jordan, R. C., M. Macabeo-Ong, et al. (2004). "Overexpression of matrix metalloproteinase-1 and -9 mRNA is associated with progression of oral dysplasia to cancer." *Clin Cancer Res* 10(19): 6460-5.

Jorgensen, S. B., E. A. Richter, et al. (2006). "Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise." *J Physiol* 574(Pt 1): 17-31.

Joseph, J. A., N. A. Denisova, et al. (2003). "Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model." *Nutr Neurosci* 6(3): 153-62.

Joseph, J. A., N. A. Denisova, et al. (2000). "Oxidative stress protection and vulnerability in aging: putative nutritional implications for intervention." *Mech Ageing Dev* 116(2-3): 141-53.

Joseph, J. A., D. R. Fisher, et al. (2004). "Fruit extracts antagonize A β - or DA-induced deficits in Ca²⁺ flux in M1-transfected COS-7 cells." *J Alzheimers Dis* 6(4): 403-11; discussion 443-9.

Joseph, J. A., B. Shukitt-Hale, et al. (2005). "Oxidative stress and inflammation in brain aging: nutritional considerations." *Neurochem Res* 30(6-7): 927-35.

Joseph, J. A., B. Shukitt-Hale, et al. (1999). "Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation." *J Neurosci* 19(18): 8114-21.

Joseph, J. A., B. Shukitt-Hale, et al. (2007). "Fruit polyphenols and their effects on neuronal signaling and behavior in senescence." *Ann N Y Acad Sci* 1100: 470-85.

Kahle, K., M. Kraus, et al. (2006). "Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion?" *Mol Nutr Food Res* 50(4-5): 418-23.

- Kahlert, C., O. R. Bandapalli, et al. (2008). "Invasion front-specific overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in liver metastases from colorectal cancer." *Anticancer Res* 28(3A): 1459-65.
- Kahlon, T. S. and G. E. Smith (2007). "In vitro binding of bile acids by blueberries, plums, prunes, strawberries, cherries, cranberries and apples." *Food Chem* 100: 1182-1187.
- Kalea, A. Z., F. N. Lamari, et al. (2006). "Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption affects the composition and structure of glycosaminoglycans in Sprague-Dawley rat aorta." *J Nutr Biochem* 17(2): 109-16.
- Kalt, W., J. B. Blumberg, et al. (2008). "Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs." *J Agric Food Chem* 56(3): 705-12.
- Karamanos, N. K. (1998). "Glycosylation of proteins: specificity, biological role, and analysis of glycan moieties." *J Protein Chem* 17(6): 513-4.
- Karasawa, H., S. Nagata-Goto, et al. (2009). "A novel model of type 2 diabetes mellitus based on obesity induced by high-fat diet in BDF1 mice." *Metabolism* 58(3): 296-303.
- Kay, C. D. and B. J. Holub (2002). "The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects." *Br J Nutr* 88(4): 389-98.
- Kim, J. K., J. J. Fillmore, et al. (2004). "PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance." *J Clin Invest* 114(6): 823-7.
- Kluger, A., J. G. Gianutsos, et al. (1997). "Patterns of motor impairment in normal aging, mild cognitive decline, and early Alzheimer's disease." *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci* 52(1): P28-39.
- Kraft, T. B., B. M. Schmidt, et al. (2005). "Chemopreventive potential of wild lowbush blueberry fruits in multiple stages of carcinogenesis." *Journal of Food Science* 70: S159-166.

Krentz, A. J. and C. J. Bailey (2005). "Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus." *Drugs* 65(3): 385-411.

Kron, K. A., E. A. Powell, et al. (2002). "Phylogenetic relationships within the blueberry tribe (Vaccinieae, Ericaceae) based on sequence data from MATK and nuclear ribosomal ITS regions, with comments on the placement of Satyria." *American Journal of Botany* 89: 327-336.

Kundu, J. K. and Y. J. Surh (2008). "Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives." *Cancer Lett* 269(2): 243-61.

Laplante, M., W. T. Festuccia, et al. (2006). "Mechanisms of the depot specificity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma action on adipose tissue metabolism." *Diabetes* 55(10): 2771-8.

Lau, F. C., D. F. Bielinski, et al. (2007a). "Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia." *J Neurosci Res* 85(5): 1010-7.

Lau, F. C., B. Shukitt-Hale, et al. (2007b). "Nutritional intervention in brain aging: reducing the effects of inflammation and oxidative stress." *Subcell Biochem* 42: 299-318.

Le Forestier, N., L. Lacomblez, et al. (2008). "[Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis.]" *Rev Neurol (Paris)*.

Lee, J., R. W. Durst, et al. (2002). "Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and phenolics: comparison of two pretreatments." *Journal of Food Science* 67: 1660-1667.

Li, X., P. A. Hansen, et al. (2005). "Distinct mechanisms of glucose lowering by specific agonists for peroxisomal proliferator activated receptor gamma and retinoic acid X receptors." *J Biol Chem* 280(46): 38317-27.

Limon-Pacheco, J. and M. E. Gonsebatt (2008). "The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress." *Mutat Res*.

- Lin, C. W., W. C. Hou, et al. (2008). "Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKC delta/ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells." *Carcinogenesis* 29(9): 1807-15.
- Lin, Y. T., S. L. Hsiu, et al. (2003). "Degradation of flavonoid aglycones by rabbit, rat and human fecal flora." *Biol Pharm Bull* 26(5): 747-51.
- Liu, D., J. Nakano, et al. (2007). "Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer." *Lung Cancer* 58(3): 384-91.
- Luchsinger, J. A. (2008). "Adiposity, hyperinsulinemia, diabetes and Alzheimer's disease: an epidemiological perspective." *Eur J Pharmacol* 585(1): 119-29.
- Luchsinger, J. A. and D. R. Gustafson (2009). "Adiposity, Type 2 Diabetes, and Alzheimer's Disease." *J Alzheimers Dis* 16(4): 693-704.
- Lupi, R., F. Dotta, et al. (2002). "Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated." *Diabetes* 51(5): 1437-42.
- Luteyn, J. L. (2002). "Biogeography of the neotropical Vaccinieae (Ericaceae): patterns of diversity, adaptation, and endemism." *Botanical Review* 68(1): 55-87.
- Lyons, M. M., C. Yu, et al. (2003). "Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries." *J Agric Food Chem* 51(20): 5867-70.
- Mahadevan, S. and Y. Park (2008). "Multifaceted therapeutic benefits of Ginkgo biloba L.: chemistry, efficacy, safety, and uses." *J Food Sci* 73(1): R14-9.
- Manach, C., A. Scalbert, et al. (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." *Am J Clin Nutr* 79(5): 727-47.
- Manach, C., G. Williamson, et al. (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." *Am J Clin Nutr* 81(1 Suppl): 230S-242S.

Mancuso, M., D. Orsucci, et al. (2008). "Mitochondria, mitochondrial DNA and Alzheimer's disease. What comes first?" *Curr Alzheimer Res* 5(5): 457-68.

Mann, C. D., C. P. Neal, et al. (2009). "Phytochemicals as potential chemopreventive and chemotherapeutic agents in hepatocarcinogenesis." *Eur J Cancer Prev* 18(1): 13-25.

Marchetti, P., S. Del Prato, et al. (2006). "The pancreatic beta-cell in human Type 2 diabetes." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16 Suppl 1: S3-6.

Martin, C. L., J. Albers, et al. (2006). "Neuropathy among the diabetes control and complications trial cohort 8 years after trial completion." *Diabetes Care* 29(2): 340-4.

Martin, L. and C. Matar (2005). "Increase of antioxidant capacity of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) during fermentation by a novel bacterium from the fruit microflora." *J Sci Food Agri* 85: 1477-1484.

Martin, S., L. Favot, et al. (2003). "Delphinidin inhibits endothelial cell proliferation and cell cycle progression through a transient activation of ERK-1/-2." *Biochem Pharmacol* 65(4): 669-75.

Martineau, L. C., A. Couture, et al. (2006). "Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait." *Phytomedicine*.

Martinez, M. C. and R. Andriantsitohaina (2008). "Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease." *Antioxid Redox Signal*.

Martyn, J. A., M. Kaneki, et al. (2008). "Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms." *Anesthesiology* 109(1): 137-48.

Matchett, M. D., S. L. MacKinnon, et al. (2005). "Blueberry flavonoids inhibit matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells." *Biochem Cell Biol* 83(5): 637-43.

- Maxwell, C. J., M. S. Hicks, et al. (2005). "Supplemental use of antioxidant vitamins and subsequent risk of cognitive decline and dementia." *Dement Geriatr Cogn Disord* 20(1): 45-51.
- Mazur, W. M., M. Uehara, et al. (2000). "Phyto-oestrogen content of berries, and plasma concentrations and urinary excretion of enterolactone after a single strawberry-meal in human subjects." *Br J Nutr* 83(4): 381-7.
- Mazza, G., C. D. Kay, et al. (2002). "Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects." *J Agric Food Chem* 50(26): 7731-7.
- McAnulty, S. R., L. S. McAnulty, et al. (2005). "Effect of daily fruit ingestion on angiotensin converting enzyme activity, blood pressure, and oxidative stress in chronic smokers." *Free Radic Res* 39(11): 1241-8.
- McGhie, T. K., G. D. Ainge, et al. (2003). "Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats." *J Agric Food Chem* 51(16): 4539-48.
- McGhie, T. K. and M. C. Walton (2007). "The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding." *Mol Nutr Food Res* 51(6): 702-13.
- McGuire, S. O., C. E. Sortwell, et al. (2006). "Dietary supplementation with blueberry extract improves survival of transplanted dopamine neurons." *Nutr Neurosci* 9(5-6): 251-8.
- McLaren, J. E. and D. P. Ramji (2008). "Interferon gamma: A master regulator of atherosclerosis." *Cytokine Growth Factor Rev*.
- Meier, J. J., R. Kaye, et al. (2006). "Inhibition of human IAPP fibril formation does not prevent beta-cell death: evidence for distinct actions of oligomers and fibrils of human IAPP." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(6): E1317-24.
- Mertens-Talcott, S. U., J. Rios, et al. (2008). "Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers." *J Agric Food Chem* 56(17): 7796-802.

Meyre, D., J. Delplanque, et al. (2009). "Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations." *Nat Genet* 41(2): 157-9.

Mojiminiyi, O. A., N. A. Abdella, et al. (2007). "Adiponectin, insulin resistance and clinical expression of the metabolic syndrome in patients with Type 2 diabetes." *Int J Obes (Lond)* 31(2): 213-20.

Morrow, D. M., P. E. Fitzsimmons, et al. (2001). "Dietary supplementation with the anti-tumour promoter quercetin: its effects on matrix metalloproteinase gene regulation." *Mutat Res* 480-481: 269-76.

Moyer, R. A., K. E. Hummer, et al. (2002). "Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: vaccinium, rubus, and ribes." *J Agric Food Chem* 50(3): 519-25.

Nakatani, Y., H. Kaneto, et al. (2005). "Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes." *J Biol Chem* 280(1): 847-51.

Nelson, T. J., M. K. Sun, et al. (2008). "Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair." *Eur J Pharmacol* 585(1): 76-87.

Nemes-Nagy, E., T. Szocs-Molnar, et al. (2008). "Effect of a dietary supplement containing blueberry and sea buckthorn concentrate on antioxidant capacity in type 1 diabetic children." *Acta Physiol Hung* 95(4): 383-93.

Neto, C. C. (2007). "Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases." *Mol Nutr Food Res* 51(6): 652-64.

Nicoue, E. E., S. Savard, et al. (2007). "Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification." *J Agric Food Chem* 55(14): 5626-35.

Nielsen, I. L. and G. Williamson (2007). "Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans." *Nutr Cancer* 57(1): 1-10.

Norton, C., A. Z. Kalea, et al. (2005). "Wild blueberry-rich diets affect the contractile machinery of the vascular smooth muscle in the Sprague-Dawley rat." *J Med Food* 8(1): 8-13.

Nutritiondata (2008). In-depth nutrition information on raw blueberries. Nutritiondata.com.

Obrosova, I. G. (2008). "Diabetes and the peripheral nerve." *Biochim Biophys Acta*.

Olsson, M. E., K. E. Gustavsson, et al. (2004). "Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels." *J Agric Food Chem* 52(24): 7264-71.

Ovaskainen, M. L., R. Torronen, et al. (2008). "Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults." *J Nutr* 138(3): 562-6.

Palsamy, P. and S. Subramanian (2008a). "Modulatory effects of resveratrol on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats." *Chem Biol Interact*.

Palsamy, P. and S. Subramanian (2008b). "Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats." *Biomed Pharmacother* 62(9): 598-605.

Paravicini, T. M. and R. M. Touyz (2008). "NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities." *Diabetes Care* 31 Suppl 2: S170-80.

Parry, J., L. Su, et al. (2006). "Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours." *J Agric Food Chem* 54(11): 3773-8.

Pearson, K. J., J. A. Baur, et al. (2008). "Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span." *Cell Metab* 8(2): 157-68.

Perrotta, C., C. De Palma, et al. (2008). "Nitric oxide and sphingolipids: mechanisms of interaction and role in cellular pathophysiology." *Biol Chem* 389(11): 1391-7.

Poirier, P., T. D. Giles, et al. (2006). "Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism." *Circulation* 113(6): 898-918.

Poitout, V. and R. P. Robertson (2002). "Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity." *Endocrinology* 143(2): 339-42.

Prabhakar, P. K. and M. Doble (2008). "A target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants." *Curr Diabetes Rev* 4(4): 291-308.

Prada, P. O., H. G. Zecchin, et al. (2005). "Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion." *Endocrinology* 146(3): 1576-87.

Prasain, J. K. and S. Barnes (2007). "Metabolism and bioavailability of flavonoids in chemoprevention: current analytical strategies and future prospectus." *Mol Pharm* 4(6): 846-64.

Pratico, D. (2008). "Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal." *Trends Pharmacol Sci*.

Prentice, A. M. (2006). "The emerging epidemic of obesity in developing countries." *Int J Epidemiol* 35(1): 93-9.

Prentki, M. and C. J. Nolan (2006). "Islet beta cell failure in type 2 diabetes." *J Clin Invest* 116(7): 1802-12.

Prior, R. L., S. A. Lazarus, et al. (2001). "Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry." *J Agric Food Chem* 49(3): 1270-6.

Prior, R. L. and X. Wu (2006). "Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities." *Free Radic Res* 40(10): 1014-28.

Prior, R. L., X. Wu, et al. (2008). "Whole berries versus berry anthocyanins: interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity." *J Agric Food Chem* 56(3): 647-53.

Providencia, R. (2006). "Cardiovascular protection from alcoholic drinks: scientific basis of the French Paradox." *Rev Port Cardiol* 25(11): 1043-58.

Pupa, S. M., S. Menard, et al. (2002). "New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression." *J Cell Physiol* 192(3): 259-67.

Ramassamy, C., F. Longpre, et al. (2007). "Ginkgo biloba extract (EGb 761) in Alzheimer's disease: is there any evidence?" *Curr Alzheimer Res* 4(3): 253-62.

Ramirez, M. R., I. Izquierdo, et al. (2005). "Effect of lyophilised *Vaccinium* berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats." *Pharmacol Res* 52(6): 457-62.

Ramos, S., M. Alia, et al. (2005). "Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2)." *J Agric Food Chem* 53(4): 1271-80.

Rice-Evans, C., N. J. Miller, et al. (1997). "Antioxidant properties of phenolic compounds." *Trends Plant. Sci.* 4: 152-159.

Rimando, A. M., W. Kalt, et al. (2004). "Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *vaccinium* berries." *J Agric Food Chem* 52(15): 4713-9.

Rimando, A. M., R. Nagmani, et al. (2005). "Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters." *J Agric Food Chem* 53(9): 3403-7.

Ritzel, R. A., J. J. Meier, et al. (2007). "Human islet amyloid polypeptide oligomers disrupt cell coupling, induce apoptosis, and impair insulin secretion in isolated human islets." *Diabetes* 56(1): 65-71.

Robinson, A. H., C. Pasapula, et al. (2009). "Surgical aspects of the diabetic foot." *J Bone Joint Surg Br* 91(1): 1-7.

Rocha-Gonzalez, H. I., M. Ambriz-Tututi, et al. (2008). "Resveratrol: a natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases." *CNS Neurosci Ther* 14(3): 234-47.

Roy, S., S. Khanna, et al. (2002). "Anti-angiogenic property of edible berries." *Free Radic Res* 36(9): 1023-31.

Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." *Nature* 414(6865): 799-806.

Sanchez-Moreno, C. (2002). "Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems." 8: 121-137.

Scalbert, A., C. Manach, et al. (2005). "Dietary polyphenols and the prevention of diseases." *Crit Rev Food Sci Nutr* 45(4): 287-306.

Schattenberg, J. M., R. Singh, et al. (2006). "JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice." *Hepatology* 43(1): 163-72.

Scheen, A. J. and L. F. Van Gaal (2007). "Rimonabant as an adjunct therapy in overweight/obese patients with type 2 diabetes." *Eur Heart J* 28(11): 1401-2; author reply 1402.

Schmidt, B. M., J. W. Erdman, Jr., et al. (2006). "Differential effects of blueberry proanthocyanidins on androgen sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines." *Cancer Lett* 231(2): 240-6.

Scholz, S. and G. Williamson (2007). "Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols in vivo." *Int J Vitam Nutr Res* 77(3): 224-35.

Schroeter, H., C. Boyd, et al. (2002). "MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide." *Neurobiol Aging* 23(5): 861-80.

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

Seeram, N. P., L. S. Adams, et al. (2006). "Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro." *J Agric Food Chem* 54(25): 9329-39.

Seeram, N. P., M. Aviram, et al. (2008). "Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States." *J Agric Food Chem* 56(4): 1415-22.

Seeram, N. P., R. Lee, et al. (2004). "Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice." *Clin Chim Acta* 348(1-2): 63-8.

Seeram, N. P., R. A. Momin, et al. (2001). "Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries." *Phytomedicine* 8(5): 362-9.

Shaw, R. J. (2008). "mTOR signaling: RAG GTPases transmit the amino acid signal." *Trends Biochem Sci* 33(12): 565-8.

Shi, H., M. V. Kokoeva, et al. (2006). "TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance." *J Clin Invest* 116(11): 3015-25.

Shukitt-Hale, B., A. N. Carey, et al. (2007). "Beneficial effects of fruit extracts on neuronal function and behavior in a rodent model of accelerated aging." *Neurobiol Aging* 28(8): 1187-94.

Shukitt-Hale, B., R. L. Galli, et al. (2005). "Dietary supplementation with fruit polyphenolics ameliorates age-related deficits in behavior and neuronal markers of inflammation and oxidative stress." *Age* 27: 49-57.

Shukitt-Hale, B., F. C. Lau, et al. (2008). "Blueberry polyphenols attenuate kainic acid-induced decrements in cognition and alter inflammatory gene expression in rat hippocampus." *Nutr Neurosci* 11(4): 172-82.

Singh, M., M. Arseneault, et al. (2008). "Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms." *J Agric Food Chem* 56(13): 4855-73.

Sladek, R., G. Rocheleau, et al. (2007). "A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes." *Nature* 445(7130): 881-5.

Solfrizzi, V., F. Panza, et al. (2003). "The role of diet in cognitive decline." *J Neural Transm* 110(1): 95-110.

Spencer, J. P., M. M. Abd El Mohsen, et al. (2008). "Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research." *Br J Nutr* 99(1): 12-22.

Spencer, J. P., F. Chaudry, et al. (2000). "Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu." *Biochem Biophys Res Commun* 272(1): 236-41.

Srinivasan, B. T., J. Jarvis, et al. (2008). "Recent advances in the management of type 2 diabetes mellitus: a review." *Postgrad Med J* 84(996): 524-31.

Srinivasan, K. and P. Ramarao (2007). "Animal models in type 2 diabetes research: an overview." *Indian J Med Res* 125(3): 451-72.

Srivastava, A., C. C. Akoh, et al. (2007). "Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles." *J Agric Food Chem* 55(7): 2705-13.

Steinmetz, K. A. and J. D. Potter (1996). "Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review." *J Am Diet Assoc* 96(10): 1027-39.

Stevenson, D. E., J. M. Cooney, et al. (2007). "Comparison of the relative recovery of polyphenolics in two fruit extracts from a model of degradation during digestion and metabolism." *Mol Nutr Food Res* 51(8): 939-45.

Stoner, G. D., L. S. Wang, et al. (2008). "Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries." *Carcinogenesis* 29(9): 1665-74.

Stratton, I. M., A. I. Adler, et al. (2000). "Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study." *Bmj* 321(7258): 405-12.

Strissel, K. J., Z. Stancheva, et al. (2007). "Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications." *Diabetes* 56(12): 2910-8.

Stromberg, I., C. Gemma, et al. (2005). "Blueberry- and spirulina-enriched diets enhance striatal dopamine recovery and induce a rapid, transient microglia activation after injury of the rat nigrostriatal dopamine system." *Exp Neurol* 196(2): 298-307.

Sun, M. K. and D. L. Alkon (2006). "Protein kinase C pharmacology: perspectives on therapeutic potentials as antidementic and cognitive agents." *Recent Patents CNS Drug Discov* 1(2): 147-56.

Suzawa, M., I. Takada, et al. (2003). "Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade." *Nat Cell Biol* 5(3): 224-30.

Sweeney, M. I., W. Kalt, et al. (2002). "Feeding rats diets enriched in lowbush blueberries for six weeks decreases ischemia-induced brain damage." *Nutr Neurosci* 5(6): 427-31.

Taruscio, T. G., D. L. Barney, et al. (2004). "Content and profile of flavanoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest *Vaccinium* berries." *J Agric Food Chem* 52(10): 3169-76.

Theocharis, A. D., I. Tsolakis, et al. (1999). "Human abdominal aortic aneurysm is closely associated with compositional and specific structural modifications at the glycosaminoglycan level." *Atherosclerosis* 145(2): 359-68.

Theuwissen, E. and R. P. Mensink (2008). "Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease." *Physiol Behav* 94(2): 285-92.

Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (2008). "Reactive oxygen species and hypertension: a complex association." *Antioxid Redox Signal* 10(6): 1041-4.

Tovar, A. M., D. C. Cesar, et al. (1998). "Age-related changes in populations of aortic glycosaminoglycans: species with low affinity for plasma low-density lipoproteins, and not species with high affinity, are preferentially affected." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(4): 604-14.

Tremblay, F., S. Brule, et al. (2007). "Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(35): 14056-61.

Tsukumo, D. M., M. A. Carvalho-Filho, et al. (2007). "Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance." *Diabetes* 56(8): 1986-98.

Vainio, H. and E. Weiderpass (2006). "Fruit and vegetables in cancer prevention." *Nutr Cancer* 54(1): 111-42.

Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84.

Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* 160(1): 1-40.

Van Gaal, L. F., A. J. Scheen, et al. (2008). "Long-term effect of CB1 blockade with rimonabant on cardiometabolic risk factors: two year results from the RIO-Europe Study." *Eur Heart J* 29(14): 1761-71.

Vidavalur, R., H. Otani, et al. (2006a). "Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited." *Exp Clin Cardiol* 11(3): 217-25.

Viljanen, K., P. Kylli, et al. (2004). "Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics." *J Agric Food Chem* 52(24): 7419-24.

Vitaglione, P., G. Donnarumma, et al. (2007). "Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides." *J Nutr* 137(9): 2043-8.

- Vuong, T., L. Martin, et al. (2006). "Antioxidant activity of fermented berry juices and their effects on nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in macrophage 264.7 gamma NO(-) cell line." *Journal of Food Biochemistry* 30(3): 249-268.
- Vuong, T., L. C. Martineau, et al. (2007). "Fermented Canadian lowbush blueberry juice stimulates glucose uptake and AMP-activated protein kinase in insulin-sensitive cultured muscle cells and adipocytes." *Can J Physiol Pharmacol* 85(9): 956-65.
- Wang, Y., C. F. Chang, et al. (2005). "Dietary supplementation with blueberries, spinach, or spirulina reduces ischemic brain damage." *Exp Neurol* 193(1): 75-84.
- Wellen, K. E. and G. S. Hotamisligil (2005). "Inflammation, stress, and diabetes." *J Clin Invest* 115(5): 1111-9.
- Westermarck, P., C. Wernstedt, et al. (1987). "Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(11): 3881-5.
- Whitmer, R. A. (2007). "The epidemiology of adiposity and dementia." *Curr Alzheimer Res* 4(2): 117-22.
- Wijesekara, N., F. S. L. Thong, et al. (2006). "Diverse Signals Regulate Glucose Uptake into Skeletal Muscle." *Canadian journal of diabetes* 30(1): 80-88.
- Willcox, B. J., J. D. Curb, et al. (2008). "Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic studies." *Am J Cardiol* 101(10A): 75D-86D.
- Willcox, J. K., S. L. Ash, et al. (2004). "Antioxidants and prevention of chronic disease." *Crit Rev Food Sci Nutr* 44(4): 275-95.
- Williams, C. M., M. A. El Mohsen, et al. (2008). "Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels." *Free Radic Biol Med* 45(3): 295-305.
- Williamson, G. and B. Holst (2008). "Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction?" *Br J Nutr* 99 Suppl 3: S55-8.

Williamson, G. and C. Manach (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies." *Am J Clin Nutr* 81(1 Suppl): 243S-255S.

Willis, L., P. Bickford, et al. (2005). "Blueberry extract enhances survival of intraocular hippocampal transplants." *Cell Transplant* 14(4): 213-23.

Willis, L. M., B. J. Small, et al. (2008). "Dietary blueberry supplementation affects growth but not vascularization of neural transplants." *J Cereb Blood Flow Metab* 28(6): 1150-64.

Witters, L. A., B. E. Kemp, et al. (2006). "Chutes and Ladders: the search for protein kinases that act on AMPK." *Trends Biochem Sci* 31(1): 13-6.

Wolfe, K. L., X. Kang, et al. (2008). "Cellular antioxidant activity of common fruits." *J Agric Food Chem* 56(18): 8418-26.

Wolfe, K. L. and R. H. Liu (2007). "Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements." *J Agric Food Chem* 55(22): 8896-907.

Woods, A., K. Dickerson, et al. (2005). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells." *Cell Metab* 2(1): 21-33.

Wu, X., G. R. Beecher, et al. (2004). "Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States." *J Agric Food Chem* 52(12): 4026-37.

Wu, X., G. R. Beecher, et al. (2006). "Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption." *J Agric Food Chem* 54(11): 4069-75.

Wu, X., G. Cao, et al. (2002). "Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry." *J Nutr* 132(7): 1865-71.

Wu, X. and R. L. Prior (2005a). "Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains." *J Agric Food Chem* 53(8): 3101-13.

Wu, X. and R. L. Prior (2005b). "Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries." *J Agric Food Chem* 53(7): 2589-99.

Yach, D., D. Stuckler, et al. (2006). "Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes." *Nat Med* 12(1): 62-6.

Yacoubian, T. A. and D. G. Standaert (2008). "Targets for neuroprotection in Parkinson's disease." *Biochim Biophys Acta*.

Yancheva, S., R. Ihl, et al. (2009). "Ginkgo biloba extract EGb 761(R), donepezil or both combined in the treatment of Alzheimer's disease with neuropsychiatric features: a randomised, double-blind, exploratory trial." *Aging Ment Health* 13(2): 183-90.

Yasuhara, T., K. Hara, et al. (2008). "Dietary supplementation exerts neuroprotective effects in ischemic stroke model." *Rejuvenation Res* 11(1): 201-14.

Yeum, K. J., R. M. Russell, et al. (2004). "Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma." *Arch Biochem Biophys* 430(1): 97-103.

Yoshizaki, T., H. Sato, et al. (2002). "Recent advances in the regulation of matrix metalloproteinase 2 activation: from basic research to clinical implication (Review)." *Oncol Rep* 9(3): 607-11.

Youdim, K. A., J. McDonald, et al. (2002). "Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled)." *J Nutr Biochem* 13(5): 282-288.

Yu, C., Y. Chen, et al. (2002). "Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle." *J Biol Chem* 277(52): 50230-6.

Zadernowski, R., M. Naczek, et al. (2005). "Phenolic acid profiles in some small berries." *J Agric Food Chem* 53(6): 2118-24.

Zafra-Stone, S., T. Yasmin, et al. (2007). "Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention." *Mol Nutr Food Res* 51(6): 675-83.

Zheng, W. and S. Y. Wang (2003). "Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries." *J Agric Food Chem* 51(2): 502-9.

Zhu, Q. Y., R. R. Holt, et al. (2002). "Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa." *J Agric Food Chem* 50(6): 1700-5.

Zhu, Y., P. C. Bickford, et al. (2008). "Blueberry Opposes beta-Amyloid Peptide-Induced Microglial Activation Via Inhibition of p44/42 Mitogen-Activation Protein Kinase." *Rejuvenation Res* 11(5): 891-901.

Zou, M. H., S. S. Kirkpatrick, et al. (2004). "Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species." *J Biol Chem* 279(42): 43940-51.