



HAL
open science

Insulinorésistance et stress oxydant dans le syndrome métabolique : étude expérimentale des effets protecteurs de microconstituants nutritionnels (Polyphénols du thé, de la cannelle et chrome III)

Rachida Benaraba

► **To cite this version:**

Rachida Benaraba. Insulinorésistance et stress oxydant dans le syndrome métabolique : étude expérimentale des effets protecteurs de microconstituants nutritionnels (Polyphénols du thé, de la cannelle et chrome III). Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00447570

HAL Id: tel-00447570

<https://theses.hal.science/tel-00447570>

Submitted on 15 Jan 2010

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1
SCIENCES – TECHNOLOGIE – SANTE

Année 2007

N°

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Environnement et Santé

présentée et soutenue publiquement le 17 septembre 2007

par

Rachida BENARABA

Insulinorésistance et stress oxydant dans le syndrome métabolique :

Etude expérimentale des effets protecteurs de microconstituants

nutritionnels (polyphénols du thé, de la cannelle et chrome III)

Directeur de thèse : Dr. Isabelle Hininger-Favier

JURY

Professeur Joëlle GOUDABLE	Rapporteur
Docteur Edmond ROCK	Rapporteur
Docteur Richard A ANDERSON	Examineur
Professeur Denis MALVY	Examineur
Professeur Anne-Marie ROUSSEL	Examineur
Docteur Isabelle HININGER-FAVIER	Directeur de thèse

Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée – INSERM U884

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée (LBFA/INSERM 884), au sein de l'équipe : Mitochondrie, Vieillesse et Stress oxydant dirigée par le Professeur Anne Marie ROUSSEL. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements pour son accueil bienveillant au sein du laboratoire, pour sa rigueur scientifique et ses encouragements ainsi que pour la confiance qu'elle m'a constamment témoignée.

Je remercie infiniment le Docteur Richard A. ANDERSON pour sa précieuse collaboration dans ce travail, et pour avoir accepté de venir en Europe honorer de sa présence mon jury de thèse. Qu'il me soit permis de lui exprimer dans ces lignes toute ma reconnaissance et mon profond respect.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Joëlle GOUDABLE pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger mon travail et d'être mon rapporteur. Je la remercie pour sa disponibilité et ses remarques constructives.

Mes remerciements sincères et respectueux vont également au Docteur Edmond ROCK, pour avoir accepté de consacrer du temps, examiner et juger ce travail comme rapporteur, et pour siéger dans ce jury en y apportant sa compétence et son expertise.

Je remercie vivement le Professeur Denis MALVY, pour sa participation à mon jury de thèse et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail, qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Je voudrais témoigner ma reconnaissance à Isabelle HININGER-FAVIER, pour avoir encadré cette thèse. Je la remercie particulièrement pour son exigence, sa disponibilité, ses encouragements, et ses conseils très précieux, je suis très reconnaissante de la confiance qu'elle m'a témoignée.

Je remercie particulièrement Madame Mireille OSMAN pour son aide et ses compétences techniques, sa très grande disponibilité, et sa gentillesse.

Je souhaite exprimer mes sincères et profonds remerciements à tous les autres membres du laboratoire pour leur aide, leurs encouragements et l'ambiance amicale qu'ils ont su créer.

Mes remerciements sincères vont également :

- *à Kita VALENTI (Département de Biologie Intégrée) pour sa gentillesse et ses conseils sur la partie expérimentale de ce travail sur l'expression des gènes.*
- *au Docteur Henri FAURE (Département de Biologie Intégrée) pour avoir accepté de réaliser le dosage des bases oxydées de l'ADN.*

Enfin que toutes les personnes des laboratoires NVMC et ORSOX, et particulièrement les anciens thésards, trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.

Enfin, j'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce présent travail.

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
Sommaire	4
Liste des abréviations	6
Avant propos et problématique	9
PREMIERE PARTIE : ETAT DE LA QUESTION	12
I - Le syndrome métabolique	13
I-1 - Historique.....	13
I-2 Définitions	13
II - Toxicité du glucose : glucotoxicité et radicaux libres	15
II-1 - Rappel sur les radicaux libres et les systèmes antioxydants.....	15
II-1-1 - <i>Les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)</i>	16
II-1-2 - <i>Les défenses antioxydantes</i>	17
II-2 - Métabolisme du glucose et production des radicaux libres.....	20
II-2-1 - <i>La glycation des protéines</i>	20
II-2-2 - <i>Gluco-oxydation</i>	20
II-2-3 - <i>La voie des polyols</i>	21
III - L'insulinorésistance	23
III-1 - La signalisation de l'insuline	23
III-2 - La cascade de l'insuline.....	25
III-3 - Insulinorésistance et stress oxydant.....	28
IV - Régime riche en fructose et insulinorésistance	30
IV-1 - Métabolisme du fructose	31
IV-2 - Fructose et syndrome métabolique.....	31
V - Les polyphénols du thé et de la cannelle	34
V-1 - Généralités	35
V-2 - Le thé.....	36
V-2-1 - <i>Principes actifs du thé</i>	36
V-2-2 - <i>Thé, sensibilité à l'insuline et métabolisme du glucose</i>	41
V-2-3 - <i>Thé et stress oxydant</i>	42
V-3 - La cannelle.....	43
V-3-1 - <i>Historique</i>	43
V-3-2 - <i>Principes actifs de la cannelle</i>	44
V-3-3 - <i>Mécanismes d'action</i>	45
V-3-4 - <i>Etudes animales</i>	47
V-3-5 - <i>Etudes cliniques</i>	48
VI - Le Chrome	49
VI-1 - Historique.....	50
VI-2 - Chrome et insuline.....	50
VI-3 - Apports et statut en chrome.....	52
VI-4 - Chrome et prévention des pathologies.....	54
VI-4-1 - <i>Chrome, syndrome métabolique et obésité</i>	54
VI-4-2 - <i>Chrome et diabète</i>	55
VI-4-3 - Chrome et risque cardiovasculaire.....	57
VI-4-4 - Chrome et stress oxydant.....	57
VII – Conclusions	58
DEUXIEME PARTIE : RESULTATS	60
VIII - Matériel et méthodes	61
VIII-1 - Le modèle animal de syndrome métabolique.....	61
VIII-1-1 - <i>Animaux</i>	61
VIII-1-2 - <i>Régime induisant le syndrome métabolique</i>	61
VIII-2 - Les analyses biologiques	62
VIII-2-1 - <i>Prélèvements</i>	62
VIII-2-2 - <i>Préparation des homogénats</i>	62
VIII-2-3 - <i>Analyses biologiques</i>	62
VIII-3 - Etude sur culture cellulaire	70

VIII-3-1 - Modèle cellulaire :	70
VIII-3-2 - Test de cytotoxicité : Test au MTT	72
VIII-3-3 - Test de cytotoxicité à la LDH (lactate déshydrogénase)	73
VIII-3-4 - Stress oxydant induit par H ₂ O ₂	73
VIII-3-5 - Dosage des bases oxydées (8-OH-dG) de l'ADN extrait des cellules HaCaT	75
VIII-3-6 - Différentes formes de chrome étudiées	76
VIII-4 - Etude de l'expression des gènes antioxydants et de réparation de l'ADN des cellules (Biopuce).....	76
VIII-4-1 - Extraction des ARNs totaux	77
VIII-4-2 - Dosage et contrôle qualité des extractions des ARNs totaux	78
VIII-4-3 - Synthèse et hybridation de l'ADNc radioactif.....	78
IX - Résultats	81
IX-1 – Polyphénols du thé vert.....	82
IX-1-1 - Contexte de la recherche	82
IX-1-2 - Présentation de la publication A :	83
IX-1-3 - Publication A	86
IX-1-4 - Présentation des résultats de la publication B.....	98
IX-1-5 - Publication B	103
IX-2 – Polyphénols de la cannelle.....	122
IX-2-1 - Contexte de la recherche	122
IX-2-2 - Présentation des résultats de la publication C	123
IX-2-3 - Publication C	125
IX-2-4 - Présentation des résultats de la publication D :	138
IX-2-5 - Publication D.....	140
IX-3 - Histidinate de chrome : absence de toxicité et propriétés antioxydantes potentielles	153
IX-3-1 - Contexte de la recherche	153
IX-3-2 - Présentation des résultats de la publication E :	154
IX-3-3 - Publication E	160
IX-3-4 - Présentation des résultats de la publication F.....	177
IX-3-5 - Publication F	182
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	202
X - Discussion générale et perspectives	203
X-1 - Principaux résultats.....	203
X-2 - Limites de nos résultats.....	205
X-3 - Perspectives	207
BIBLIOGRAPHIE	208
XI – Bibliographie	209
Publications issues de la thèse	237
ANNEXES.....	238
RESUME.....	246

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AGE	Produits de glycation avancée (Advanced Glycation End products)
AGL	Acide gras libre
ANC	Apport nutritionnel conseillé
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique total
CAP	c-Cb1 associated protein
Caspas	Cysteine activated aspartate directed protease
Cat	Catalase
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CoA	Coenzyme-A
CoQ10	Ubiquinone
DMSO	Diméthylsulfoxyde
4E-BP 1	4E binding protein 1
EC	Epicatéchine
ECG	Epicatéchine-3-gallate
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
EGC	Epigallocatechine
EGCG	Epigallocatechine-3-gallate
Ec-SOD	Superoxyde dismutase extracellulaire
ERK	Extracellular signal regulated kinase
ERO	Espèces réactive de l'oxygène
ESTs	Expressed sequence tags (étiquette de l'ADNc)
FDA	Food and Drug Administration
FK	Fructokinase
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
GLUT-1	Transporteur membranaire du glucose-1
GLUT-4	Transporteur membranaire du glucose-4
GPx	Glutathion peroxydase
GRase	Glutathion réductase
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3	Glycogène synthase 3 kinase
GSH	Glutathion (réduit)
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion S-transférase
HbA1c	L'hémoglobine glycosylée
HDL	Lipoprotéine de haute densité (High Density Lipoprotein)
HFCS	High fructose corn syrup

HMG-CoA	Hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
IMC	Indice de masse corporelle
IGF1	Insulin like growth factor-1
IR	Insulin récepteur
IRS	Insulin receptor substrate
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Lipoprotéine de basse densité (Low Density Lipoprotein)
LPL	Lipoprotéine Lipase
MAPK	Mitogen activating protein (MAP) kinase
MDA	Malonedialdéhyde (aldéhyde malonique)
MEC	Matrice extracellulaire
Msr	Méthionine sulfoxyde réductase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
NAC	N-acétyl-Cystéine
NADPH,H⁺/NADP⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit/oxydé
NADH,H⁺/NAD⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit/oxydé
NCEP	National Cholesterol Education Program
NF-κb	Nuclear factor kappa B
NO[°]	Oxyde nitrique (monoxyde d'azote)
¹O₂	Oxygène singulet
O₂^{°-}	Radical superoxyde
OH[°]	Radical hydroxyle
8-OH-dG	8-hydroxy-2'-désoxyguanosine
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONOO⁻	Peroxynitrite
PCR	Réaction en chaine par polymérase (Polymerase Chain Reaction)
PCR Q	PCR quantitative
PDK	Phosphatidylinositol-dependent kinase
PH	Domaine d'homologie avec la pleckstrine (Plextrin homology)
PI	Phosphate inorganique
PI-3 K	Phosphatidyl-inositol -3- Kinase
PIP3	Phosphatidyl-inositol-3-phosphate
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine Kinase C
PTB	Phosphotyrosine binding
RLO	Radicaux libres de l'oxygène
ROH	Alcool
ROOH	Hydroperoxyde
RO[°]	Radical alkoxyde

ROO°	Radical peroxyde
ROS	Espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species)
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
SD	Succinate déshydrogénase
SH2	Src homology 2
Shc	Src homology 2/α collagen-related
SHP2	SH2 domain protein tyrosine phosphatase-2
SM	Syndrome Métabolique
SOD	Superoxyde dismutase
SOD(Cu/Zn)	Superoxyde dismutase à cuivre et zinc
SOD(Mn)	Superoxyde dismutase à manganèse
SOS	Son of sevenless
TEAC	Trolox equivalent antioxidant activity
TBARS	Espèces réactives de l'acide thiobarbiturique
TNFα	Facteur nécrosant de tumeur (Tumor necrosis factor)
TXN	Thiorédoxine
UV	Ultraviolet violet
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité (Very Low Density Lipoprotein)
XPC	Xeroderma pigmentosum de type C
ZDF	Zucker diabetic fatty

Avant propos et problématique

L'augmentation des facteurs de risques associés aux maladies cardiovasculaires et au diabète tels que l'obésité, l'hypertension artérielle, l'insulinorésistance et les dyslipidémies a fait émerger la notion de syndrome métabolique. Le nombre de sujets atteints par le syndrome métabolique ne cesse d'augmenter dans les populations des pays industrialisés. Cette épidémie, qui est révélatrice d'un problème croissant de santé publique, est liée à des conditions principalement environnementales, où les erreurs alimentaires occupent une place prépondérante. La prévention nutritionnelle du syndrome métabolique est, en conséquence, un objectif de santé publique important, et l'identification de facteurs nutritionnels susceptibles de combattre le syndrome métabolique est un enjeu socio-économique important.

Chez les sujets souvent en surpoids et développant un syndrome métabolique s'installe un stress oxydant non contrôlé. Cause ou conséquence de l'insulinorésistance, qui est la caractéristique majeure du syndrome métabolique, ce stress oxydant entraîne des dommages cellulaires et vasculaires qui conduisent aux complications oxydatives du diabète (rétinopathies et glomérulopathies). En parallèle, chez ces patients, les défenses antioxydantes sont souvent abaissées, aggravant ainsi le stress oxydant.

Les antioxydants d'origine alimentaire sont donc, dans le syndrome métabolique, et de façon générale, des facteurs importants de lutte et de prévention. Compte tenu de la diminution de la sensibilité à l'insuline qui se développe également dans cette pathologie, les facteurs nutritionnels qui améliorent la sensibilité à l'insuline et ont, de surcroît, un fort pouvoir antioxydant, devraient agir efficacement et réduire les altérations métaboliques et l'incidence du diabète et des maladies cardiovasculaires chez ces patients. Si cette hypothèse se confirmait, une stratégie simple d'identification de tels facteurs nutritionnels et de prévention nutritionnelle du syndrome métabolique pourrait être mise en œuvre, et répondre ainsi à un problème important de Santé publique.

Parmi les nutriments à prendre en compte, les polyphénols occupent une place de choix. Ceux du thé et de la cannelle font partie des nutriments qui pourraient agir à la fois comme potentialisateurs de l'insuline et comme antioxydants. Cependant, malgré l'évidence de leur intérêt potentiel dans la prévention du syndrome métabolique, peu de travaux à ce jour se sont intéressés à vérifier l'effet de leur consommation à la fois sur la modulation du stress oxydant et sur la sensibilité à l'insuline dans le syndrome métabolique.

Parmi les micronutriments également d'intérêt, le chrome III, oligoélément essentiel, est, lui, largement décrit pour son rôle potentialisateur de l'insuline. Or, récemment, il a été suggéré qu'il pouvait avoir aussi des propriétés antioxydantes. Il devrait, de ce fait, prendre une large part à la prévention nutritionnelle du syndrome métabolique. Cependant, son utilisation dans la prévention de l'insulinorésistance reste controversée, en particulier compte tenu de sa possible toxicité au long cours.

Ce travail de thèse a eu comme objectif de décrire la relation stress oxydant / insulinorésistance dans le syndrome métabolique, et la modulation de cette relation par des nutriments choisis pour être potentiellement antioxydants et/ou potentialisateurs de l'insuline.

Nous avons ainsi étudié :

- le thé vert dont les catéchines ont été décrites *in vivo* et *in vitro* comme de puissants antioxydants et insulino-potentialisateurs (publications A et B) ;
- la cannelle dont les polyphénols ont fait l'objet de travaux récents démontrant leurs propriétés bénéfiques pour améliorer l'insulinorésistance (publications C et D) ;
- le chrome III.

Pour le chrome III, oligoélément essentiel, dont l'effet potentialisateur de l'insuline a été largement décrit dans le diabète de type 2, nous nous sommes attachés, dans la dernière partie expérimentale de ce travail, à démontrer non seulement son absence de toxicité (publication E) mais aussi son rôle dans la modulation de l'expression de gènes impliqués dans la défense antioxydante (publication F).

Après une première partie qui présentera l'état de la question, nous décrirons le matériel et les méthodes utilisés au cours de ce travail.

Les résultats des travaux ayant donné lieu ou soumis à publications seront ensuite présentés. A partir d'un modèle animal de syndrome métabolique et d'insulinorésistance induit par un régime riche en fructose, nous avons mesuré les modifications des paramètres circulants et tissulaires du stress oxydant, ainsi que celles de la cascade de l'insuline, par des régimes contenant des extraits de thé vert. L'étude de l'effet des régimes sur la signalisation de l'insuline et de l'expression des gènes impliqués dans le syndrome métabolique a été réalisée au Centre de Nutrition Humaine de Beltsville (USA), dans le groupe du Dr Richard Anderson, par le Dr Heping Cao que nous remercions vivement.

En ce qui concerne la cannelle, ses effets antioxydants ont été démontrés dans le modèle animal de syndrome métabolique, puis appliqués à l'homme dans une étude clinique d'intervention chez des sujets en surpoids et en syndrome métabolique.

Enfin, l'étude de la toxicité potentielle du chrome III et de son effet sur l'expression des gènes antioxydants a été réalisée sur culture cellulaire de kératinocytes exposés ou non à un stress oxydant.

La présentation de nos résultats reprendra l'ensemble des publications, acceptées ou soumises, issues de cette thèse. Nous terminerons par une discussion visant à synthétiser nos résultats, leurs limites, et les perspectives ouvertes par ce travail.

PREMIERE PARTIE : ETAT DE LA QUESTION

I - Le syndrome métabolique

I-1 - Historique

En 1988, Reaven propose d'individualiser en syndrome, qu'il dénomme "syndrome X", aujourd'hui syndrome métabolique (SM), l'association de troubles de la tolérance au glucose, d'hypertension artérielle, d'hypertriglycémie, d'obésité, et d'insulinorésistance. Il suggère que la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie sont les causes premières de ces anomalies, et sont par là responsables de l'athérosclérose qu'elles provoquent (Reaven, 1988). L'existence même du syndrome est confirmée par des études de population (Ferrannini *et al.*, 1991) (Haffner *et al.*, 1992). Bien que l'hérédité soit un des facteurs de ce syndrome, la grande majorité des cas est plutôt liée à un style de vie sédentaire et à une mauvaise alimentation, d'où l'intérêt d'une stratégie de prévention nutritionnelle précoce.

La France n'est pas épargnée par l'épidémie de syndrome métabolique. Déjà, les données recueillies dans le cadre de l'enquête "MONICA" à Lille, à Strasbourg et à Toulouse, montraient que la prévalence du syndrome métabolique était presque deux fois plus élevée dans le Nord de la France que dans le Sud, et qu'elle augmentait avec l'âge, en doublant dans la tranche d'âge de 40 à 60 ans. L'étude "DESIR" a retrouvé une prévalence de 10 % chez les hommes et 7 % chez les femmes, qui augmente avec l'âge (Balkau *et al.*, 2003).

I-2 Définitions

Le syndrome métabolique (SM) a été reconnu par l'OMS en 1998 et par les instances américaines en 2001, chacun l'ayant individualisé par une définition différente (Deen, 2004).

L'OMS (Alberti *et Zimmet*, 1998) a défini le syndrome métabolique par une insulinorésistance identifiée par la présence d'un diabète de type II (glycémie à jeun $\geq 6,1$ mmol/l) ou une hyperglycémie orale provoquée (glycémie $\geq 1,40$ g/l deux heures après la prise de 75 g de glucose) associée à au moins deux des facteurs suivants :

- obésité : obésité globale avec IMC (indice de masse corporelle) ≥ 30 kg/m² et/ou ratio taille sur hanches $> 0,9$ chez l'homme et $> 0,85$ chez la femme.
- hypertriglycémie : triglycérides $\geq 1,50$ g/l (ou 1,7 mmol/l).
- HDL cholestérol bas : HDLc $< 0,35$ g/l (ou 0,9 mmol/l) chez l'homme et $< 0,39$ g/l (ou 1,0 mmol/l) chez la femme.

- hypertension artérielle : pression artérielle systolique ≥ 140 mmHg ou diastolique ≥ 90 mmHg ou traitement anti-hypertenseur.
- microalbuminurie : albuminurie ≥ 20 $\mu\text{g}/\text{min}$ ou rapport albumine/créatinine ≥ 20 mg/g.

Ensuite, les critères cliniques développés par l'OMS ont été simplifiés (Adult Treatment Panel III of the National Cholesterol Education Program) (NCEP, 2001) afin de rendre le concept du syndrome métabolique "facile à utiliser" pour les cliniciens. Le syndrome métabolique est défini par la présence de trois des facteurs suivants ou plus :

- glycémie : à jeun $\geq 6,1$ mmol/l (ou 1,1 g/l).
- obésité abdominale : tour de taille > 102 cm chez les hommes et > 88 cm chez les femmes.
- hypertriglycémie : triglycérides $\geq 1,50$ g/l ou 1,7 mmol/l.
- HDL Cholestérol bas : HDLc $< 0,40$ g/l (ou 1,04 mmol/l) chez les hommes et $< 0,50$ g/l (ou 1,29 mmol/l) chez les femmes.
- hypertension artérielle : tension artérielle : systolique ≥ 130 mm Hg ou diastolique ≥ 85 mm Hg ou traitement anti-hypertenseur.

Cette définition reste aujourd'hui la plus utilisée en pratique clinique et dans les études scientifiques. Deux facteurs semblent émerger : l'insulinorésistance et l'obésité abdominale qui, selon Reaven récemment (Reaven, 2006) entraîneraient les autres signes de syndrome métabolique.

L'obésité et l'insulinorésistance ont été identifiées comme les causes primaires et fondamentales du syndrome métabolique, avec un rôle certain de l'obésité (régimes riches en graisses et en sucres d'absorption rapide dit "régime cafétéria") dans l'origine de l'insulinorésistance. Celle-ci se caractérise par une résistance des cellules de notre organisme à l'action de l'insuline, induisant une augmentation de l'insulinémie, et conduisant ainsi directement ou indirectement aux différentes autres anomalies du syndrome métabolique. L'insulinorésistance s'accompagne d'une élévation de la glycémie, et peut engendrer un diabète de type II. Le métabolisme lipidique est également régulé en partie par l'insuline, particulièrement en période post prandiale. L'insuline active l'action de la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme localisée dans les capillaires, qui hydrolyse les triglycérides des particules circulantes riches en triglycérides (VLDL et chylomicrons). Cet effet conduit à une réduction des particules circulantes riches en triglycérides (VLDL et chylomicrons) et, secondairement, à une réduction des LDL circulantes et des dyslipidémies athérogènes.

II - Toxicité du glucose : glucotoxicité et radicaux libres

Lorsqu'il existe un trouble de la glycorégulation, certaines voies de génération des radicaux libres de l'oxygène sont activées. Le stress oxydant ainsi engendré pourrait constituer le mécanisme final commun à l'origine des complications oxydatives associées à l'hyperinsulinémie et à l'hyperlipidémie.

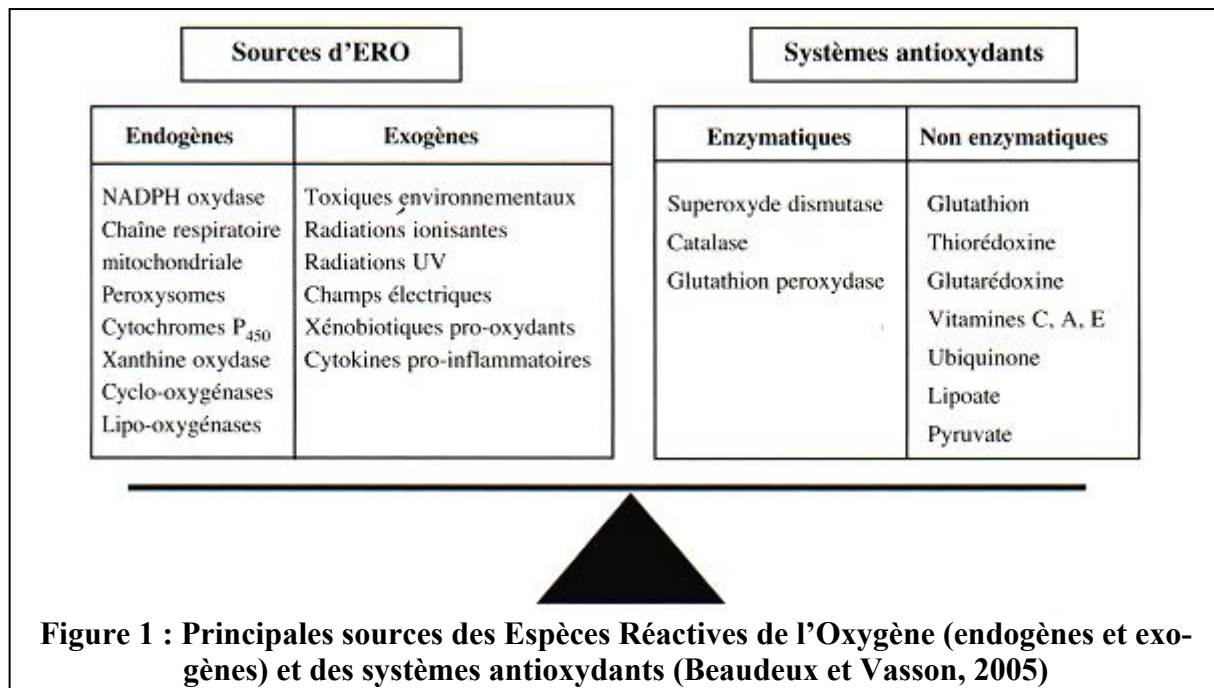
Le glucose extracellulaire en excès va majorer la production de radicaux libres de l'oxygène (RLO) à l'origine de dommages au niveau des tissus.

II-1 - Rappel sur les radicaux libres et les systèmes antioxydants

On trouvera une revue récente dans Karihtala et Soini (2007).

Le stress oxydant apparaît dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces pro-oxydantes et anti-oxydantes est rompu en faveur de l'état pro-oxydant (Sies, 1991).

Dans les systèmes vivants, une production physiologique d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) se fait de manière continue. Dans des conditions pathologiques ou provoquées par des facteurs exogènes, une surproduction de ces espèces réactives est possible. Les défenses antioxydantes, dont une partie est dépendante de l'alimentation, peuvent être insuffisantes pour empêcher les dégâts cellulaires que peuvent causer les radicaux libres oxygénés (Figure 1).



II-1-1 - Les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)

Les radicaux libres sont des espèces chimiques possédant un électron célibataire (ou non apparié) sur leur couche périphérique. Le champ magnétique créé par la rotation de cet électron, ou spin, n'est pas compensé par la rotation en sens inverse d'un électron apparié. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules, dont les composés cellulaires : lipides, protéines et acides nucléiques, notamment lors de réaction en chaînes dont l'exemple le plus connu est celui de la peroxydation des lipides. Les radicaux libres issus de la réduction monovalente de l'oxygène constituent les espèces réactives de l'oxygène.

Les Espèces Réactives Oxygénées (ERO) sont des molécules contenant de l'oxygène, mais dont la réactivité est bien supérieure à celle de la molécule de dioxygène O_2 . Les ERO comprennent des radicaux tels le **superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)**, l'**hydroxyle (OH^{\bullet})**, l'**oxyde nitrique (NO^{\bullet})**, et des espèces non radicalaires telles le **peroxyde d'hydrogène H_2O_2** , l'oxygène singulet (1O_2) et le **peroxynitrite ($ONOO^-$)** (Figure 2). Le superoxyde et l'hydroxyle sont très instables, au contraire d' H_2O_2 qui diffuse librement et a une durée de vie plus longue.

De nombreux facteurs, tels que des perturbations métaboliques dont l'insulinorésistance et l'hyperglycémie, l'inflammation, des agents physiques, la présence d'oxydants exogènes,

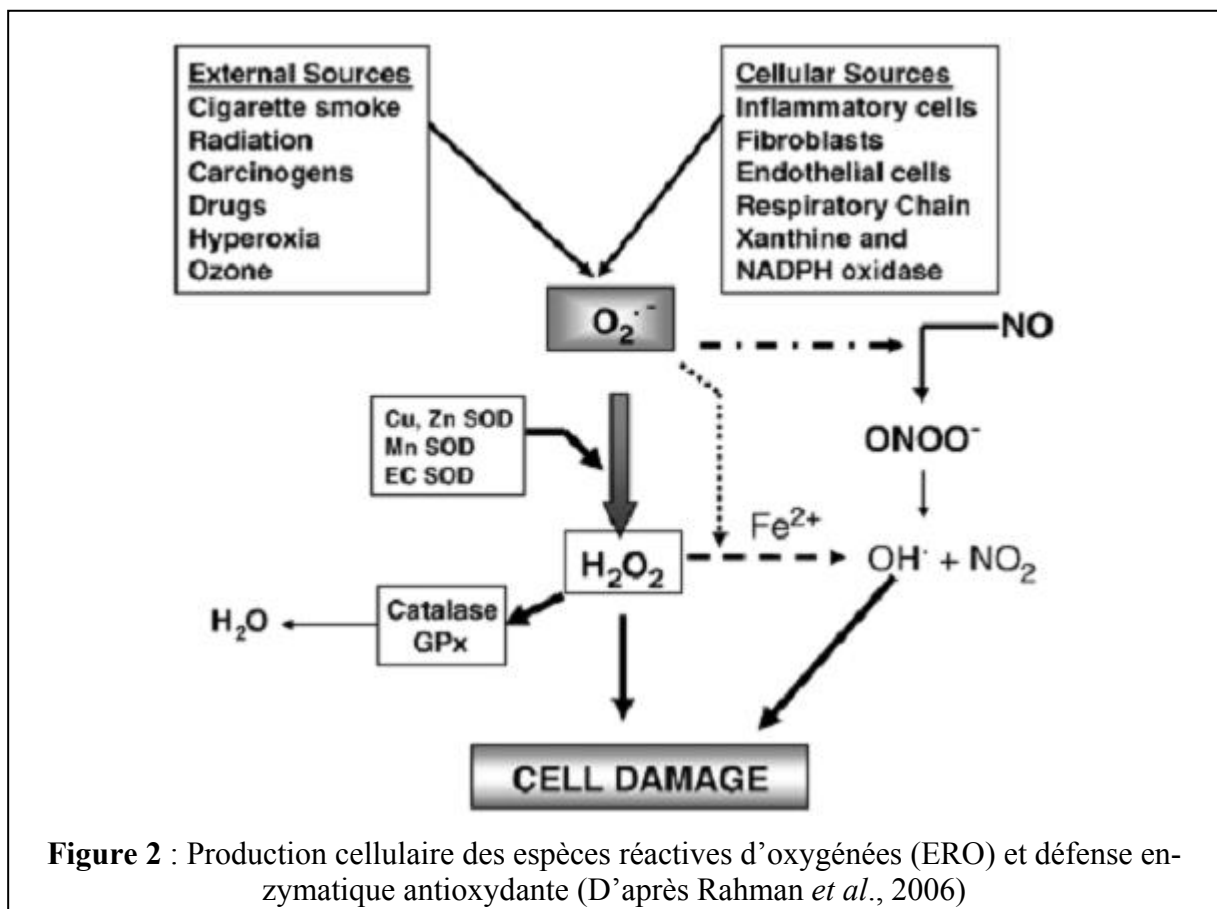


Figure 2 : Production cellulaire des espèces réactives d'oxygénées (ERO) et défense enzymatique antioxydante (D'après Rahman *et al.*, 2006)

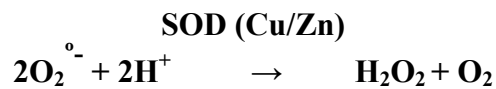
peuvent conduire à la formation accrue des radicaux libres (Morel *et* Barouki, 1999).

II-1-2 - Les défenses antioxydantes

Les enzymes antioxydantes

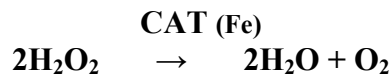
Plusieurs enzymes et systèmes antioxydants endogènes agissent en synergie pour protéger les cellules des dommages oxydatifs. Leur fonction première est d'abaisser la quantité d'ERO ou des produits d'oxydation dans les cellules. Ces enzymes requièrent un ou plusieurs éléments trace (Zn, Cu, Mn, Se, Fe) comme cofacteurs pour leur activité catalytique.

- Les superoxyde dismutases (SOD) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène.

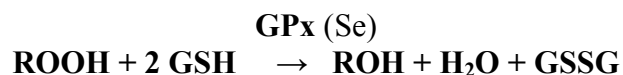
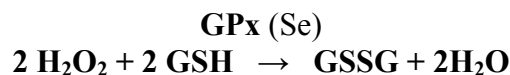


Trois formes de SOD existent chez les mammifères : une forme extra-cellulaire (Ec-SOD), une forme mitochondriale utilisant le manganèse comme cofacteur (Mn-SOD), et une forme cytosolique utilisant le cuivre et le zinc comme cofacteurs (Cu/Zn-SOD).

- La catalase (CAT), est une enzyme hémique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes.



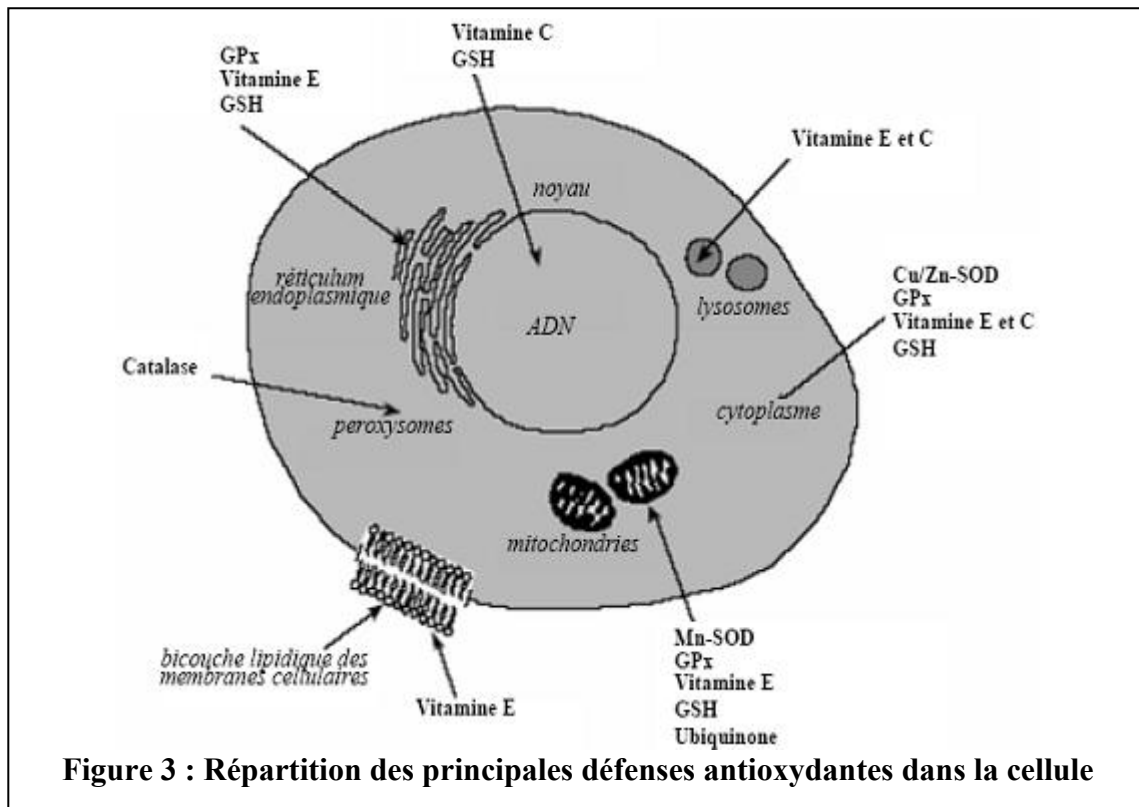
- La glutathion peroxydase (GPx) est une sélénoenzyme présente dans le sang, les membranes et le cytosol. En présence de glutathion réduit (GSH), elle réduit l' H_2O_2 en H_2O et les hydroperoxydes (ROOH) en alcools (ROH).



L'efficacité de la GPx est liée à un flux constant de GSH, et elle est couplée à l'oxydation du glucose-6 phosphate en 6-phospho gluconate, source de NADPH₂ qui est utilisé comme cofacteur par la glutathion réductase (GRase) pour régénérer le GSH:



- La glutathion S-transférase (GST) réduit les hydroperoxydes en alcools mais ne réduit pas H_2O_2 .



Les molécules antioxydantes :

Les antioxydants non enzymatiques, sont des micronutriments exogènes apportés par l'alimentation ou des constituants endogènes. On distingue (Figure 3) les antioxydants hydrosolubles comme le glutathion, l'acide ascorbique (vitamine C), l'acide urique, l'albumine et les antioxydants liposolubles : l'alpha tocophérol (vitamine E), l'ubiquinone (CoQ10), les caroténoïdes.

Le **glutathion** (L-gamma-glutamyl-cystéinyl-glycine, **GSH**) est le thiol intracellulaire le plus abondant. Il convertit les ponts disulfures (S-S) des protéines oxydées en thiols (2 SH) et agit comme substrat de la GPx et de la GST. Le glutathion tamponne l'état redox cellulaire grâce à ses 2 formes : réduite (GSH) et oxydée (GSSG).

La **vitamine E** et le système ubiquinone/ubiquinol existent essentiellement dans les membranes et fonctionnent comme scavengers (piégeurs) d'ERO, prévenant l'oxydation des phospholipides et des lipides en général.

Les **caroténoïdes** (β carotène, lutéine, lycopène, cryptoxanthine, pigments xanthophylles...) sont aussi des scavengers d'ERO et plus particulièrement de l'oxygène singulet (Matsuo, 1993).

La **vitamine C** agit non seulement comme piègeur d'ERO, mais régénère aussi la vitamine E en réduisant les radicaux tocophéryls issus de l'oxydation des tocophérols à la surface des membranes.

La vitamine C oxydée est soit réduite par l'acide alpha lipoïque suivant un réseau antioxydant (vitamine E – vitamine C – acide lipoïque), soit excrétée par les urines.

Parmi les autres molécules à propriétés antioxydantes, il faut aussi citer la céruléoplasmine, l'albumine, les métallothionéines, et l'acide urique qui agissent plutôt comme des molécules "sacrifices".

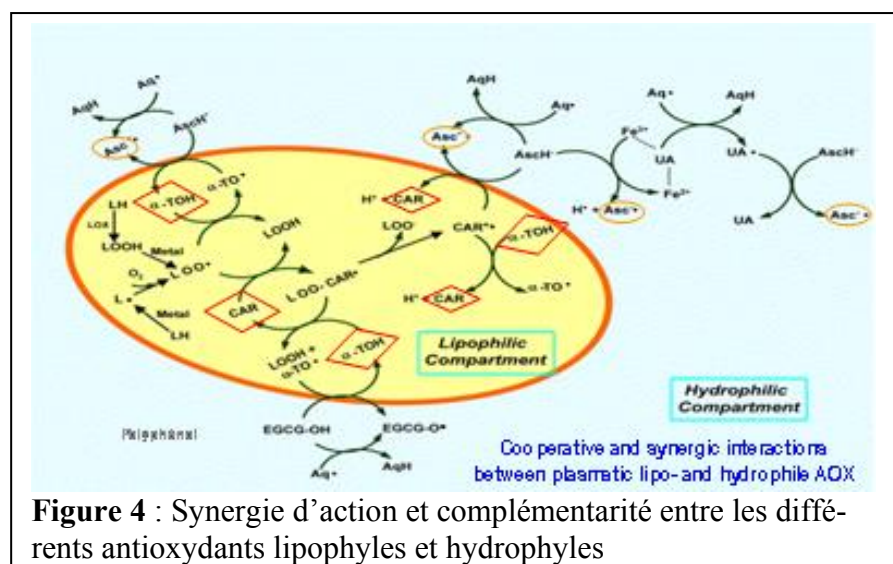
Il arrive cependant que ces systèmes antioxydants ne soient pas suffisamment efficaces pour éviter tout dommage oxydatif. Dans ce cas, une deuxième ligne de défense faisant intervenir des systèmes de réparation est possible. Elle comporte des endonucléases et des glycosylases qui interviennent dans l'élimination des bases oxydées de l'ADN (Gilchrest *et* Bohr, 1997), le système protéasome et les méthionine-sulfoxyde réductases (Msr) qui éliminent les protéines oxydées et régénèrent les méthionines oxydées, et la phospholipase A2 qui hydrolyse les lipides oxydés.

Les polyphénols

(Scalbert *et* Williamson, 2000), qui font l'objet d'une partie de ce travail de thèse, sont apportés par notre alimentation, et ont une activité antioxydante importante, plus élevée par exemple que celle de la vitamine E (Rice-Evans *et al.*,

1995) (McKay *et* Blumberg, 2002).

Il est important de souligner que la protection antioxydante ne peut se résumer à un seul antioxydant mais est, au contraire, la résultante d'une synergie d'action que résume la figure 4.



Dans ce contexte, la prévention nutritionnelle, s'appuyant sur l'étude du rôle bénéfique de nutriments antioxydants, apparaît comme très supérieure aux suppléments antioxydants synthétiques.

II-2 - Métabolisme du glucose et production des radicaux libres

On dénombre trois grands systèmes générateurs de radicaux libres dépendant du glucose à savoir la glycation des protéines, l'activation de la voie des polyols et l'auto-oxydation du glucose.

II-2-1 - La glycation des protéines

Une des conséquences essentielles de l'hyperglycémie est la glycosylation non enzymatique ou glycation des protéines (Figure 5).

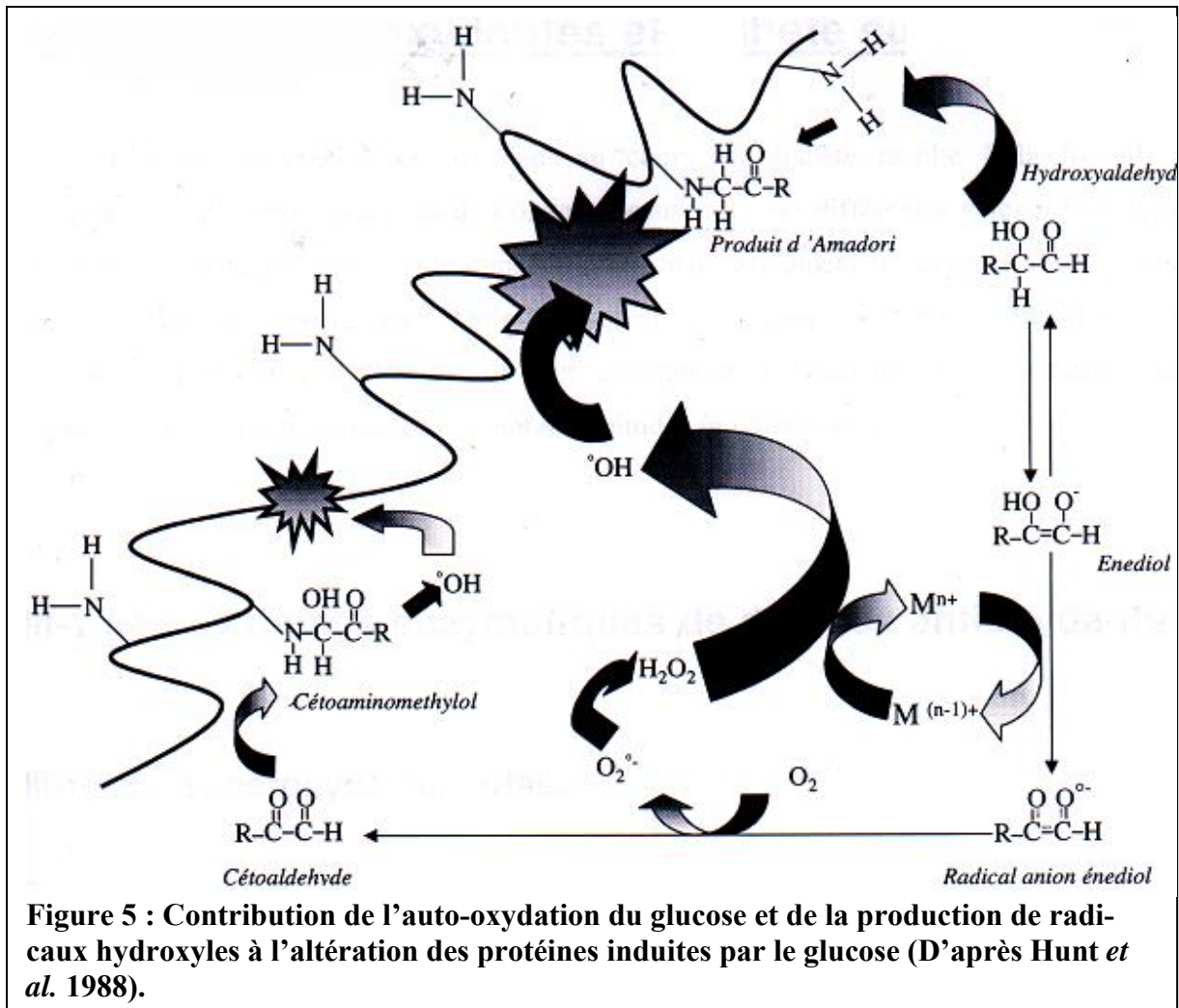
Le glucose réagit selon une réaction non enzymatique avec les groupements aminés des protéines, des acides nucléiques et lipidiques dans une série d'étapes qui se traduisent par la formation de base de Schiff et des produits d'Amadori et aboutit finalement à de gros polymères : les produits avancés de la glycation (AGE) (Advanced Glycation End Product) (Heidland *et al.*, 2001). La formation d'AGE est dépendante des ERO, elle est augmentée par la production de dialdéhyde malonique (MDA) et par la déplétion en glutathion réduit (GSH) (Jain *et Palmer*, 1997).

Les produits d'Amadori présentent la particularité de posséder un groupement cétole. Cette fonction cétole peut, en présence de métaux de transition (situés au niveau de résidus lysine et histidine), céder un électron à l'oxygène moléculaire, conduisant à la formation d'anions superoxydes $O_2^{\cdot-}$. La propriété des protéines glyquées de produire des anions superoxydes a été mise en évidence la première fois par Gillery *et al.* (1988), et confirmée par d'autres auteurs (Sakurai *et Tsuchiya*, 1988).

II-2-2 - Gluco-oxydation

La glycation des protéines peut s'accompagner d'un processus d'oxydation particulier appelé "gluco-oxydation" (Figure 5), qui est manifestement accentué par le stress oxydant (Heidland *et al.*, 2001).

Le glucose, dans sa forme linéaire, possède une fonction aldéhyde et une fonction hydroxyle adjacentes, en équilibre avec la forme ène-diol. Le glucose peut, sous la forme ène-diol et en présence de métaux de transition, donner naissance à un radical anionique ène-diol. Celui-ci,



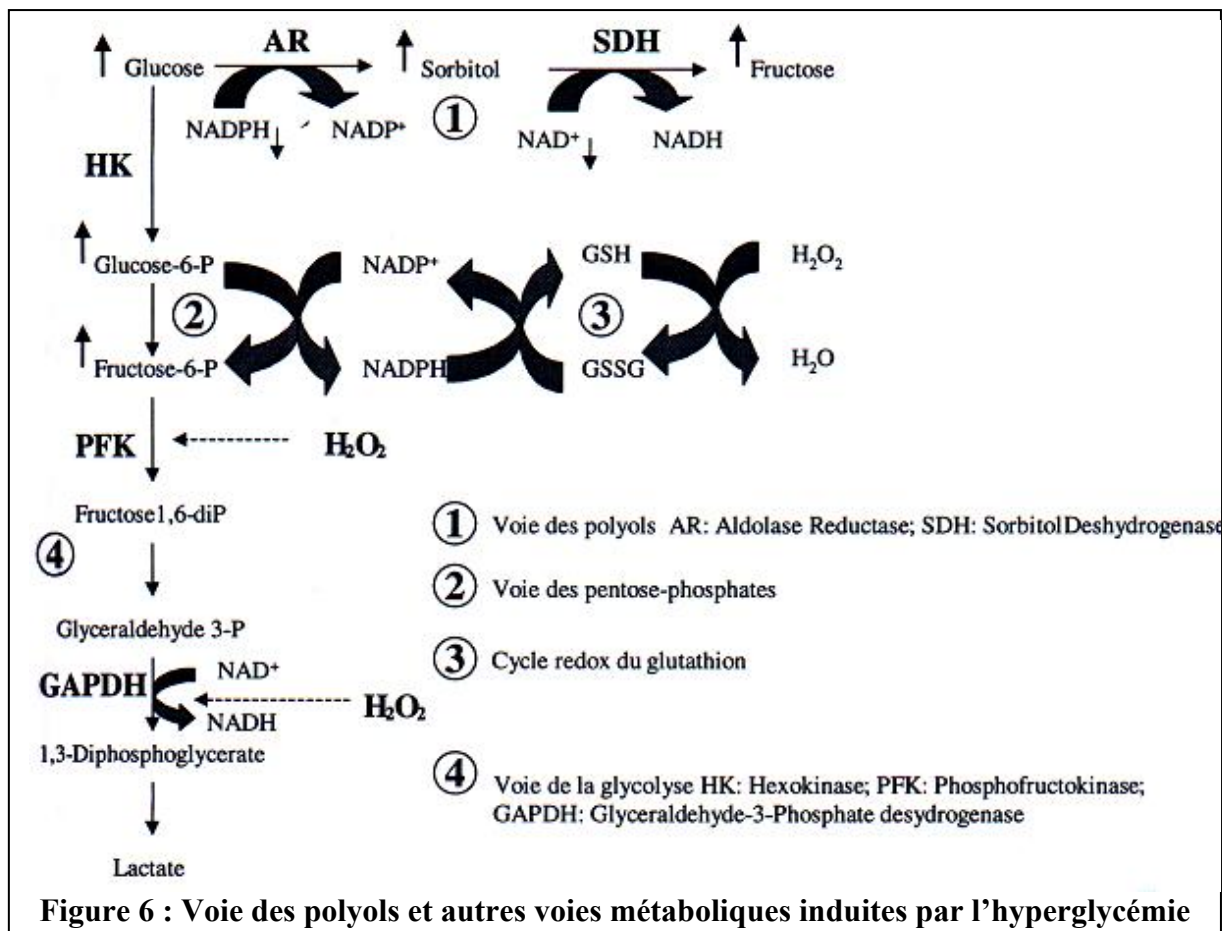
en réduisant l'oxygène moléculaire, libère des anions superoxydes. Au cours de cette réaction, il y a formation concomitante d'un composé α -cétoaldéhyde. Ce dernier, en présence de métaux de transition, réagit selon la réaction de Fenton, et produit à son tour des radicaux hydroxyles hautement réactifs (Hunt *et al.*, 1988), capables d'altérer les protéines avant même la fixation du glucose sur celles-ci.

II-2-3 - La voie des polyols

En situation d'hyperglycémie, les voies de métabolisation du glucose (glycolyse et voie des pentoses) sont diminuées car l'hexokinase, enzyme permettant la phosphorylation du glucose dans les deux voies métaboliques, est inhibée en présence de fortes concentrations de glucose (Gonzalez *et al.*, 1984). Le glucose, de ce fait, s'accumule dans les tissus non insulino-dépendants, et active la voie des polyols.

Cette voie fait intervenir principalement deux enzymes, l'aldose réductase et la sorbitol dés-hydrogénase. L'aldose réductase, qui n'est activée que pour des fortes concentrations en glucose, intervient en premier pour transformer le glucose en sorbitol à l'aide du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) produit par la voie des pentose phosphates. Puis la seconde enzyme, la sorbitol déshydrogénase, oxyde le sorbitol en fructose en utilisant comme cofacteurs le nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (NAD⁺) (Fig 6).

Le sorbitol ne pouvant pas franchir la membrane plasmique, s'accumule dans la cellule, et



augmente la pression osmotique, entraînant une hyperhydratation intracellulaire (Burg, 1995). Il peut être oxydé par la sorbitol déshydrogénase en fructose, et, dans ce cas, la production accrue de fructose par cette voie peut également stimuler la glycosylation non enzymatique des protéines (grâce au plus grand pouvoir réducteur du fructose par rapport au glucose) (Kaneko *et al.*, 1996)

L'activation de la voie des polyols pourrait avoir plusieurs effets délétères (Brownlee, 2001) : la principale conséquence de l'activation de cette voie due à une hyperglycémie est la modification du statut redox intracellulaire résultant de la baisse des rapports de NADPH, H⁺/NADP⁺ et NAD⁺/NADH, H⁺. La modification du statut redox peut altérer le fonctionnement

de nombreuses enzymes antioxydantes comme la glutathion-réductase, l'ascorbate-réductase, et la NO-synthase qui utilisent le NADPH comme cofacteur (Bravi *et al.*, 1997).

III - L'insulinorésistance

III-1 - La signalisation de l'insuline

La molécule d'insuline est produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Sécrétée sous forme d'une pro-insuline, constituée d'une seule chaîne peptidique, elle est clivée par une enzyme protéolytique spécifique au cours d'une maturation dans des vésicules intra cytoplasmique et sécrétée dans l'espace extracellulaire en réponse à une élévation du taux du glucose dans le sang. Dans les vésicules de sécrétions intra-cytoplasmiques, les monomères d'insuline s'assemblent en dimères, puis en hexamères. Les hexamères complexent chacun deux atomes de zinc et s'empilent pour former une structure quasi-cristalline. L'insuline a un rôle d'hormone hypoglycémiante, et elle possède une activité anabolique majeure dans la mise en réserve des substrats glucidiques et lipidiques. Elle exerce, en outre, des effets sur la croissance, la différenciation cellulaire et l'homéostasie du potassium.

Ces effets, lorsque l'insuline se lie à son récepteur membranaire spécifique, s'expriment en priorité sur ses trois tissus cibles, le foie, le muscle et le tissu adipeux.

Le récepteur de l'insuline est une glycoprotéine tétramérique, formée de deux sous-unités α extracellulaires et de deux sous-unités β transmembranaires contenant un domaine tyrosine kinase. Les différentes sous-unités sont reliées entre elles par des ponts disulfures. Le récepteur de l'insuline fait donc partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), mais il présente la caractéristique d'être constitutivement dimérisé. La liaison à l'insuline est assurée par la sous-unité α et par la partie extracellulaire des sous-unités β , qui contiennent des sites de liaison de haute et de basse affinité pour l'insuline. Les modèles actuels proposent la liaison d'une molécule d'insuline pour chacun des récepteurs (De Meyts *et Whittaker*, 2002). Outre le domaine tyrosine kinase, la partie intracellulaire de la sous-unité β contient des résidus tyrosine. Ces résidus sont essentiels à l'activité biologique du récepteur.

La liaison de l'insuline à son récepteur induit des modifications conformationnelles des sous-unités α et β , qui permettent l'accès au site catalytique et la trans-phosphorylation des résidus tyrosines des sous-unités β (Hubbard, 1997). La phosphorylation de ces résidus est nécessaire à l'activation du récepteur.

Les effets optimaux de l'insuline sont observés alors qu'une faible proportion (environ 10 %) des récepteurs sont liés à l'hormone, ce qui suggère qu'il existe un mécanisme d'amplification du signal par trans-phosphorylation des récepteurs libres par les récepteurs activés.

La stimulation par l'insuline induit la phosphorylation des tyrosines d'un certain nombre de protéines intracellulaires. La première protéine phosphorylée, en réponse à l'insuline, à être isolée a été appelée IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*). Depuis, d'autres substrats ayant la même structure ont été identifiés, et l'ensemble forme la famille des IRS. Les deux principaux représentants, IRS1 et IRS2, jouent des rôles complémentaires dans la signalisation insulini-que (White, 2002).

Le récepteur de l'insuline phosphoryle aussi d'autres protéines, les protéines de la famille Shc (*Src homology 2/ α collagen-related*), et quelques autres substrats dont la fonction n'a pas toujours été clairement établie, telles que les protéines Gab-1, Cbl, APS et DOKp62 (Saltiel *et* Kahn, 2001).

La famille des IRS

Les IRS ont une structure primaire commune, présentant dans leur partie N-terminale, un domaine PH (*plextrin homology*) et un domaine PTB (*phosphotyrosine binding*) qui sont responsables de l'interaction de la protéine avec le résidu phosphotyrosine présent dans la partie juxtamembranaire du récepteur (Figure 7). La partie C-terminale des IRS contient de nombreux résidus tyrosine, qui sont phosphorylés par le récepteur, et servent de site d'encrage pour les effecteurs de la signalisation. Ces protéines sont appelées des "Protéines Paltformes".

La famille des SHC

Les protéines Shc (*Src homology 2/ α collagen-related*) constituent la deuxième famille des substrats du récepteur de l'insuline. Shc est exprimée sous trois isoformes, Shc p46, p52 et p66. L'invalidation du gène Shc induit une létalité embryonnaire liée à des problèmes de développement du système cardiovasculaire, démontrant que la protéine Shc est une cible majeure des récepteurs des facteurs de croissance (Lai *et* Pawson, 2000). La phosphorylation de Shc par le récepteur permet le recrutement de l'adaptateur Grb2 et l'activation de la voie des MAP kinases, conduisant ainsi aux effets mitogéniques de l'insuline (Virkamaki *et al.*, 1999).

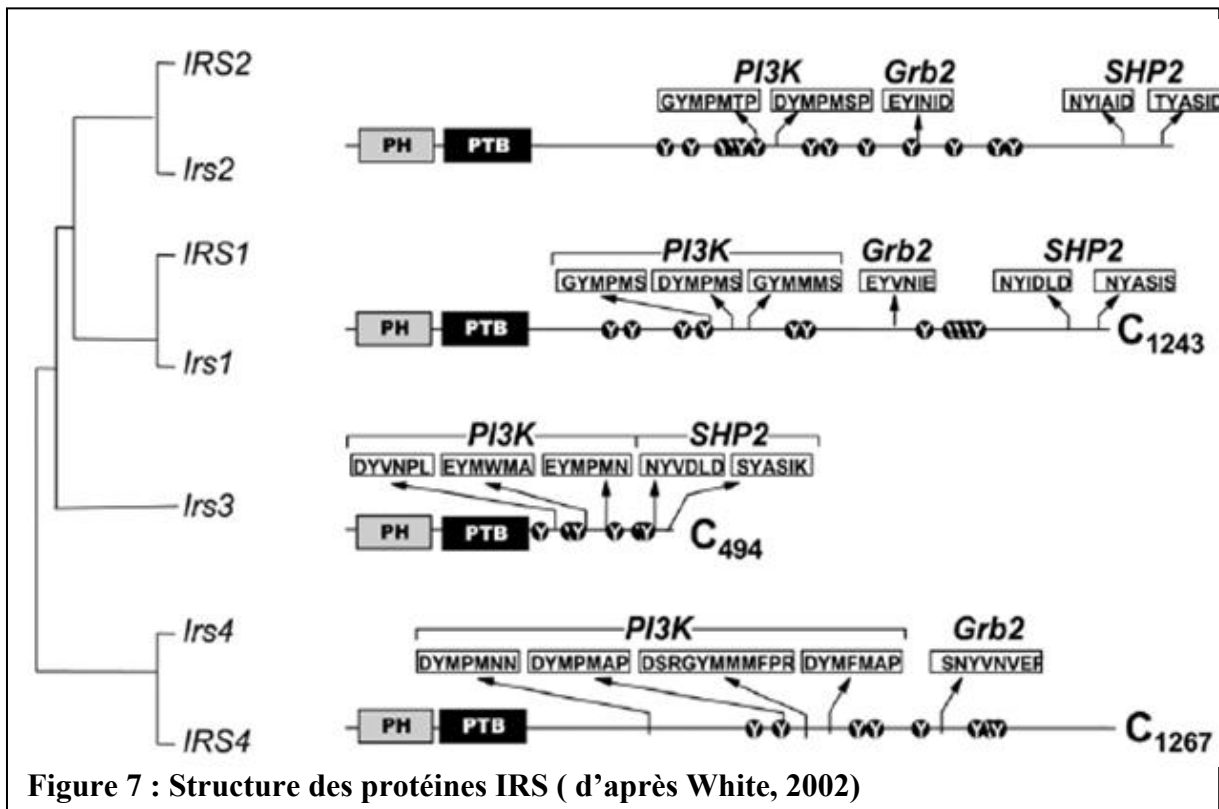


Figure 7 : Structure des protéines IRS (d'après White, 2002)

III-2 - La cascade de l'insuline

La transmission du signal insulinique

La transmission du signal insulinique dans la cellule met en jeu des modules protéiques de reconnaissance présents sur les protéines substrats et capables de les positionner à proximité du récepteur activé (RI). Au moins 9 substrats intracellulaires communs aux récepteurs de l'insuline et de l'IGF1 ont été identifiés (Capeau, 2005).

La stimulation du récepteur de l'insuline est à l'origine de l'activation de deux grandes voies de signalisation : la voie des MAP kinases et la voie de la PI-3 kinase, qui conduisent de manière respective schématiquement aux effets mitogéniques et métaboliques de l'hormone.

Les protéines IRS se placent au niveau cytosolique de la membrane plasmatique. Elles positionnent ainsi leur domaine PTB, adjacent au domaine PH, en face de la tyrosine 960 du récepteur de l'insuline (RI) et se fixent au RI sur la tyrosine 960 phosphorylée par l'intermédiaire de leur domaine PTB.

IRS2 va en outre interagir avec le domaine tyrosine-kinase du RI. La moitié carboxy-terminale des protéines IRS se trouve, de ce fait, à proximité du domaine tyrosine kinase du récepteur, qui phosphoryle des résidus tyrosine spécifiques sur les IRS. Les protéines IRS,

ainsi phosphorylées, sont à leur tour reconnues par les domaines SH2 (*src homology 2*) de protéines relais. Les principales sont la sous-unité régulatrice de la phosphatidyl-inositol 3 (PI3) kinase, les protéines adaptatrices Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) et Crk II, la tyrosine-kinase Fyn, et la phosphotyrosine phosphatase SHP2 (*SH2 domain protein tyrosine phosphatase-2*).

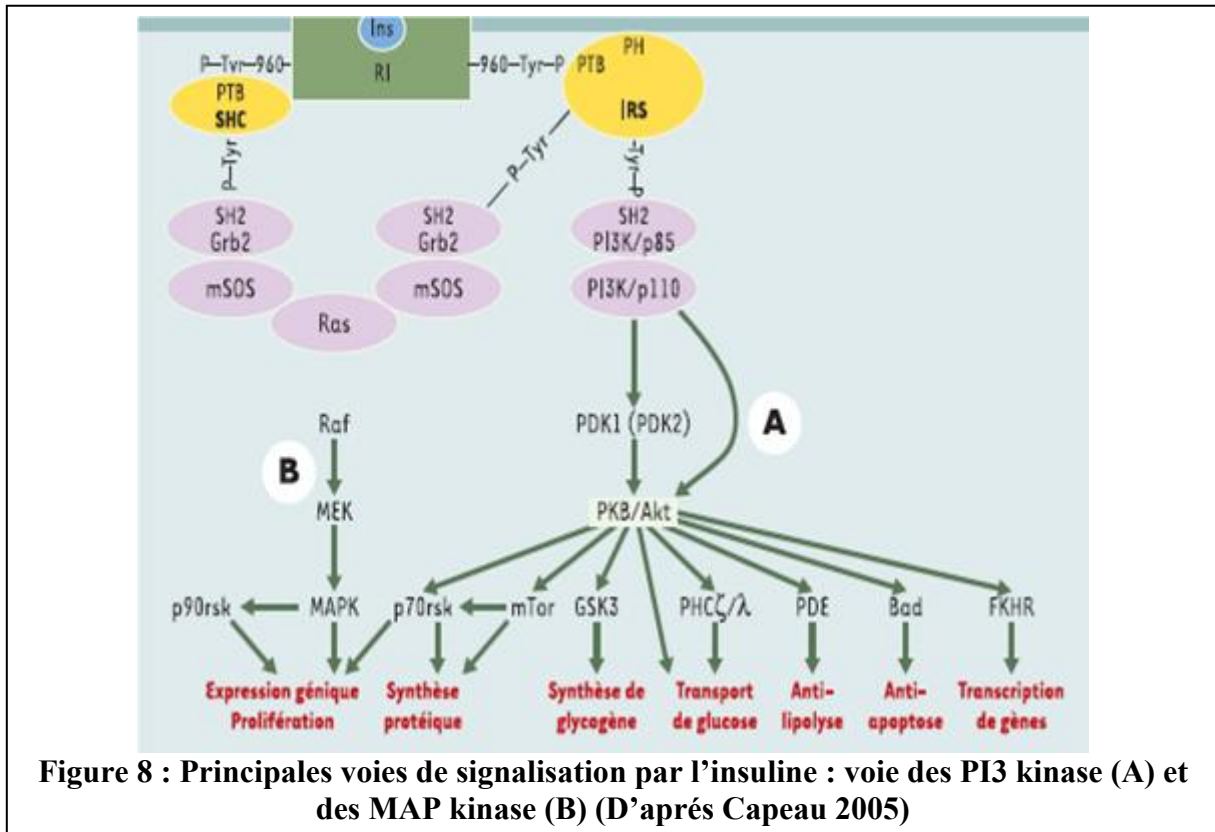
Voie de la PI3 kinase

La PI3 kinase catalyse la phosphorylation de phospho-inositides membranaires, induisant une augmentation rapide de phosphatidyl inositol 3, 4, 5-triphosphate (PIP3). Un effecteur clé de la PI3 kinase est la protéine kinase B (PKB) (appelée aussi Akt). Elle est activée par phosphorylation par l'intermédiaire de la PDK1/2 (phosphatidylinositol-dependent kinase 1/2). PKB est à son tour phosphorylée et, sous cette forme, elle active d'autres relais intracellulaires impliqués en priorité dans les effets métaboliques de l'hormone. La phosphorylation du glycogène synthase 3 kinase (GSK3)- β favorise la synthèse de glycogène. Celle de la kinase p70rsk et du facteur 4E-BP1 (*4Ebinding protein 1*), via la kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), participe à l'action de l'insuline sur la synthèse protéique en augmentant le niveau général de la traduction.

Toujours par la voie PKB, l'insuline exerce un effet anti-apoptotique en phosphorylant et inhibant le facteur pro-apoptotique Bad (Le Roith *et Zick*, 2001) (White, 2002).

La voie des MAPK

Les MAP kinases sont des sérine thréonine kinases activées par une très grande variété de signaux extracellulaires. Deux voies aboutissent à l'activation de la voie MAP kinase : via les protéines IRS, la liaison de l'adaptateur Grb2 sur des phosphotyrosines spécifiques permet d'activer le facteur d'échange nucléotidique SOS (*son of sevenless*) qui active la petite protéine G Ras dans la membrane plasmique en stimulant l'échange GDP contre GTP. Ras active la kinase Raf, qui phosphoryle alors et active la MAP kinase kinase (MEK) responsable de l'activation par phosphorylation des deux MAP kinase ERK 1 et 2 (*extracellular signal-regulated kinase*). Celles-ci vont activer la kinase p90rsk impliquée dans la synthèse protéique, et vont entrer dans le noyau afin de phosphoryler et activer des facteurs de transcription tels que p62TCF impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Une deuxième possibilité de mise en route de la voie MAP kinase part du récepteur de l'insuline qui recrute sur la tyrosine 960 les protéines adaptatrices de la famille SHC (*src homologous and collagen protein*), elles-mêmes reconnues par la protéine Grb2 activant la voie Ras.



L'insuline induit la translocation, d'un compartiment intracellulaire vers la membrane plasmique, de vésicules contenant les transporteurs GLUT-4, présentes dans les cellule musculaire et les adipocytes (Saltiel *et* Kahn, 2001) (Bryant *et al.*, 2002). La capacité plus ou moins grande de l'insuline à permettre l'utilisation du glucose par les tissus périphériques définit le degré de sensibilité à l'insuline d'un sujet. Chez les humains obèses et/ou diabétiques, cette action de l'insuline est-sévèrement réduite par un défaut au niveau du transport du glucose (DeFronzo, 1988) (Shepherd *et* Kahn, 1999).

Deux voies de signalisation semblent importantes pour la translocation de GLUT4, dépendante ou non de l'activation de la PI-3 kinase (Saltiel *et* Pessin, 2002).

La voie dépendante de la PI3 kinase, passe par l'activation de la protéine kinase B (PKB) ou Akt et de protéines kinase (PK) C atypiques, les PKC ξ/λ (Saltiel *et* Pessin, 2002). Il a été montré, dans des adipocytes de rat, qu'après stimulation par l'insuline, la protéine Akt2 activée est retrouvée associée aux vésicules contenant le GLUT-4.

Il a été également décrit qu'il y avait un défaut d'activité des PKC atypiques dans le muscle squelettique de sujet diabétique de type 2 (Cho *et al.*, 2001).

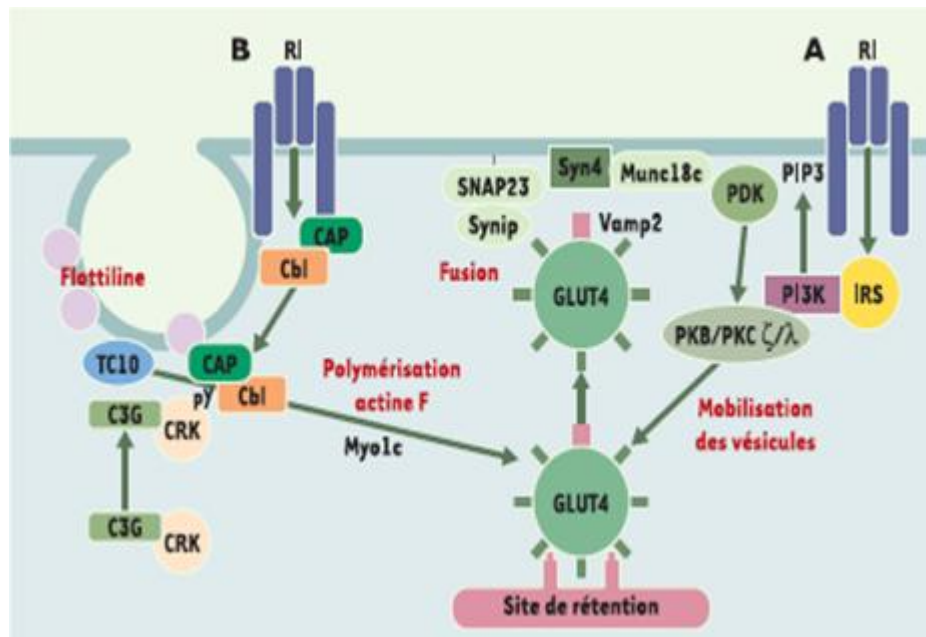


Figure 9 : Activation par l'insuline de l'entrée du glucose dans les cellules musculaires et les adipocytes (D'après Capeau 2005)

(A) : Une voie dépendante de la PI3 (Phosphatidylinositol3) kinase, passe par l'activation de la protéine Kinase B (PKB) et de protéines kinase (PK) C atypiques, les PKC ξ/λ .

(B) : les protéines CAP (c-Cb1 associated protein), en se liant sur le récepteur de l'insuline activé recrute la protéine c-Cb1 phosphorylée sur un résidu tyrosine par le RI.

III-3 - Insulinorésistance et stress oxydant

L'insulinorésistance est un état qui se caractérise par une réponse biologique diminuée des tissus périphériques à la sécrétion d'insuline. Bien que l'effet de l'insuline sur les cellules cibles soit multiple, le terme d'insulinorésistance se réfère presque exclusivement à l'effet de l'insuline sur le maintien de l'homéostasie du glucose. La sensibilité à l'insuline peut être réduite dans de multiples conditions physiologiques (puberté, grossesse, vieillissement ...), ou sous l'influence de traitements (corticothérapie, immunosuppression chez les patients greffés, traitement antirétroviral du sida) (Del Prato, 1999) ou, en présence de pathologies (obésité, diabète, syndrome polykystique ovarien, syndrome métabolique).

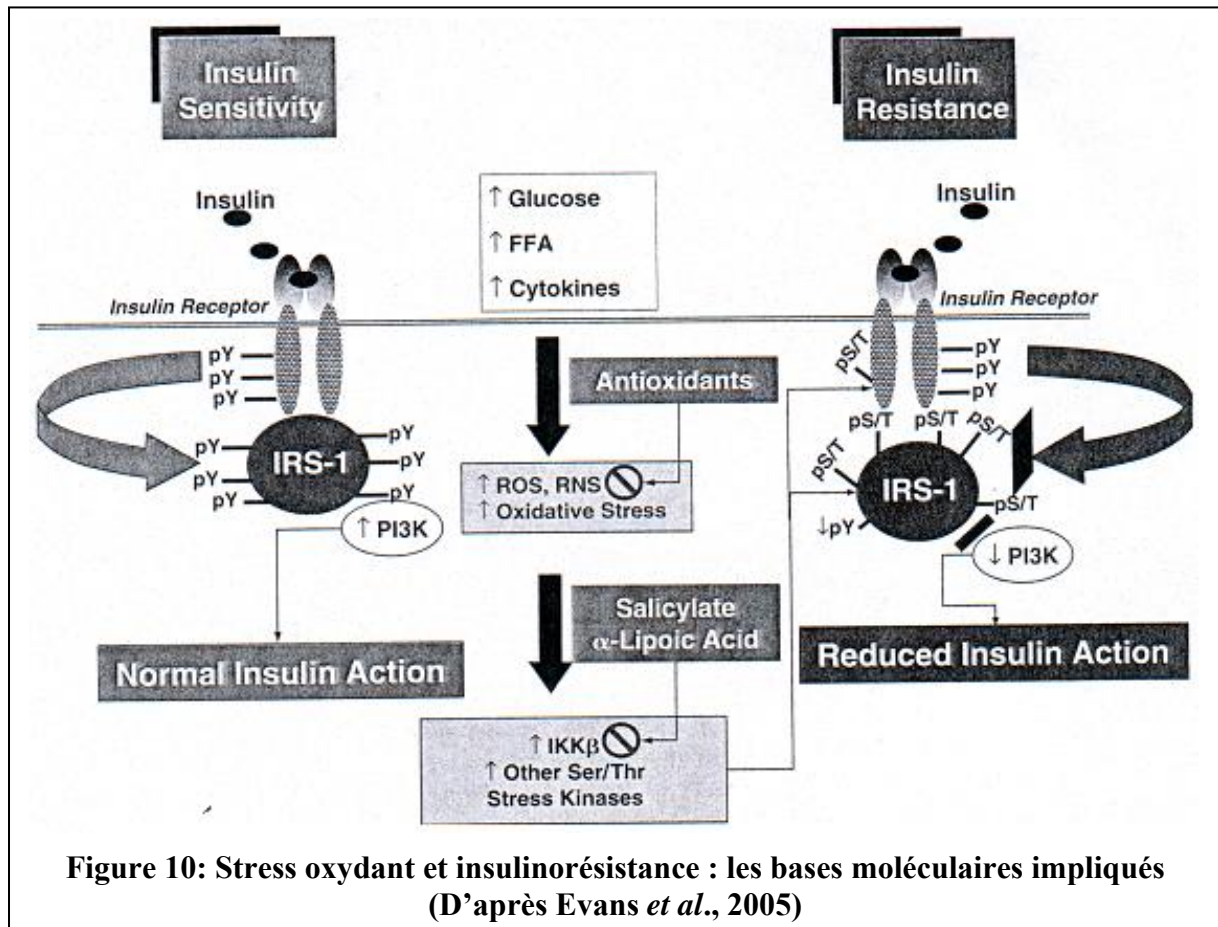
L'insulinorésistance qui caractérise le syndrome métabolique, précède le plus souvent le diabète de type 2. Il est maintenant admis que l'insulinorésistance a une composante génétique, mais qu'elle peut être acquise par des facteurs environnementaux. Au début, la résistance est compensée par un hyperinsulinisme, ce qui permet de préserver la tolérance au glucose. La

détérioration de la tolérance au glucose intervient quand la résistance à l'insuline augmente, ou que la réponse compensatoire de la sécrétion diminue, ou bien quand les deux phénomènes se produisent simultanément. Une augmentation de la concentration en insuline, en AGL et/ou en glucides augmente la production des ERO, induit un stress oxydant, et active les voies métaboliques génératrices d'ERO, ce qui en retour aggrave à la fois l'action et la sécrétion d'insuline, et, de ce fait, accélère l'installation du diabète de type 2. Enfin, l'attaque radicalaire modifie la transcription des transporteurs du glucose, et le taux de GLUT-1 est augmenté alors que le GLUT-4 est réduit (Bloch-Damti *et* Bashan, 2005). L'activation de la PKC par des ERO pourrait aussi être impliquée dans l'insulinorésistance. L'activation de la PKC entraîne une phosphorylation des résidus sérine/thréonine des IRS, qui conduit à l'inactivation des récepteurs hormonaux (Berti *et al.*, 1994) (Shulman, 2000) (Yu *et al.*, 2002), inhibant ainsi la transmission du signal insulinique et la capture cellulaire du glucose qui en découle (Kahn, 1992) (Shulman, 2000) (Yu *et al.*, 2002). De plus, Maddux *et al.* (2001) observent sur des myotubes L6, une inhibition du transport du glucose, après exposition des cellules à un stress oxydant.

La capacité des ERO à oxyder et endommager l'ADN, les protéines, et les lipides ne serait donc pas le seul mécanisme en cause dans la toxicité des ERO, puisqu'ils seraient aussi capables de fonctionner comme des seconds messagers et d'induire des voies de signalisation cellulaires rédox-sensibles. L'activation de ces voies de signalisation a été mise en cause dans l'insulinorésistance, la diminution de sécrétion de l'insuline, et les dommages cellulaires responsables des complications cliniques du diabète. Ainsi, la production des ERO, induite par l'élévation de la glycémie et l'hyperlipidémie, joue un rôle clé dans l'insulinorésistance et le dysfonctionnement des cellules β -pancréatiques, par leur capacité à induire l'activation des voies de signalisation rédox-sensibles.

L'efficacité de certains antioxydants comme l'acide lipoïque, la vitamine E, la vitamine C et le glutathion à améliorer la sensibilité à l'insuline, a été évaluée sur des modèles expérimentaux et dans des essais cliniques chez des individus insulino-résistants et/ou chez des patients de type 2 (Evans *et* Goldfine, 2000). Bien que de faibles ampleurs et de courtes durées, ces essais cliniques ont aussi confirmé ce bénéfice (Maddux *et al.*, 2001) (Rudich *et al.*, 1999). Il semble que le mécanisme impliqué dans les effets antioxydants soit médié par la translocation du GLUT-4 ou son activation (Estrada *et al.*, 1996) (Konrad *et al.*, 2001) (Ramrath *et al.*, 1999).

En nous appuyant sur les hypothèses soulevées par l'ensemble de ces données, nous nous proposons d'évaluer si les antioxydants pourraient avoir des propriétés insulino-sensibilisatrices en relation avec la modulation de ces voies de signalisation.



IV - Régime riche en fructose et insulino-résistance

Alors qu'il n'a jamais pu être clairement défini qui, des glucides ou des lipides, étaient en cause dans l'épidémie mondiale d'obésité et de syndrome métabolique, c'est seulement très récemment que le parallélisme entre la consommation de fructose et la forte prévalence de l'obésité a été décrit (Ludwig *et al.*, 2001) (Bray *et al.*, 2004).

Le fructose est très présent dans notre alimentation essentiellement sous forme de fructose libre et de constituant du saccharose. Jusqu'à une époque récente, l'apport alimentaire en fructose libre provenait surtout des fruits et du miel, alors que le fructose industriel provenait presque exclusivement du saccharose dont, depuis le début du XIX^{ème} siècle, la production industrielle à partir de la betterave et de la canne à sucre a fortement augmenté. La consommation de saccharose a entraîné une forte augmentation de celle du fructose, au niveau domestique

comme industriel. De plus, depuis quelques années, grâce aux progrès de l'enzymologie, l'industrie a produit du fructose à partir de sirops de maïs ou d'amidon de céréales, ce qui a conduit à utiliser le fructose comme un produit de substitution du saccharose. En 1967, les sirops de fructose (high fructose corn syrups ou HFCS), initialement à 15 %, ont été enrichis progressivement jusqu'à atteindre finalement 90 %. En 2002, ces HFCS représentaient plus de 56 % du marché des sucres. Aux USA, la consommation de fructose est passée de 0,292 kg/personne en 1970 à 33,4 kg/personne en 2000. L'apport en fructose représente une consommation de 9 % de AET, allant jusqu'à 13,5 et 22,5 % de l'apport énergétique total pour le 90^{ème} percentile de cette population. En France, cet apport serait déjà de 18 kg/an, dont seulement 5 kg provenant de fruits pour les grands consommateurs de fruits. Alors qu'il bénéficie curieusement d'une image de neutralité auprès de certains consommateurs, le fructose a des effets métaboliques qui seraient plus néfastes en terme de lipogénèse et d'insulinorésistance que le glucose, ce qui est bien décrit avec les modèles expérimentaux de régimes riches en fructose chez l'animal.

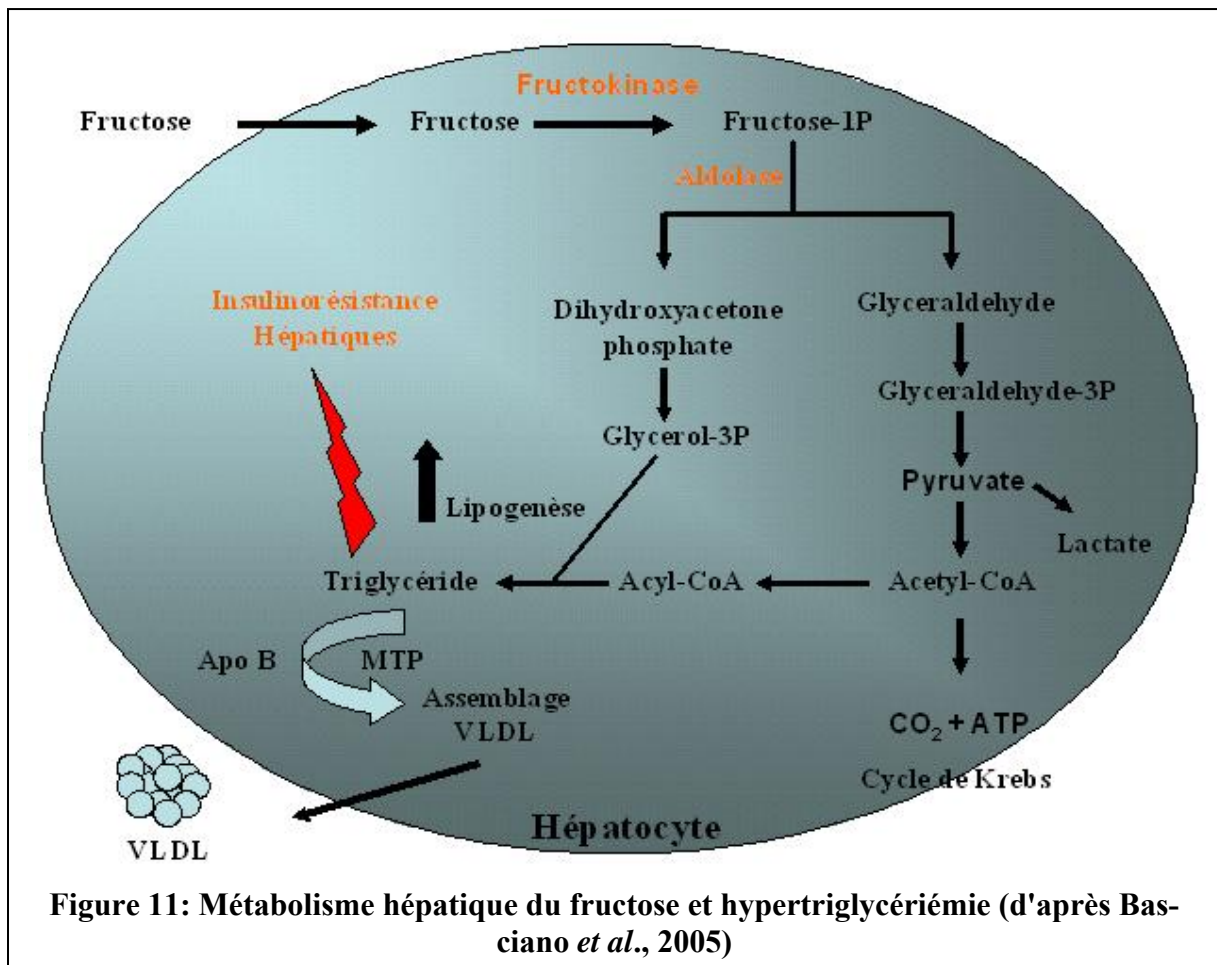
IV-1 - Métabolisme du fructose

Le fructose est principalement métabolisé dans le foie. Dans ce tissu, ce sucre emprunte une voie métabolique particulière faisant intervenir 3 enzymes spécifiques : la fructokinase (FK), l'aldolase type B et la triosekinase (Heinz *et al.*, 1968) qui permettent au fructose de rejoindre les voies de la glycolyse et de la néoglucogénèses (Figure 11). Le métabolisme du fructose, à la différence de celui du glucose, est indépendant de l'insuline jusqu'à son entrée dans ces deux voies métaboliques.

IV-2 - Fructose et syndrome métabolique

La spécificité du fructose à engendrer des désordres métaboliques caractéristiques du syndrome métabolique, est mise en évidence dans des modèles expérimentaux, le plus souvent chez le rat.

Il est décrit que l'apport de saccharose ou de fructose à plus de 60 % et de 30 % respectivement de l'apport énergétique total chez le rat diminue la sensibilité à l'insuline et entraîne une hyper insulinémie ainsi qu'une intolérance au glucose (Basciano *et al.*, 2005) (Daly *et al.*, 1997).



Thorburn *et al.* (1989) ont comparé un régime contenant 35 % de fructose à un autre contenant 35 % de glucose. Après 4 semaines de traitement, seuls les rats soumis au régime riche en fructose, développaient une résistance à l'insuline.

Thresher *et al.* (2000), quant à eux, ont comparé 4 régimes avec une composition en glucides différente : un régime standard n'ayant comme source de glucides que de l'amidon, et des régimes apportant soit 68 % de saccharose, soit 34 % de fructose + 34 % de glucose, soit 34 % de fructose + 34 % d'amidon. Après 5 semaines de traitement, seuls les régimes contenant du fructose ont entraîné une intolérance au glucose, suggérant que le fructose est bien le principale médiateur de l'intolérance au glucose et de la résistance à l'insuline.

Les régimes riches en fructose seraient pro-oxydants, qu'il s'agisse d'effets directs ou de potentialisation d'un stress oxydant ou inflammatoire préexistant, par exemple à la suite d'une carence en magnésium (Busserolles *et al.*, 2003 b).

Dés la première semaine d'un régime riche en saccharose ou en fructose, plusieurs auteurs rapportent une aggravation du stress oxydant, évaluée par une diminution du taux plasmatique

en glutathion réduit (GSH) et des enzymes antioxydantes (SOD, GPX, catalase) ainsi qu'une augmentation de la peroxydation lipidique (Armutcu *et al.*, 2005) (Busserolles *et al.*, 2002b) (Srividhya *et Anuradha*, 2002)(Thirunavukkarasu *et Anuradha*, 2004). Après seulement deux semaines de régime riche en fructose (60 %), la quantité des espèces réactive d'oxygène produite est augmentée dans le cœur (Delbosc *et al.*, 2005). Mais ce résultat n'est pas retrouvé avec un régime "saccharose" à 65 % par Busserolles *et al.*, (2002b). Cette divergence pourrait s'expliquer par la mise en place de conditions expérimentales différentes. En effet ces deux équipes n'utilisent pas la même souche de rat : Sprague Dawley *versus* Wistar, ni le même type de régime : fructose (60 %) *versus* saccharose (65 %).

Le fructose a deux caractéristiques métaboliques essentielles :

1. sa rapide captation par le foie qui possède un système enzymatique très actif pour le catabolisme du fructose.
2. son entrée au niveau des triose-phosphates en évitant l'étape de régulation de la phosphofructokinase (Mayes, 1993).

Toutes les voies métaboliques peuvent ainsi être sollicitées, mais c'est celle de la néoglucogénèse qui est particulièrement activée (Bizeau *et al.*, 2001a) (Bizeau *et al.*, 2001b) (Commerford *et al.*, 2002) (Pagliassotti *et al.*, 1994). Il est suggéré que l'augmentation du stress oxydant observée lors d'un régime riche en fructose est liée à une augmentation de la concentration plasmatique du glucose, puisque par ailleurs l'auto-oxydation du glucose entraînant une augmentation de la production d'ERO est bien décrite dans le diabète (Baynes, 1991).

L'hypothèse d'une relation entre l'hypertriglycéridémie et l'insulinorésistance induite par un régime riche en fructose ou en saccharose est ancienne (Zavaroni *et al.*, 1982). En effet, dès la première semaine d'un tel régime chez le rat, la triglycéridémie est augmentée (Delbosc *et al.*, 2005), et 3 semaines suffisent pour provoquer une hausse des acyl-CoA à chaîne longue dans le muscle squelettique (Chicco *et al.*, 2003). L'administration d'un inhibiteur de la sécrétion hépatique de triglycérides (Benfluorex) diminue à la fois les taux circulants de triglycérides et améliore l'insulinorésistance induite par un régime riche en fructose (Storlien *et al.*, 1993).

Le stress oxydant pourrait également contribuer à la mise en place de la résistance de l'insuline. Ce lien entre la résistance à l'insuline et le stress oxydant, induit par le régime riche en fructose, est confirmé par différentes études utilisant la metformine, un antidiabétique (Faure *et al.*, 1999) (Srividhya *et Anuradha*, 2002). Des rats soumis à un régime riche en fructose et traités à la metformine ont simultanément montré une amélioration de leur sensibilité à

l'insuline et de leurs défenses antioxydantes. De plus, si la metformine n'a pas un pouvoir anti-radicalaire (*ROS Scavenger*), elle inhibe partiellement le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, permettant ainsi de diminuer la production de ROS (Batandier *et al.*, 2006)(El-Mir *et al.*, 2000).

Faure *et al.* (1997) ont montré que l'apport en vitamine E améliorait les systèmes de défense antioxydant et la sensibilité à l'insuline chez les rats soumis à un régime riche en fructose, suggérant ainsi une hypothèse radicalaire dans l'insulinorésistance induite par le fructose. Par ailleurs, Horton *et al.* (1997) observent une absence de résistance de l'insuline chez les rats femelles, même après 8 semaines de régime riche en saccharose (68 %), car les rats femelles seraient mieux protégés des effets pro-oxydants d'un tel régime que les rats mâles, probablement en raison de leur statut hormonal (Busserolles *et al.*, 2002a), les œstrogènes ayant un effet antioxydant dû à leur similarité de structure avec la vitamine E (Mendelsohn *et Karas*, 1999) (Sugioka *et al.*, 1987).

Ainsi, concernant les effets d'un régime riche en fructose, son implication dans l'insulinorésistance est bien admise, mais ses effets pro-oxydants pourraient également contribuer à la mise en place de la résistance de l'insuline.

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé le modèle animal de syndrome métabolique induit par le fructose, afin d'étudier les effets des polyphénols du thé et de la cannelle, ainsi que ceux du chrome III à la fois sur le stress oxydant et sur la sensibilité à l'insuline.

V - Les polyphénols du thé et de la cannelle

L'effet santé des polyphénols apportés par l'alimentation, en relation avec leur pouvoir antioxydant (Urquiaga *et Leighton*, 2000), a été largement décrit (Dragsted, 2003) (Scalbert *et al.*, 2005) (Rodrigo *et Bosco*, 2006). Plusieurs plantes ont été traditionnellement utilisées pour réguler l'utilisation du glucose et prévenir le risque de diabète. Leur richesse en polyphénols pourrait expliquer leurs propriétés (Gray *et Flatt*, 1997).

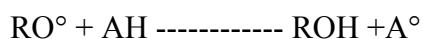
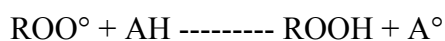
Nous nous sommes intéressés dans ce travail à deux sources de polyphénols, le thé et la cannelle, qui apparaissent à la fois comme antioxydants et modulateurs de l'insuline, et pourraient donc présenter un intérêt particulier dans la prévention du syndrome métabolique.

V-1 - Généralités

Les polyphénols sont des molécules spécifiques du règne végétal. L'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupement hydroxyle(s), libre(s) ou engagé(s) dans une autre fonction chimique (ester métallique, ester, sucre) (Escarpa et Gonzalez, 2001). Dans le règne végétal, plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui. Ils peuvent être regroupés en de nombreuses classes (Harborne, 1989) (Macheix, 1996), qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant du simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation ...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques).

Les bases structurales de l'activité antioxydante des polyphénols ont surtout été acquises *in vitro*. Les composés phénoliques sont caractérisés par un noyau benzoïque portant un ou plusieurs groupements hydroxylés. L'activité antioxydante peut être corrélée aux paramètres suivants : le caractère acide de la fonction phénol (c'est à dire donneur d'hydrogène), la possibilité d'établir des liaisons hydrogènes, et la susceptibilité du noyau benzénique aux réactions de substitution électrophiles. Cette structure permet des interactions multiples comme une aptitude à complexer des métaux, à se combiner avec des molécules nucléophiles ou à des réactions d'oxydoréductions (Rice-Evans, 1995).

Les polyphénols (AH) ont la possibilité de piéger les radicaux libres (tels que les peroxydes ou alcoxydes) grâce à la fonction donneur d'hydrogène :



Les polyphénols, selon leurs structures, et particulièrement la proximité de deux fonctions hydroxyles (par exemple deux fonctions –OH en position ortho sur le noyau B), ont aussi la possibilité de chélater des ions métalliques, et ainsi de prévenir la formation de radicaux libres catalysée par un métal de transition comme le fer dans la réaction de Fenton Haber-Weiss (McKay *et* Blumberg, 2002) (Skrzydłowska *et al.*, 2002).

V-2 - Le thé

Le thé (*Camelia sinsensis L*) est la boisson la plus consommée dans le monde après l'eau. Cette plante est connue depuis plusieurs millénaires, en particulier dans les populations asiatiques, qui lui attribuent des propriétés médicinales. Il existe plusieurs types de thé. Leur composition qualitative et quantitative est dépendante du mode de fabrication, du type de culture et du type de cueillette.

Le thé est particulièrement riche en composés phénoliques, puisque ceux-ci représentent le tiers de la matière sèche de la feuille (Balentine *et al.*, 1997).

De nombreuses études épidémiologiques ont associé la consommation de thé à des bénéfices pour la santé et à la prévention de pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, les maladies neurodégénératives ou l'ostéoporose (McKay *et* Blumberg, 2002), (Rietveld *et* Wiseman, 2003), (Coimbra *et al.*, 2006). Plus récemment, le rôle du thé comme modulateur de la sensibilité à l'insuline et facteur de prévention du diabète et de l'obésité, a été évoqué (Kao *et al.*, 2006) (Wolfram *et al.*, 2006).

V-2-1 - Principes actifs du thé

Les feuilles de thé contiennent surtout des flavonoïdes et des méthylxantines (caféine et théobromine).

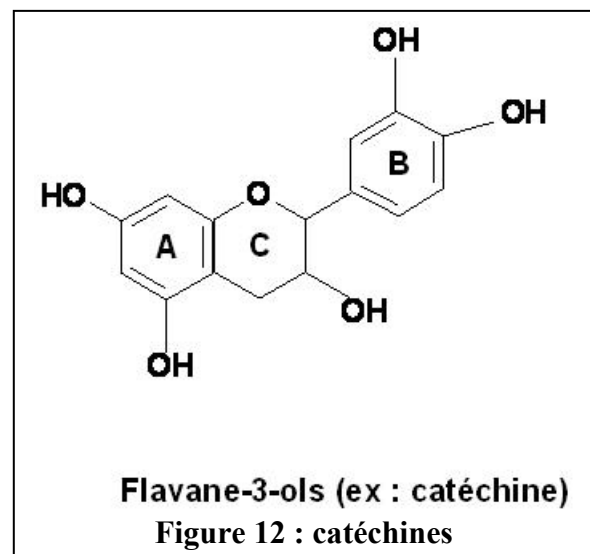
Les principales classes des flavonoïdes présent dans le thé sont des flavanols et flavonols qui représentent 30 - 42 % de la masse sèche des feuilles (Brown, 1999).

Les flavonols du thé sont la quercétine, le kaempférol, la myricétine et leurs glycosides (Cabrera *et al.*, 2006).

Parmi les flavanols, les catéchines (flavane -3-ols) représentent la forme prédominante.

Les quatre principales catéchines retrouvées dans les feuilles de thé fraîches sont :

- epigallocatechine-3-gallate (EGCG, 59 % des catéchines),
- epigallocatechine (EGC, 19 %),
- epicatechine-3-gallate (ECG, 13,6 %), et
- epicatechine (EC, 6,4 %) (McKay *et* Blum-



berg, 2002).

Les glycosides de flavanols représentent 2 à 3 % de l'extrait de thé hydrosoluble.

Autres constituants : La feuille de thé contient des méthylxanthines : 2,5 à 4 % de caféine (poids sec) et des quantités beaucoup plus faibles de théobromine (Brown, 1999).

Les principaux minéraux du thé (10 à 15 % du poids sec) sont le potassium, le calcium, le phosphore, le manganèse, le cuivre, le sodium, le silicium, le zinc, le bore, le plomb, le chrome, le fer, le nickel, et le baryum. Le thé est, de plus, une source importante de fluor (Dufresne *et* Farnworth, 2001).

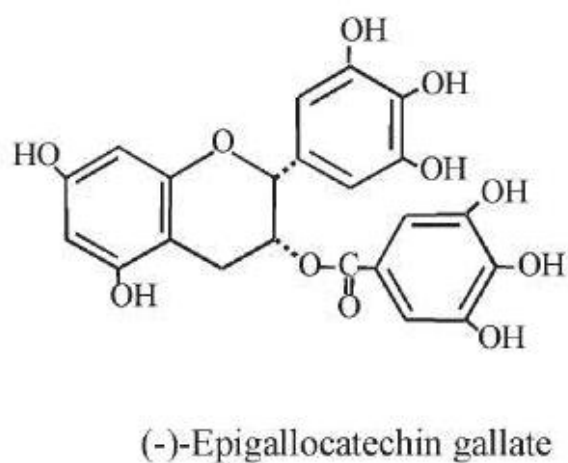
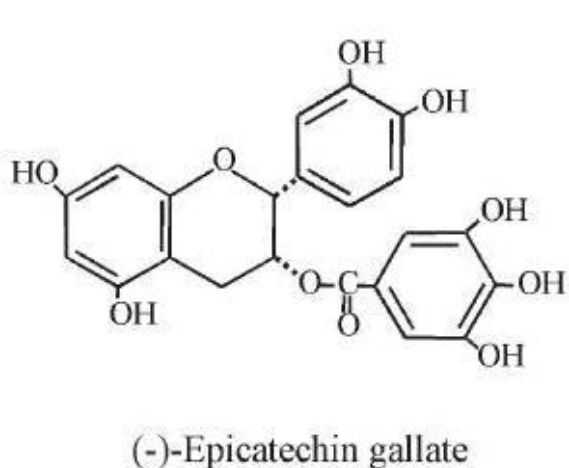
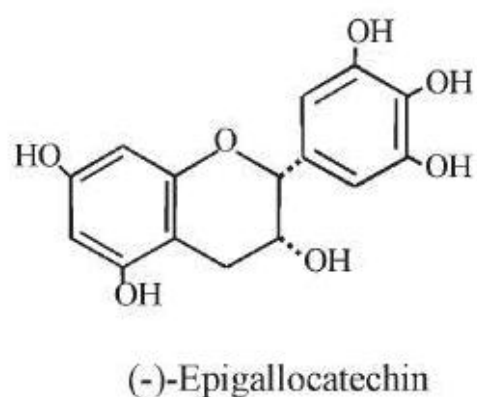
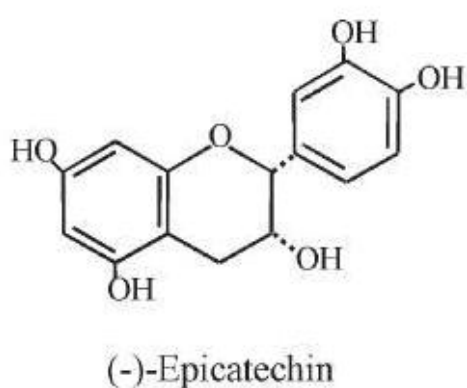
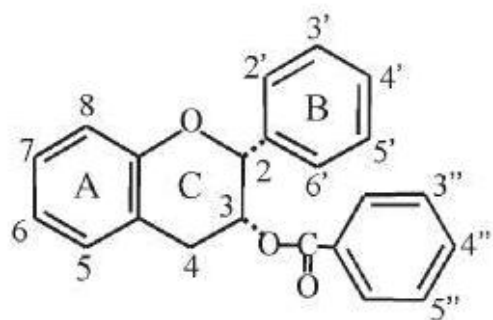
L'infusion de thé contient environ 17 % de substances azotées, dont des protéines (environ 6 %) et des acides aminés. La théanine (γ -n-éthyl-glutamine) est un des 19 acides aminés présents dans le thé vert ou noir, et ne se trouve que dans cette plante. La dégradation des acides aminés est impliquée dans la formation des arômes (Balentine *et al.*, 2000).

On trouve également la vitamine C et les vitamines B1, B2, B3, B5, et B11. La vitamine E, étant liposoluble, n'est pas retrouvée dans l'infusion de thé, contrairement aux vitamines B et C qui sont hydrosolubles. Quant à la vitamine C, elle n'est présente que dans le thé vert, car elle est détruite par le processus de fermentation, mais, sensible à la chaleur, elle est aussi détruite lors de l'infusion.

La transformation du thé vert en thé brun entraîne une perte de principes actifs. Les catéchines incolores du thé vert sont transformées en différents produits de couleur orange-jaune à rouge brun, par une série de réactions de condensation oxydative conduisant à la formation d'un grand nombre de composés polyphénoliques organoleptique volatils.

L'oxydation des catéchines en quinones actives est la première modification observée au cours de la fermentation, catalysée par la polyphénol oxydase. Des biopolymères de flavonoïdes, les théaflavines, apparaissent ensuite. On les différencie en fonction du nombre de molécules d'acides gallique estérifiées. Les théaflavines sont représentées à hauteur de 0,3 à 2 % dans le thé noir. Elles sont colorées en rouge et sont astringentes. L'acide gallique peut être oxydé en quinone d'acide gallique par la même enzyme. Il réagit avec les quinones de catéchine pour former des acides théaflaviques, ou avec les quinones de gallocatéchine pour former les théaflagallines.

La principale modification à l'origine de la différence thé vert / thé noir est la disparition des catéchines (85 %) au cours de la fermentation.



- épicatechine,
- épigallocatechine,
- épicatechine gallate
- épigallocatechine gallate.

Figure 13 : Les catéchines du thé
(Higdon et Frei, 2003).

On en retrouve 10 % sous forme de théaflavines et d'acides théaflaviques, les catéchines restantes forment des substances polyphénoliques non identifiées, hydrosolubles (pigment brun à noir du thé), les théarubigines. Certains de ces flavonoïdes seraient des polymères de proanthocyanidine (Balentine *et al.*, 2000).

L'activité antioxydante du thé pourrait être due à la présence de flavonoïdes en particulier les catéchines qui neutralisent les espèces réactives de l'oxygène (Middleton *et al.*, 2000).

Les flavonoïdes peuvent également chélater les ions métalliques libres en particulier le fer et le cuivre, grâce au groupement catéchol présent sur le cycle B, ce qui réduit la production d'espèces réactives de l'oxygène catalysée par les métaux (Miller *et al.*, 1996) (Morel *et al.*, 1993). L'EGCG et l'ECG, principales catéchines du thé vert sont des bons piègeurs du radical peroxyde généré par le système hypoxantine-xantine oxydase. Les catéchines ont été classées en fonction de leur activité chélatante des métaux : épigallocatechine (EGC) > gallate d'épigallocatechine (EGCG) > épicatechine (EC) (Guo *et al.*, 1996).

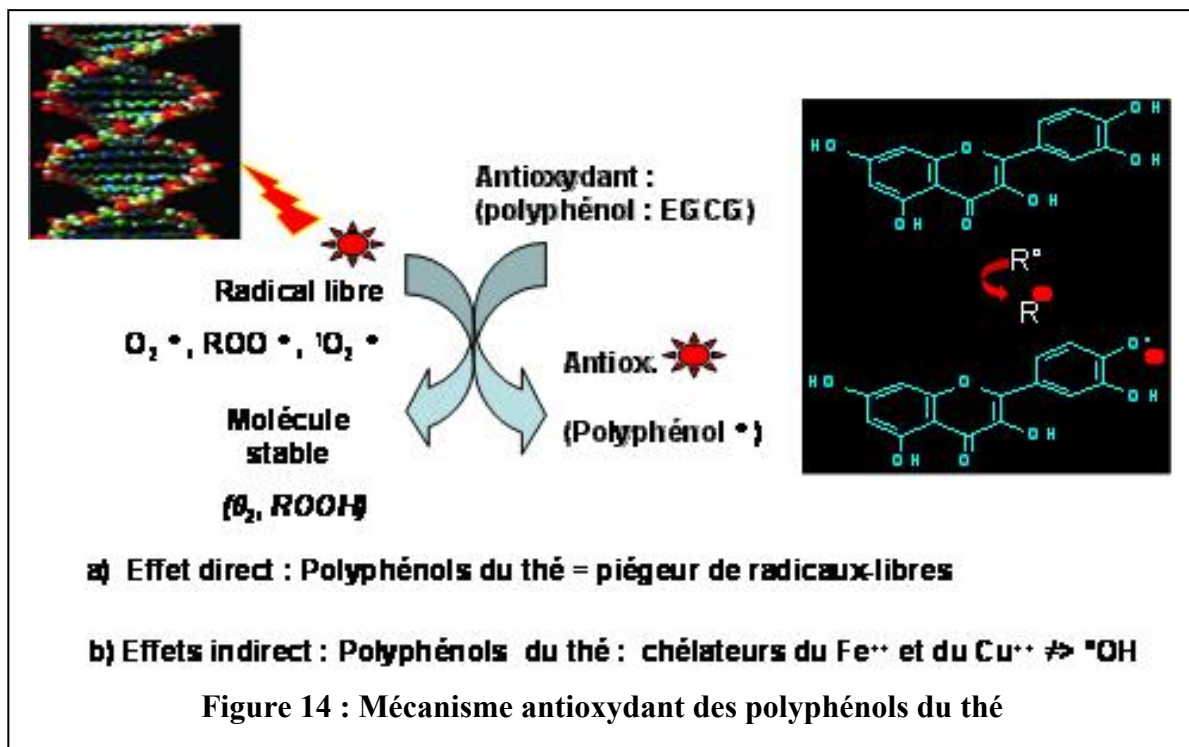
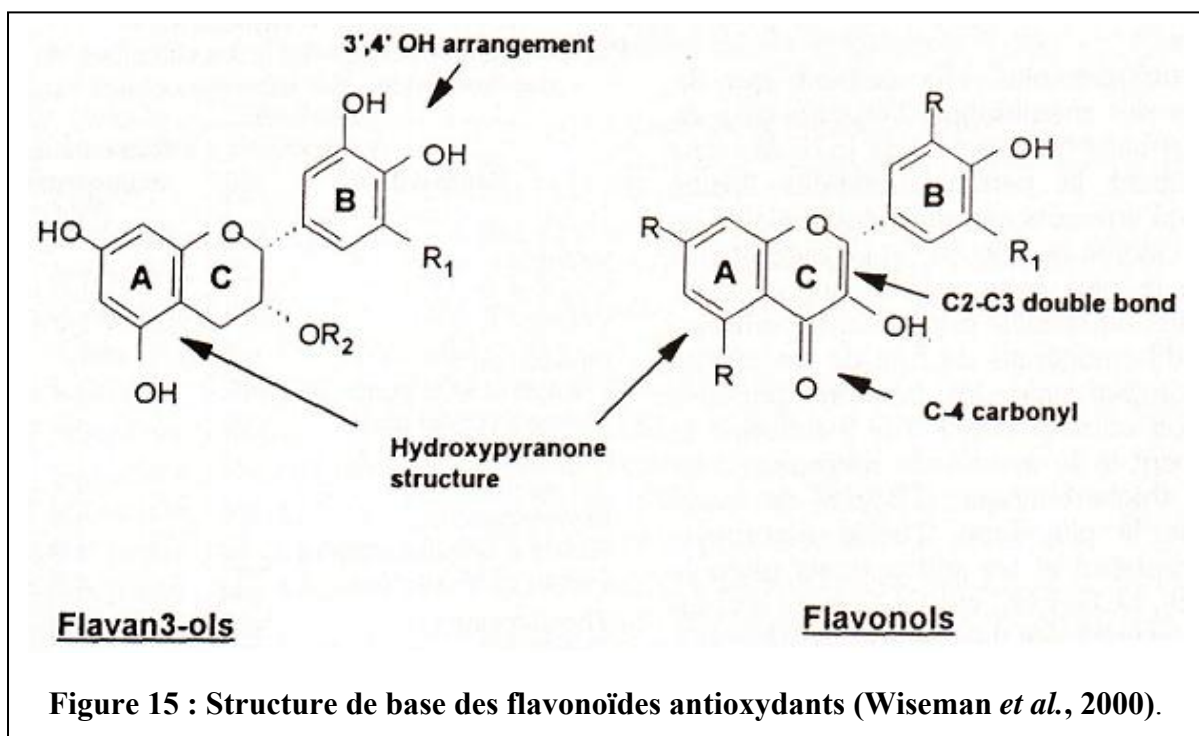


Tableau I : Principaux composants des thés vert et noir (en % poids de matière sèche des solides) (D'après Balentine *et al.*, 2000)

	Thé vert	Thé noir
Catéchines	30-42	3-10
Théaflavines	-	2-6
Polyphénols simples	2	3
Flavonols	2	1
Autre polyphénols	6	23
Théanine	3	3
Acides amines	3	3
Peptides/Protéines	6	6
Acides organiques	2	2
Sucres	7	7
Autres glucides	4	4
Caféine	3-6	3-6
Potassium	5	5
Autre minéraux/cendre	5-8	5-8



V-2-2 - Thé, sensibilité à l'insuline et métabolisme du glucose

Les polyphénols du thé modulent la glycémie à travers plusieurs mécanismes incluant la modification de la production hépatique de glucose (Waltner-Law *et al.*, 2002) ou l'augmentation de sa captation par les tissus périphériques. In vitro, des extraits de thé vert de thé brun, et l'épigallocatechine gallate (EGCG) augmentent la captation périphérique du glucose par des adipocytes de rats (Anderson *et Polanski.*,2002). Le thé inhibe également l'activité des transporteurs du D glucose dans l'épithélium intestinal (Shimizu, 1999).

L'administration de régimes riches en catéchines du thé régule la glycémie et améliore la tolérance au glucose chez des rats dont l'intolérance a été induite par l'amidon ou le sucrose. Différentes doses de catéchines de thé vert (40, 60 et 80 mg/ml par voie orale, à raison de 1 ml) ont été administrées à des rats (4 groupes : un pour chaque dose et un témoin qui recevait de l'eau), suivie, après 30 minutes, d'une dose importante de saccharides (4 ml d'une solution d'amidon à 40 %). A différents intervalles sur une heure, la glycémie des rats a été mesurée : les résultats montrent que 80 et 60 mg de catéchines de thé vert, administrées 30 minutes avant la prise d'amidon, abaissent de façon significative ($p < 0.05$), les taux sanguin de glucose par rapport au témoin. Par contre, ce résultat n'est pas observé avec 40 mg de catéchines, ce qui suggère que l'effet est dépendant de la dose. Cet effet hypoglycémique serait dû à l'inhibition des enzymes capables de rendre les sucres complexes assimilables par l'organisme (comme l'amylase par exemple) (Matsumoto *et al.*, 1993). Ce résultat a été confirmé chez des rats âgés dont la supplémentation par le thé vert réduit le taux plasmatique du glucose (Zeyuan *et al.*, 1998). Chez la souris, des extraits fermentés de thé montrent un effet hypoglycémiant (Shenoy, 2000). Sur un modèle expérimental de diabète, des extraits de thé vert réduisent le stress oxydant et régulent la glycémie des animaux (Sabu *et Kuttan*, 2002).

Plusieurs études réalisées sur modèle animal démontrent que les extraits de thé vert et l'EGCG ont une importante activité insuline-like. Le thé vert améliore la sensibilité à l'insuline chez le rat (Wu *et al.*, 2004a) et active le transporteur du glucose GLUT-4 (Wu *et al.*, 2004b), ainsi que l'homéostasie glucidique et lipidique chez le hamster dont l'insulino-résistance a été induite par un régime riche en fructose (Li *et al.*, 2006).

Chez l'homme, la consommation de thé vert et de café est associée à une réduction du risque de diabète de type 2. Dans une étude rétrospective, 17000 sujets âgés de 40-65 ans, sans anté-

cédents de diabète, de maladies cardiovasculaires ou de cancers au départ, ont répondu à un questionnaire sur leur consommation de thé (thé vert, ou noir, ou oolong) et de café. Au cours du suivi (5 ans), 4,4 % des hommes et 2 % des femmes ont développé un diabète. La consommation de thé vert et de café était associée de façon inverse au risque de diabète après ajustement sur l'âge, le sexe, l'indice de masse corporelle (IMC), et les autres facteurs de risques. En revanche, aucune association n'a été trouvée entre la consommation de thé oolong ou noir et le risque de diabète (Iso *et al.*, 2006).

V-2-3 - Thé et stress oxydant

L'activité antioxydante des divers composés phénolique du thé est largement admise (Saffari *et Sadrzadeh*, 2004) , (Skrzydowska *et al.*, 2002) (Frei *et Higdon*, 2003). Les différents constituants du thé ont chacun un pouvoir antioxydant qui leur est propre, mais c'est leur association qui donne au thé des propriétés intéressantes (Sarkar *et Bhaduri*, 2001). Selon une étude, l'activité antioxydante d'une tasse de thé vert correspondrait à 436 mg d'équivalents en vitamine C, contre seulement 239 mg pour une tasse de thé noir (Lee *et al.*, 2002).

Les catéchines qui possèdent le plus grand nombre de groupements hydroxyles sont celles qui possèdent le plus grand potentiel antioxydant (Salah *et al.*, 1995), ainsi que le montre l'activité antioxydante des différentes catéchines du thé vert, évaluée *in vitro* par la méthode du TEAC (*Trolox Equivalent Antioxydant Activity*) exprimée en mM: gallate d'épicatéchine (ECG : $4,9 \pm 0,02$) \approx gallate d'épigallocatechine (EGCG : $4,8 \pm 0,06$), épigallocatechine (EGC : $3,8 \pm 0,06$) > épicatechine (EC : $2,4 \pm 0,02$) (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Chez l'animal, le bénéfice du thé a été montré dans un modèle expérimental où l'EGCG, ajoutée à l'eau de boisson, diminuait de manière significative les dégradations oxydatives induites par l'exposition à un rayonnement ionisant (Uchida *et al.*, 1992). Chez les rats traités avec un cancérigène (le 2-nitropropane), les taux de la 8-hydroxydésoxyguanosine (8-oxo-dG) et des peroxydes lipidiques hépatiques étaient significativement plus faibles chez les animaux ayant reçu préalablement comme boisson, pendant les deux semaines ayant précédé l'injection, du thé vert ou des polyphénols de thé, normalisés à la même teneur en EGCG que le thé vert (Hasegawa *et al.*, 1995) . Ce travail a été confirmé dans d'autres études (Yoshioka *et al.*, 1996) (Yoshioka *et al.*, 1997).

Chez l'homme, plusieurs études ont confirmé les capacités antioxydantes du thé. Chez des sujets sains, l'activité antioxydante totale du plasma est significativement augmentée de respectivement 7 et 12 % deux heures après une ingestion de 300 ml ou 450 ml de thé (Sung *et*

al., 2000). Plusieurs études ont également montré le rôle protecteur des polyphénols du thé vert, en particulier de l'EGCG dans la prévention de l'oxydation des LDL (Wiseman *et al.*, 1997) (Wiseman *et al.*, 2000). Comme le rapportent Erba *et al.* (2005), la consommation régulière de thé renfermant 250 mg de catéchines pendant 42 jours entraîne une baisse significative des peroxydes plasmatiques et des dommages à l'ADN. Ces résultats sont confirmés chez le fumeur, que la consommation de thé durant 4 mois, protège des dommages oxydatifs (Hakim *et al.*, 2004).

Les théaflavines présentes dans le thé noir auraient également des propriétés antioxydantes au moins équivalentes à celle des catéchines du thé vert (Leung *et al.*, 2001).

V-3 - La cannelle

V-3-1 - Historique

La cannelle, connue depuis l'Antiquité, est un des épices les plus consommés dans le monde. Son nom vient du Phénicien "kinnamomon" et de l'Hébreu "qinnâmôn". Importée en Egypte depuis la Chine dès 2000 Av JC, on la mentionne dans la Bible. Néron en aurait fait brûler les réserves d'une année aux funérailles de l'impératrice pour honorer sa mémoire (65 ans après JC).

La cannelle est une substance végétale aromatique provenant de l'écorce interne du cannelier. Elle est cultivée essentiellement en Asie du sud : Inde, Sri Lanka (Ceylan), Chine, ainsi qu'aux Seychelles et à Madagascar. Très appréciée pour sa saveur parfumée, elle est également riche en antioxydants. Une vaste revue scientifique a classé la cannelle moulue au quatrième rang parmi les 50 aliments renfermant le plus d'antioxydants par portion de 100 g (Halvorsen *et al.*, 2006).

En 1990, Khan *et al.*, ont rapporté que le composé hydrosoluble de la cannelle potentialise l'activité de l'insuline, et peut améliorer les signes et les symptômes caractéristiques du diabète et des maladies cardiovasculaires associées à l'insulinorésistance.

Après cette démonstration, 49 extraits d'herbes, d'épices et de plantes médicinales ont été évalués pour voir dans quelle mesure ils exerçaient une activité de type insuline-like. Parmi les composés les plus efficaces, on trouve la cannelle et le thé vert (Broadhurst *et al.*, 2000).

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études observent chez l'animal, comme chez l'homme, les effets bénéfiques de régimes riches en cannelle sur la sensibilité à l'insuline. Aucune, à ce jour, ne s'est encore intéressée au lien entre cet effet et le pouvoir antioxydant

de la cannelle. C'est pourquoi nous avons décidé d'inclure la cannelle dans notre plan de thèse.

V-3-2 - Principes actifs de la cannelle

L'effet insuline-like de la cannelle a d'abord été attribué à son contenu élevé en chrome, mais aucune corrélation n'a pu être établie entre les taux de chrome présents dans la cannelle et son activité insuline-like (Khan *et al.*, 1990).

L'aldéhyde cinnamique : la cannelle est très riche en ce composé phénolique volatil au pouvoir antioxydant, avec une quantité pouvant dépasser 17000 mg par 100 g de matière sèche (Shan *et al.*, 2005). Une étude *in vitro* sur des échantillons de sang humain a démontré que l'aldéhyde cinnamique avait la capacité de diminuer l'activité de la 5-lipoxygénase, une enzyme associée à l'apparition de réactions inflammatoires ou allergiques (comme l'asthme, la rhinite allergique, le psoriasis) (Prasad *et al.*, 2004). L'aldéhyde cinnamique ferait également partie des composés procurant à la cannelle des propriétés antimicrobiennes (Lai *et Roy*, 2004). Cet extrait peut également réduire le taux sanguin du glucose et des lipides chez des rats rendus chimiquement diabétiques. Il augmente le taux d'insuline circulant, il diminue les taux d'HbA_{1c} et il restaure l'activité des enzymes plasmatiques, incluant l'aspartate aminotransférase, l'alanine aminotransférase, la lactate déshydrogénase, la phosphatase alcaline et la phosphatase acide (Subash, 2007).

Cependant l'aldéhyde cinnamique peut être pro-oxydante. Comme l'indique une étude réalisée chez des rats, une supplémentation par voie orale de 73,5 mg/kg pendant 90 jours mène à une augmentation des concentrations en substances réactives à l'acide thiobarbiturique TBAR'S, marqueurs de peroxydation lipidique (Gowder *et Devaraj*, 2006).

L'acide cinnamique et ses dérivés possèdent une variété de propriétés pharmacologiques comprenant une activité antioxydante et hypoglycémiant (Duke, 1992). Une étude réalisée sur des rats montre que le 3,4-di(OH)-cinnamate et le 3,4-di(OH)-hydroxycinnamate réduisent le taux du cholestérol et des triglycérides, et diminuent la production hépatique du HMG-CoA (Lee *et al.*, 2001).

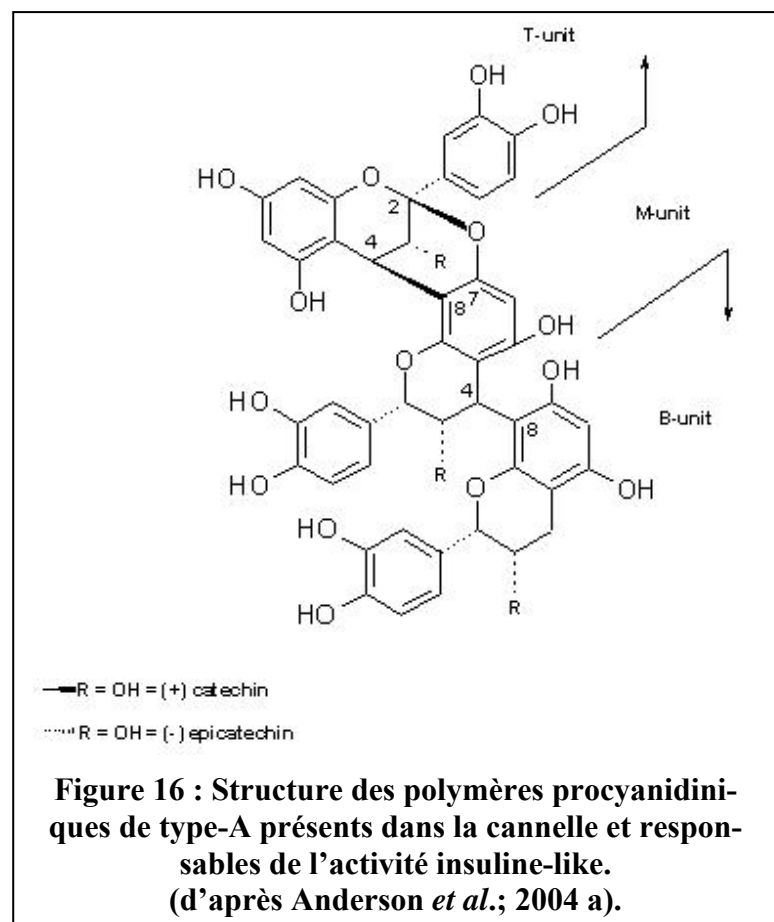
Le 2-Alkoxydihydrocinnamate fonctionne comme un agoniste du PPAR (*peroxysome proliferator-activated receptor*). Chez des rats (ZDF) génétiquement diabétiques, ce composé entraîne une réduction des concentrations sanguines en glucose ainsi qu'en triglycérides (Martin *et al.*, 2005).

Le naphthalèneméthyl ester, un dérivé d'**acide dihydroxyhydrocinnamique**, normalise la glycémie chez des souris rendues diabétiques de façon chimique ou génétique, et augmente considérablement le transport du glucose en activant la translocation du GLUT-4 (Kim *et al.*, 2006).

L'acide P-méthoxycinnamique entraîne une diminution de la concentration du glucose sanguin et normalise au niveau hépatique l'activité de la glucose-6-phosphatase, de l'hexokinase, de la glucokinase, de la phosphofructokinase, du glycogène et du glucose-6-phosphate (Adisakwattana *et al.*, 2005).

Récemment, les polymères polyphénoliques responsables de l'effet potentialisateur de l'insuline ont été identifiés dans les extraits aqueux de différentes sortes de cannelles proposées commercialement (Anderson *et al.*, 2004a). Ce sont majoritairement **des polymères procyanidines de type A** et minoritairement des procyanidines B1 et B2 (Figure 16).

Ces extraits aqueux dans lesquels on ne retrouve plus les composés présents dans l'huile de cannelle, incluant les cinnamaldéhydes, ont la même activité insuline-like *in vitro* que les extraits de cannelle avant l'extraction aqueuse (Anderson *et al.*, 2004 a).



V-3-3 - Mécanismes d'action

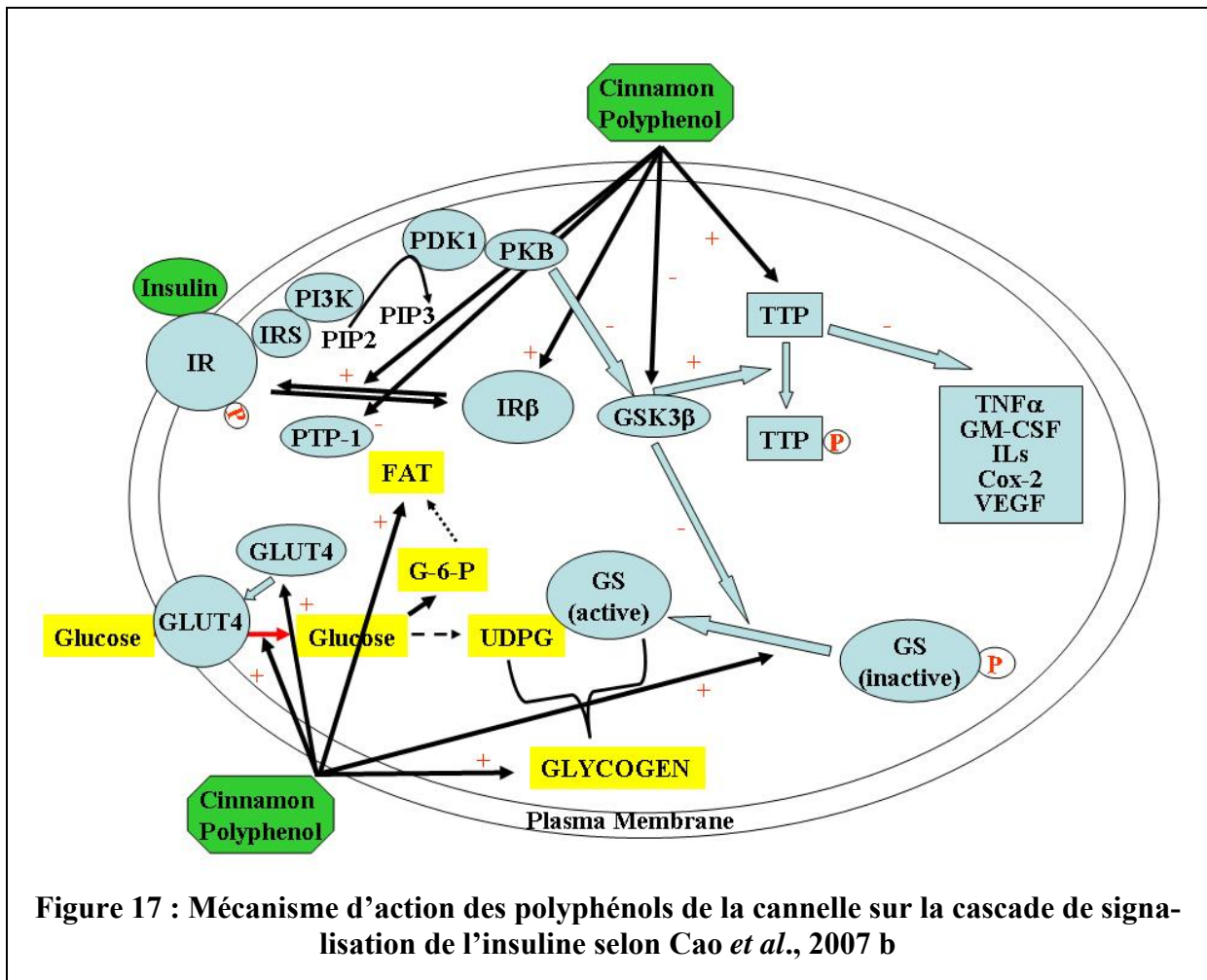
Le mécanisme d'action sur l'insuline est connu. Les polymères isolés de la cannelle modifient l'activité du récepteur à l'insuline selon un schéma bien décrit d'activation de la cascade de l'insuline. Les composés hydrosolubles de la cannelle stimulent l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline, et elle inhibe la PTP1 B (Imparl-Radosevich *et al.*, 1998). L'effet insuline-like est également confirmé sur des cultures d'adipocytes (Jarvill-Taylor *et al.*, 2001).

Cao *et al.* (2007 b) ont proposé un mécanisme d'action des polyphénols de la cannelle incluant des effets modulateurs de l'expression des gènes. En effet, les polymères polyphénoliques sont capables de réguler l'expression des gènes impliqués dans l'activation des récepteurs à l'insuline des membranes cellulaires. Ils ont la capacité d'augmenter le taux des protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline, le transport du glucose et la réponse anti-inflammatoire. Le mécanisme d'action des extraits aqueux de la cannelle est représenté dans la figure 17. Les polyphénols de la cannelle affectent plusieurs étapes de la signalisation : ils activent les récepteurs de l'insuline, ils inhibent la phosphatase qui, elle, inactive le récepteur de l'insuline, ils augmentent la quantité des IR β et des GLUT-4. Ils stimulent la glycogène synthétase en diminuant l'activité de la glycogène synthétase kinase-3 β (GSK3 β). Ils augmentent la production des protéines anti-inflammatoire (Tristetraproline) et leur activité, en diminuant leur phosphorylation par inhibition de l'activité GSK3 β (Cao *et al.*, 2007b). Toutes ces activités concourent à un transport et une utilisation plus efficace du glucose et à une mise en réserve de glycogène. Ces nouvelles études, montrant la capacité de la cannelle à bloquer l'inflammation, élargissent le potentiel de cette épice. En tant qu'agent anti-inflammatoire, la

cannelle pourrait servir à prévenir ou atténuer l'arthrose ainsi que les maladies cardiovasculaires.

V-3-4 - Etudes animales

Chez le rat adulte sous régime d'entretien, l'administration d'extraits aqueux de cannelle à 30



et 300 mg/ kg de poids corporel régule l'utilisation du glucose et potentialise l'effet de l'insuline, mesuré par la technique des clamps euglycémiques hyperinsuliniques (Qin *et al.*, 2003). Dans le muscle, la phosphorylation de l'IRS1 et le rapport IRS-1/PI 3-kinase sont également augmentés, ce qui suggère que l'augmentation de la captation du glucose constatée est due à des effets activateurs de la signalisation de l'insuline.

Dans un modèle de syndrome métabolique obtenu en utilisant un régime riche en fructose, la résistance à l'insuline des animaux est diminuée par l'administration de 300 mg d'extraits aqueux de cannelle/ jour (Qin *et al.*, 2004).

Sur modèle génétique de rats diabétiques db/db, la sensibilité à l'insuline est augmentée, et l'hyperglycémie régulée par l'administration de 50 à 200 mg d'extraits aqueux de cannelle par

kg de poids corporel pendant 6 semaines. De plus, le HDL cholestérol des animaux est augmenté, alors que les triglycérides, le cholestérol total et l'activité α -glucosidase intestinale sont significativement abaissés (Kim *et al.*, 2006).

La cannelle entraîne une baisse d'activité des saccharases, des maltases et des lactases, suggérant un mécanisme d'action complémentaire d'inhibition de la conversion des polysaccharides en sucres simples et de leur absorption.

Verspohl *et al.* (2005) ont également montré que des doses plus faibles d'extraits de cannelle (10 à 100 g/kg de régime) étaient efficaces et augmentaient la sensibilité à l'insuline. Ces résultats confirmaient la bioactivité des extraits aqueux de cannelle sur la fonction insulinique précédemment publiée (Khan *et al.*, 1990 ; Broadhurst *et al.*, 2000 ; Jarvill-Taylor *et al.*, 2001 ; Anderson *et al.*, 2004a).

Compte tenu de la relation entre l'insuline et la pression artérielle, Preuss *et al.* (2006) ont étudié l'effet de la cannelle sur la pression systolique chez des rats rendus spontanément hypertendus (SHR rats). Le saccharose dans le régime était apporté à 18 %, ce qui correspond à l'apport moyen des régimes américains. Chez le rat hypertendu, le régime enrichi en extraits de cannelle diminue l'insulinémie à jeun et la pression artérielle.

V-3-5 - Etudes cliniques

Chez des patients diabétiques de type 2, recevant 1, 3, ou 6 g/jour de poudre de cannelle encapsulée (*Cinnamomum cassia*) pendant 40 jours, la glycémie à jeun baisse de 18 à 29 %, les triglycérides de 23 à 30 %, les LDL de 7 à 27 % et le cholestérol total de 12 à 16 %, sans que des changements apparaissent dans le groupe placebo. L'effet n'est pas dose-dépendant, et se retrouve dans les trois groupes. Le bénéfice observé ne devient significatif dans les trois groupes qu'après 40 jours de supplémentation, et persiste 20 jours après l'arrêt de la supplémentation (Khan *et al.*, 2003).

De même, 3 g/j de poudre pendant 4 mois diminuent l'hémoglobine glycosylée et améliorent le profil lipidique dans le diabète de type 2 (Mang *et al.*, 2006).

Chez des sujets obèses en syndrome métabolique et recevant 500 mg/j d'extraits aqueux de cannelle, la glycémie à jeun et la pression systolique sont diminuées, et le pourcentage de masse maigre significativement augmenté. De façon intéressante, la tendance à l'amélioration observée après 6 semaines de supplémentation ne devient significative qu'après 12 semaines de traitement (Ziegenfuss *et al.*, 2006).

Cette étude suggère que la cannelle, par son impact bénéfique sur la sensibilité à l'insuline, agirait également sur la composition corporelle via la régulation de la production des adipokines et du stress oxydant. Chrysohoou *et al.* (2006) ayant en effet récemment décrit la relation inverse entre la masse grasse et la capacité antioxydante, il est possible que ce soit l'effet combiné de la régulation de la glycémie et un effet antioxydant qui soient responsables des bénéfices observés sur la diminution de la masse grasse et des signes de syndrome métabolique.

Chez des femmes souffrant de syndrome polykystique ovarien (PCOS), dont la fréquence atteint 5 à 10 % des femmes en âge de procréer, et qui s'accompagne le plus souvent d'insulinorésistance et de surpoids, 500 mg/j d'extraits aqueux de cannelle pendant 8 semaines diminuent la glycémie à jeun, la résistance à l'insuline, et améliore le test de tolérance au glucose (Wang *et al.*, 2007).

En revanche, chez des femmes ménopausées modérément obèses (IMC > 30) et souffrant de diabètes de type 2, la supplémentation par 1,5 g/j de poudre de *Cinnamomum cassia* pendant 6 semaines n'améliore pas la sensibilité à l'insuline ou le test de tolérance à l'insuline (Wang *et al.*, 2007). La durée de la supplémentation (seulement 6 semaines) pourrait expliquer cette absence de résultats.

Il est important de souligner que, comme pour le chrome, les sujets dont le contrôle glycémique est le plus bas sont ceux qui répondent le mieux à la supplémentation par la cannelle.

VI - Le Chrome

Le rôle physiologique du chrome trivalent, ainsi que les relations entre résistance à l'insuline et déficits en chrome, ont fait l'objet de revues récentes (Vincent, 2000), (Anderson, 2003), (Cefalu *et Hu*, 2004). Le chrome, oligoélément essentiel, joue un rôle clef dans l'homéostasie glucidique via un effet potentialisateur de l'insuline. La baisse de sensibilité à l'insuline s'accompagne d'hyperinsulinémie, d'une intolérance au glucose, d'une augmentation du cholestérol LDL et des triglycérides, ainsi que d'une diminution de la masse maigre. Or, toutes ces modifications se retrouvent chez les sujets déficitaires en chrome III et sont corrigées lorsque leur statut en chrome est restauré (Anderson, 2002).

En présence de chrome, la quantité d'insuline requise pour l'utilisation cellulaire du glucose est beaucoup moins importante. Cette propriété du chrome doit être prise en compte dans les états développant une résistance à l'insuline, au premier rang desquels on trouve le syndrome

métabolique, le diabète et l'obésité (Lopez-Candales, 2001). Cependant, malgré l'incidence croissante des obésités, du syndrome métabolique et des diabètes, peu de travaux ont été consacrés au chrome en France.

VI-1 - Historique

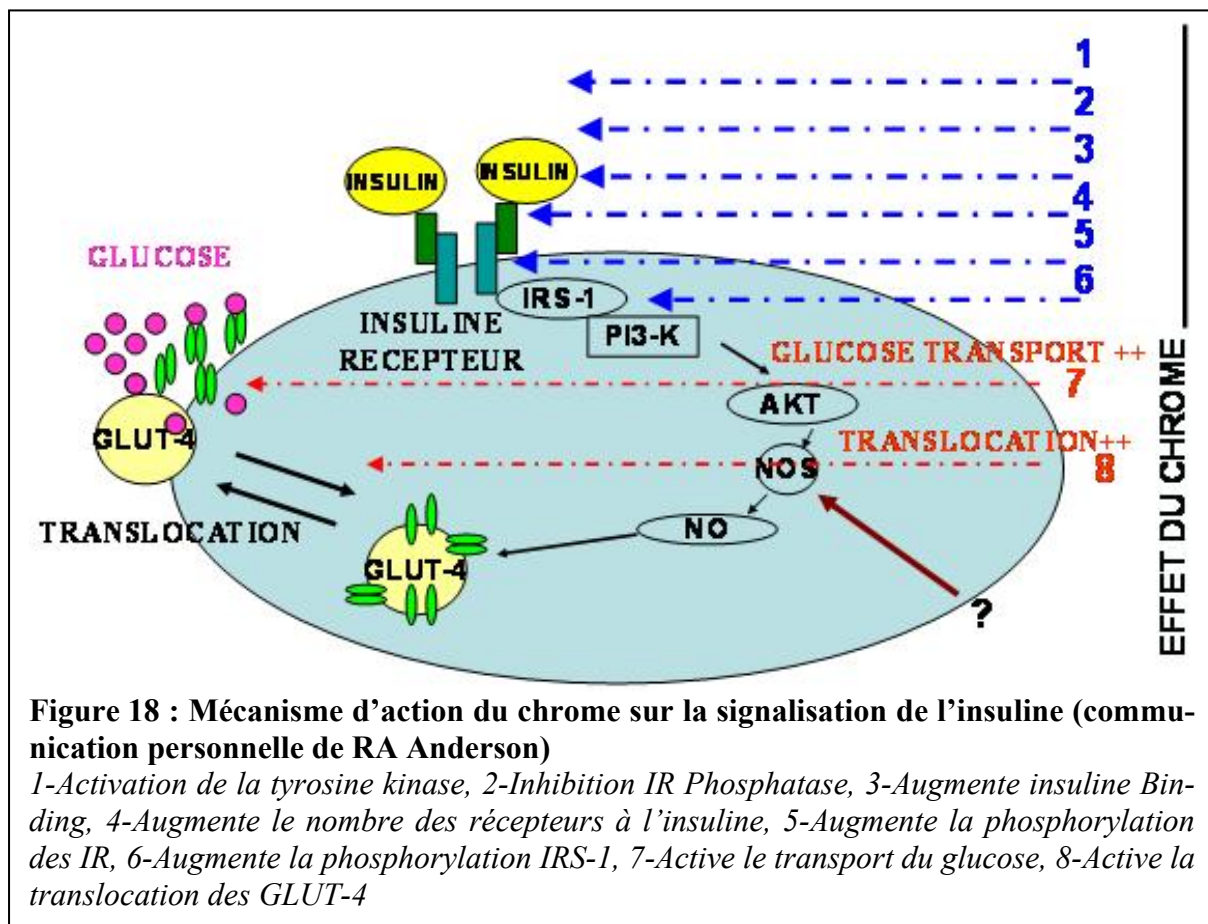
Les travaux de Walter Mertz sur le chrome (1955) et son rôle dans la régulation glucidique furent des pionniers et des précurseurs, mais c'est en 1977 seulement que la preuve de l'essentialité du Chrome III (Cr^{3+}) pour l'homme a été apportée par Jeejeebhoy (Jeejeebhoy *et al.*, 1977) chez des patients nourris de façon prolongée par voie parentérale et qui développaient une intolérance au glucose avec une résistance à l'insuline, une perte de poids inexplicquée, et une neuropathie périphérique. Ils ont vu leurs troubles disparaître après une administration parentérale de chrome III.

VI-2 - Chrome et insuline

Il existe un lien étroit entre le chrome et l'activation de l'insuline. Seul le chrome trivalent, nutriment essentiel, possède cette propriété qui n'est pas partagée par le chrome hexavalent ou tétravalent (Mertz, 1993). Le mode d'action du chrome passe par une augmentation du nombre de récepteurs de l'insuline, une modification de la liaison insuline/récepteur et une augmentation de l'internalisation de l'insuline (Anderson, 1998 a). Le récepteur de l'insuline est composé de deux sous-unités extracellulaires alpha où se trouve le site de liaison, et de deux sous-unités transmembranaires bêta. Le chrome agit sur les réactions de phosphorylation / déphosphorylation des récepteurs. La liaison de l'insuline à la sous-unité alpha du récepteur est induite par une cascade de réactions de phosphorylation par la tyrosine kinase qui est activée par le chrome. Le chrome, parallèlement, inhibe la phosphotyrosine phosphatase qui, elle, inactive le récepteur de l'insuline (Anderson, 1998 a).

Lorsque le niveau sanguin de glucose augmente, l'insuline est rapidement libérée dans la circulation sanguine. Cette hormone se lie à la partie externe de la sous-unité alpha. Cette liaison entraîne un changement de la conformation du récepteur ainsi lié. Activé, celui-ci exerce une phosphorylation des résidus tyrosine localisés au niveau de la portion interne de la sous-unité bêta.

Un oligopeptide de bas poids moléculaire, la chromoduline, activatrice, en présence d'insuline, de la tyrosine kinase du récepteur à l'insuline a également été décrit (Davis *et Vincent*, 1997).



L'augmentation du taux plasmatique de l'insuline entraîne un mouvement des ions chromiques, vers les cellules insulino-dépendantes (Morris *et al.*, 1993).

Récemment, un mécanisme d'action moléculaire impliquant une modulation de la sécrétion de TNF α par le chrome a été proposé par Jain *et Kannan* (2001). L'augmentation du TNF α cytokine qui, en bloquant l'action de l'insuline, diminue également la sensibilité à l'insuline, est impliquée dans le diabète (Kern *et al.*, 2001).

Sur des cellules adipocytaires U 937, en présence d'apports élevés de glucose mimant le diabète, une inhibition par le chrome de la sécrétion de TNF α a été observée. Le chrome bloque également la sécrétion du TNF α et la peroxydation lipidique dans ces cellules soumises à un stress induit par H₂O₂. Ces résultats suggèrent un effet antioxydant du chrome trivalent, et corroborent des travaux récents chez l'homme (Anderson *et al.*, 2001 a) (Cheng *et al.*, 2004). Récemment, un autre travail a décrit un effet protecteur du chrome contre la glycosylation protéique en utilisant des érythrocytes traités par une forte concentration en glucose (Jain *et al.*, 2006).

Comme cofacteur de l'insuline, le chrome intervient également sur le métabolisme lipidique. Le déficit en chrome est associé à une modification du métabolisme lipidique (augmentation

du cholestérol total, des triglycérides, et une diminution des HDL). Enfin, un effet du chrome sur le contrôle du poids par l'augmentation de la masse maigre et la diminution de la masse grasse (Anderson, 1998 b), (Kaats, 1996) a été décrit. Le chrome intervient également dans le métabolisme osseux (Evans *et al.*, 1995) et dans celui des hormones corticoïdes (Ravina *et al.*, 1999).

Le chrome est largement utilisé aux Etats Unis et dans l'Union Européenne sous forme de compléments alimentaires. Dans les compléments, le chrome peut être apporté sous forme minérale (chlorure), de faible absorption modulée positivement par des facteurs tels que amino-acides ou acide ascorbique, ou bien sous forme organique biologique comme les levures, mieux absorbées. D'autres formes telles que pidolate, picolinate, chrome-niacine et chrome-histidine ont une bien meilleure absorption, mais ne sont pas encore autorisées en France (Martin, 1998).

VI-3 - Apports et statut en chrome

Pour le sujet sain, un apport nutritionnel conseillé (ANC) de 50 à 70 $\mu\text{g/j}$ a été proposé en 2001 en France (Comité National d'Evaluation et des Recommandations Nutritionnel et Alimentaire (CNERNA-CNRS, 2001). Il est, de plus, conseillé par le groupe de travail Nutrition des personnes âgées de la CEDAP d'avoir un apport de 125 $\mu\text{g/j}$ à partir de 70 ans (Cynober, 2000).

Ces recommandations s'appuient sur l'absence de signes cliniques de carence pour un apport de 50 $\mu\text{g/j}$, et sur l'absence de toxicité à 200 $\mu\text{g/j}$. Cependant, sur la base de ces recommandations, l'apport optimal de chrome est impossible à atteindre pour un apport calorique de 2500 kcal/j. L'apport estimé en Amérique du Nord atteint seulement 50 à 60 % du minimum conseillé (50 $\mu\text{g/j}$). Des apports inférieurs à 20 $\mu\text{g/j}$ entraînent des effets délétères sur la glycémie et l'insulinémie de sujets développant une intolérance au glucose (Anderson, 1994).

Tableau II : Apports alimentaires en chrome chez l'adulte sain ($\mu\text{g}/\text{j}$) (références des études dans Roussel *et Anderson* (2005).

Gibson <i>et coll.</i> (1984)	55,5 \pm 33,5 (11-157) (Femmes canadiennes)
Bunker <i>et coll.</i> (1984)	24,5 (13,6-47,7) (Hommes âgés anglais)
Anderson et Kozlovsky (1985)	33 \pm 3 (22-48) (Hommes) et 25 \pm 1 (13-36) (Femmes)
Offenbacher <i>et coll.</i> (1986)	37,1 (15-55) (Hommes) (USA)
Anderson <i>et coll.</i> (1988)	27 \pm 2 (Femmes contrôles) et 41 \pm 2 (allaitantes) (USA)
Anderson <i>et coll.</i> (1992)	15 $\mu\text{g}/1000\text{Kcal}$ (Diets and Food) (USA)
Parr <i>et coll.</i> (1992)	82,5 \pm 23,5 (6 pays)
Kumpulainen <i>et coll.</i> (1992)	31 \pm 22 (Femmes finlandaises)
Anderson <i>et coll.</i> (1993)	38,8 \pm 6,5 (Hommes) et 23,1 \pm 2,9 (Femmes) (USA)
Van Cauvenberg <i>et coll.</i> (1996)	30,8-57,9 (Militaires belges)
Garcia <i>et coll.</i> (2001)	100 (9,39-205,16) (Hommes et Femmes espagnols)
Roussel <i>et coll.</i> (2007)	30 à 45 $\mu\text{g}/\text{j}$ (Sujets âgés sains)

Nous disposons de peu de résultats validés et réalisés sur des échantillons de repas exempts de contamination. Aux USA, chez l'adulte jeune (Anderson *et al.*, 1992), les valeurs mesurées sont plus basses. En Europe, les valeurs trouvées sont très proches de celles de l'étude française. En Finlande, en Suède et en Suisse, les apports sont évalués à environ 50 $\mu\text{g}/\text{j}$ ou plus bas (Kumpulainen, 1992) . En Belgique et en Pologne, ils ont été respectivement mesurés à 53 \pm 31 $\mu\text{g}/\text{j}$ (Van Cauwenbergh *et al.*, 1996), et à 60-90 $\mu\text{g}/\text{j}$ (Marzec, 2004).

Dans quelques études, des apports supérieurs ont été cependant publiés. Au Canada, 96,4 $\mu\text{g}/\text{j}$ ont été rapportés après analyse de repas dupliqués chez 90 femmes âgées vivant en autonomie (Gibson *et al.*, 1985). En Grèce et en Espagne les valeurs sont plus hautes : 143 $\mu\text{g}/\text{j}$ (Bratakos *et al.*, 2002) et 129 $\mu\text{g}/\text{j}$ (Garcia *et al.*, 2001) ou 88,3 $\mu\text{g}/\text{j}$ (Bocio *et al.*, 2005). En France, 154 $\mu\text{g}/\text{j}$ (Noel *et al.*, 2003) et 98 $\mu\text{g}/\text{j}$ (Biego *et al.*, 1998) ont été rapportés pour l'adulte.

Dans l'étude française publiée récemment par notre groupe (Roussel *et al.*, 2007), nous avons observé que plus de 90 % des apports journaliers, mesurés analytiquement à partir des repas

librement consommés par les volontaires de cette étude, n'atteignaient pas les recommandations pour les adultes et que, a fortiori, tous étaient inférieurs aux 2/3 des recommandations pour le sujet âgé.

De grandes différences de méthodologie et des risques élevés de contamination pourraient partiellement expliquer la discordance des études.

Parmi les aliments, les plus riches en chrome sont les épices, la levure, le foie (Anderson *et* Kozlovsky, 1985). La plupart des autres aliments contiennent moins de 10 µg/100g. La biodisponibilité du chrome est très basse pour la viande, le lait et les légumes verts. Elle augmente pour les céréales mais le raffinage appauvrit considérablement la teneur en chrome.

VI-4 - Chrome et prévention des pathologies

VI-4-1 – Chrome, syndrome métabolique et obésité

Le statut en chrome, essentiel à la fois aux fonctions insuliniques, aux régulations lipidiques et glucidiques, et au maintien de la masse maigre, est déficitaire chez l'obèse et dans le syndrome métabolique (Volpe *et al.*, 2001), en raison des apports insuffisants, mais aussi de la consommation excessive de glucides d'absorption rapide qui favorisent les fuites urinaires de chrome.

Des apports insuffisants en chrome entraînent une insulïnémie élevée, une augmentation des taux plasmatiques de glucose, de cholestérol, de cholestérol LDL, de triglycérides, une baisse des HDL cholestérol, signes retrouvés dans le syndrome métabolique. L'ensemble de ces modifications s'accompagne d'une augmentation du risque cardiovasculaire et du risque de diabète.

L'effet bénéfique d'apports en chrome, permettant de restaurer le statut et d'améliorer la sensibilité à l'insuline, a été souligné par de nombreuses études, mais cet effet dépend essentiellement du statut en chrome des sujets. Seuls les sujets déficitaires sont répondeurs, ce qui explique, en partie, les résultats décevants d'une méta analyse publiée récemment (Althuis *et al.*, 2002), qui ne conclue pas à un effet significatif des suppléments en chrome sur la sensibilité à l'insuline dans des groupes de sujets d'âge et d'insulinorésistance variables.

Le rôle du chrome dans l'obésité et la prévention du syndrome métabolique passe par plusieurs mécanismes :

- le contrôle de l'insulïnémie,

- les relations avec les glucocorticoïdes,
- les mécanismes de satiété,
- le maintien de la masse maigre,
- la modulation du $TNF\alpha$, car l'importance de l'obésité est corrélée à ce facteur, qui favoriserait l'insulino-résistance des cellules.

Les triglycérides cytosoliques, accumulés dans les tissus non adipeux tels que les muscles, le foie ou les cellules β pancréatiques chez l'obèse, sont augmentés et participent à l'insulinorésistance (Kraegen *et al.*, 2001). Chez l'homme (Abraham *et al.*, 1992) comme chez l'animal (Striffler *et al.*, 1998), l'administration de chrome conduit à une baisse des triglycérides.

Chez 29 sujets à haut risque de développer un diabète de type 2, une supplémentation par 1000 $\mu\text{g/j}$ de picolinate de chrome administrés 8 mois a significativement amélioré la sensibilité à l'insuline (Cefalu, *et al.*, 1999). Une étude récente de supplémentation par un complexe Cr-niacine (Preuss *et al.*, 2002) a également montré son efficacité sur la sensibilité à l'insuline et les altérations du système insuline/glucose rencontrées chez l'obèse et dans le syndrome X.

Les taux d'insuline circulante, comme son efficacité, sont améliorés par des apports en chrome. Or ces taux sont positivement corrélés à la masse grasse, et influencent la satiété et la thermogénèse. Il n'est donc pas surprenant que le chrome influence la composition corporelle. Kaats *et al.* (1996) ont rapporté des effets bénéfiques de la supplémentation en chrome sur le pourcentage de masse grasse, qui est diminué, et celui de masse maigre, qui est augmenté. D'autres études ont confirmé le maintien de la masse maigre (Bahadori *et al.*, 1997), (Grant *et al.*, 1997). Chez des sujets obèses atteints de syndrome polykystique ovarien, la sensibilité à l'insuline a été améliorée par la supplémentation en chrome sous forme de picolinate (1000 $\mu\text{g/j}$) (Lydic *et al.*, 2006) (Lucidi *et al.*, 2005).

VI-4-2 – Chrome et diabètes

Diabète de type 2

Grâce à la mise au point de méthode d'analyses plus sensibles du chrome, et à des risques de contamination mieux contrôlés, les études sont plus fiables et leurs résultats plus homogènes. Ces études ont permis de préciser la supplémentation en chrome qui semble efficace de 400 à 1000 $\mu\text{g/j}$ chez les sujets diabétiques de type 2, avec une baisse de l'hémoglobine glycosylée, une baisse de la glycémie et la régulation des paramètres lipidiques.

La réponse à la supplémentation va dépendre du statut en chrome, de la dose de supplémentation, et de la forme d'administration. Des patients diabétiques qui reçoivent 250 µg ou moins de chrome par jour ne répondent pas à la supplémentation, alors que l'effet de doses plus élevées (400 à 600 µg/j) peut être bénéfique (Anderson, 1998 a). A des doses nettement plus élevées (de 400 à 1000 µg/j), une baisse significative de l'hémoglobine glycosylée et de l'insulinémie, dont l'importance dépend de la dose de chrome administrée, a été observée en réponse à une supplémentation en chrome chez le diabétique de type 2 durant 4 mois (Anderson *et al.*, 1997 b).

Rabinovitz et ses collaborateurs ont étudié l'effet d'une supplémentation en chrome sur 39 sujets diabétiques de type 2, âgés en moyenne de 73 ans. En plus de leur traitement habituel, les participants ont reçu deux fois par jour 200 µg de chrome tout en suivant un régime hypoglycémiant et hypocalorique à 1500 kcal/jour. Après trois semaines, les auteurs de cette étude ont observé une diminution significative de la glycémie de 189 à 150 mg/dl, et du cholestérol total de 225 à 211 mg/dl (Rabinovitz *et al.*, 2004). Plus récemment, une revue conclue à l'efficacité de la supplémentation en chrome III dans le diabète (Broadhurst *et* Domenico, 2006), et des effets bénéfiques sur le poids et la sensibilité à l'insuline sont publiés (Martin *et al.*, 2006) (Racek *et al.*, 2006). Cependant, une prise de position de la FDA (Trumbo *et* Ellwood, 2006) concluant à l'inutilité de la supplémentation en chrome, et une étude publiée en 2007, dans laquelle on observe aucun effet d'une supplémentation par 400 µg/j de chrome sous forme de levure durant 6 mois (Kleefstra *et al.*, 2007), ont réouvert le débat.

Diabète gestationnel

Au cours de la grossesse, une insulino-résistance se développe dès la 24^{ème} semaine de gestation. Si elle n'est pas compensée, elle conduit au diabète gestationnel. Selon Morris *et al.* (2000), le stress induit par la grossesse sur le système glucose/insuline entraîne une déplétion des réserves en chrome. Dans une étude contrôlée *versus* placebo, le bénéfice d'une supplémentation en chrome apportant 4 ou 8 µg/kg en chrome pendant 8 semaines chez des femmes souffrant d'un diabète gestationnel a été montré, avec une baisse significative de la glycémie à jeun et celle de l'insulinémie. Le groupe recevant la plus forte supplémentation présentait les taux de glucose postprandiaux les plus bas (Jovanovic *et al.*, 1999).

Diabète stéroïdien

L'administration de glucocorticoïde est une cause de résistance à l'insuline et de diabète induit. Or, ce traitement provoque de plus, une augmentation des pertes urinaires de chrome qui

pourraient aggraver l'insulinorésistance . L'administration de chrome à 600 µg/j a permis, non seulement de restaurer la sensibilité à l'insuline, mais également de supprimer les traitements hypoglycémians chez ces sujets (Ravina *et al.*, 1999).

VI-4-3 – Chrome et risque cardiovasculaire

De nombreuses études évaluant les effets d'une supplémentation en chrome sur le métabolisme du sucre et de l'insuline ont également étudié son action sur les lipides sériques. Un certain nombre d'entre elles ont montré que le chrome diminue les niveaux de cholestérol total et de triglycérides, tout en augmentant le LDL cholestérol.

Cette action du chrome sur le métabolisme lipidique pourrait avoir un effet bénéfique sur le risque cardiovasculaire, comme le suggère une étude cas-contrôle chez des sujets ayant survécu à un infarctus : les taux de chrome étaient 13 % plus bas chez les sujets ayant un infarctus versus les témoins. De plus, dans cette étude, les taux de chrome étaient plus faibles chez les individus plus âgés, ce taux déclinant de 9 % par dizaine d'années de vieillissement. Ces taux étaient également plus faibles chez ceux ayant une pression sanguine élevée. D'autres analyses ont montré que les sujets ayant les taux de chrome les plus élevés avaient 35 % de moins de risque d'avoir un infarctus que ceux ayant les taux les plus bas (Guallar *et al.*, 2005). L'index athérogène du plasma, prenant en compte les triglycérides et les HDL cholestérol, est réduit par la supplémentation combinée chrome/ biotine, suggérant un effet protecteur contre la maladie cardiovasculaire (Geohas *et al.*, 2007).

VI-4-4 – Chrome et stress oxydant

Paradoxalement, le lien entre stress oxydant et résistance à l'insuline est très peu étudié. Le chrome agissant comme potentialisateur de l'insuline et comme antioxydant pourrait être un élément clef de cette relation.

Alors que le chrome VI, issu de la pollution industrielle, est un puissant agent pro-oxydant et mutagène, le chrome III, micronutriment essentiel, agit comme protecteur hépatique de la lipopéroxydation (Tezuka *et al.*, 1991) et augmente le pouvoir antioxydant global cellulaire chez le rat (Ueno *et al.*, 1988).

Les premiers travaux ayant suggéré un effet antioxydant du Chrome III ont été réalisé sur un modèle de rats hypertendus. Preuss *et al.* (1997) ont comparé les effets de différentes formes de chrome sur l'hypertension et sur la production des radicaux libres. Des rats développant spontanément une hypertension induite par une forte concentration de saccharose dans leur

eau de boisson, recevaient dans leur régime différentes formes de Cr III (nicotinate de chrome, picolinate de chrome, acétate de chrome, ou du chlorure de chrome). La supplémentation en chrome prévenait l'augmentation de la pression systolique induite par le sucre. Le nicotinate de chrome, l'acétate de chrome et le picolinate de chrome abaissaient également les niveaux de l'HbA1c. Seuls, le nicotinate et l'acétate réduisaient de façon significative les lésions radicalaires sur les lipides au niveau hépatique et rénal, tandis que le picolinate diminuait les lésions au niveau hépatique seulement. Cette étude confirmait l'effet protecteur hépatique du chrome sur la lipopéroxydation lipidique décrit par l'équipe de Tezuka (Tezuka *et al.*, 1991). Ces travaux ont été complétés par une étude menée chez le rat, où la supplémentation en chrome augmente le pouvoir antioxydant global cellulaire (Ueno *et al.*, 1988). Chez l'homme, un effet antioxydant du chrome chez le diabétique de type 2 (Anderson *et al.*, 2001a) après supplémentation par 600 µg/j, 6 mois, sous forme de pidolate a été décrit. Cheng *et al.* (2004) ont confirmé cet effet antioxydant chez des sujets diabétiques ou non, recevant 600 µg/j de chrome sous forme de levure durant 6 mois. Plus récemment, le chrome, administré sous formes de levure à 400 µg/j a été décrit comme capable de réduire le taux des paramètres du stress oxydant chez des sujets diabétiques (Racek *et al.*, 2006).

Une supplémentation en chrome permet également d'empêcher la peroxydation des lipides *in vitro*, d'une façon dose-dépendante de la concentration en chrome (Yang *et al.*, 2006). Ces données suggèrent que le chrome a son importance dans le traitement ou la prophylaxie de l'insulinorésistance et des dyslipidémies liées à l'obésité, qui génèrent un stress oxydant, donc un rôle dans la prise en charge du syndrome métabolique.

VII – Conclusions

Compte tenu des liens métaboliques étroits qui lient, dans le syndrome métabolique, l'insulinorésistance et le stress oxydant, les facteurs nutritionnels susceptibles de freiner le stress oxydant et d'améliorer la sensibilité à l'insuline devraient offrir des moyens, simples à mettre en œuvre, de prévention du syndrome métabolique et de ses conséquences pour la Santé de l'homme.

La revue de la littérature présentée dans cette première partie montre qu'un faisceau de résultats expérimentaux réalisés sur l'animal ou par culture cellulaire, et de nombreuses études cliniques chez des sujets en surpoids, ou en syndrome métabolique, ou souffrant de diabète de type 2, soutiennent cette hypothèse. Le chrome, les polyphénols du thé, et ceux de la cannelle, ont montré leur efficacité à améliorer la sensibilité à l'insuline. Selon notre hypothèse, ce mé-

canisme passe également par une modulation du stress oxydant engendré par l'insulinorésistance et la glucotoxicité.

C'est pourquoi, en nous appuyant sur un modèle animal de syndrome métabolique validé, le rat nourri avec un régime riche en fructose, nous avons mené une série d'expériences visant à étudier l'effet du thé, de la cannelle et du chrome à la fois sur la signalisation de l'insuline, l'homéostasie glucidique et les paramètres du stress oxydant.

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS

VIII - Matériel et méthodes

VIII-1 - Le modèle animal de syndrome métabolique

VIII-1-1 - Animaux

Les rats utilisés au cours des différentes études sont de souche Wistar (150 ± 10 g) et fournis par les laboratoires Charles Rivers (Les Oncins, France). Afin d'éviter la variabilité inter-sexe, nous n'avons utilisé que des mâles. Les animaux sont stabulés individuellement, en cage polystyrène thermoformée, en accord avec les standards accrédités par le Ministère de l'Agriculture et de l'Environnement, dans une pièce maintenue en surpression et éclairée 12/24. La température est contrôlée à 21 ± 1 °C avec une humidité relative de 55 %. Les animaux ont accès à volonté à la nourriture et à la boisson. Les rats sont placés en cage par deux. Durant nos études, ils ont été pesés tous les 2 à 3 jours jusqu'à leur sacrifice.

VIII-1-2 - Régime induisant le syndrome métabolique

Nous avons induit un syndrome métabolique chez le rat en lui administrant un régime riche en fructose (65%) selon Busserolles *et al.* (2003 a). La composition du régime est décrite dans le tableau III. Les régimes ont été réalisés par SAFE (Augis, France).

Tableau III : Composition du régime riche en fructose selon Busserolles *et al.* (2003 a) (g / 100 g poids sec)

Fructose	650
Caséine	200
Alphacel	50
DL méthionine	3
Choline bitartrate	2
Huile de maïs	50
Sels minéraux	35
Vitamines	10

Nous avons validé ce régime en mesurant les marqueurs biologiques du syndrome métabolique (hypertriglycémie, résistance à l'insuline et stress oxydant) dans deux groupes de 10 rats, ceux recevant le régime fructose à 65 % et ceux recevant un régime d'entretien contenant des glucides complexes, amidon (55 %) et maltodextrine (10 %). Comme indiqué dans le

tableau IV, chez les rats recevant le régime fructose 6 semaines, les taux à jeun de glucose, triglycérides, et TBAR's plasmatiques étaient significativement plus élevés que chez les rats recevant le régime d'entretien alors que leur insulinémie à jeun était significativement plus haute.

Tableau IV : Paramètres plasmatiques

Paramètres plasmatiques à jeun	Régime Contrôle	Régime Fructose
Glucose (mmol/L)	6,6 ± 0.4	10,7 ± 0,4*
Triglycérides (g/L)	0,48 ± 0,06	1,27 ± 0,33*
Insuline (pmol/L)	107 ± 34	411 ± 99*
TBAR's (µmol/L)	3,6 ± 0,3	4,75 ± 0,28*

*p<0.05

VIII-2 - Les analyses biologiques

VIII-2-1 - Prélèvements

Les animaux, à jeun depuis une nuit, sont anesthésiés avec une dose de pentobarbital disodique (1 ml/g de poids) par injection intrapéritonéale et sacrifiés.

Le sang est prélevé par ponction cardiaque sur tube héparine-lithium, puis traité immédiatement selon les besoins de l'analyse.

Les organes sont prélevés, lavés dans une solution de NaCl 9 %, puis pesés, plongés dans l'azote liquide, et stockés à – 80°C jusqu'à l'analyse.

VIII-2-2 - Préparation des homogénats

100 mg de tissus par 1 ml de milieu d'homogénéisation (Tris-Base 10 mM, Acide Diéthylène Triamine Penta (DTPA) 1 mM, acide PhenylMethylSulFonyl (PMSF) 1 mM) sont homogénéisés à l'aide d'un Potter en verre. Les broyats sont centrifugés à 3000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Les analyses sont effectuées sur le surnageant de centrifugation.

VIII-2-3 - Analyses biologiques

VIII-2-3-1 - Glucose, triglycérides et insuline plasmatiques Le dosage de l'insuline a été fait par technique Elisa. La concentration du glucose et des triglycérides a été mesurée par

méthode colorimétrique et enzymatique sur automate Hitachi 917 (Roche Diagnostique, France).

VIII-2-3-2 - Etude du stress oxydant

L'appréciation de l'importance du stress oxydant dans de nombreuses pathologies nécessite la mise en oeuvre de différents dosages dont le plus utilisé est celui du malondialdéhyde (MDA) plasmatique, un des produits terminaux formés lors de la dégradation des acides gras polyinsaturés médiée par les radicaux libres. Son dosage est le plus souvent réalisé par condensation en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique. Cette réaction est sensible mais sa spécificité, même en améliorant les stades préanalytiques (conditions de prélèvement, adjonction de conservateur) et analytique (fluorescence, et chromatographie liquide haute performance (CLHP), reste discutée (cf.ci- dessous § marqueurs de peroxydation lipidique)

Dosage des FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma: (Benzie et Strain, 1996).

Ce test peut être utilisé comme un index du pouvoir antioxydant des défenses non enzymatiques du plasma. Il est basé sur la mesure de la réduction par le plasma d'une solution comprenant du tampon acétate ($C_2H_3NaO_2$, $3H_2O$ et $C_2H_4O_2$) à pH 3,6, une solution à base de 2,4,6 Tripyridyl-s-triasine (TPTZ) à 10 mM, et un sel ferrique ($FeCl_3$, $6H_2O$) à 20mM, ce qui provoque une coloration du complexe TPTZ- Fe^{++} . Une gamme étalon est obtenue à partir d'une solution mère de $FeSO_4$, $7H_2O$ à 1mM (31,25 μM à 500 μM). La solution FRAP est préparée à partir des trois solutions initiales (Tampon acétate, TPTZ et $FeCl_3$, $6H_2O$) et placée à 37°C pendant toute la durée de l'analyse. 100 μl d'échantillons ou de solution-gammes sont ajoutés à 900 μl de la solution FRAP. La lecture des échantillons se fait après 4 minutes par spectrométrie à 593 nm.

Marqueurs de peroxydation lipidique (Mesure des TBARS) (Thiols Barbituric Acide Reactive Species) (Richard et al., 1992) .

Limites et intérêt de la méthode : Malgré sa non-spécificité, l'utilisation de la réactivité du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique reste encore aujourd'hui un des tests « classiques » dans l'évaluation du stress oxydant. Si le dosage des TBARS présente d'excellentes qualités sur le plan de la sensibilité, et si sa mise en oeuvre est simple, son absence de spécificité analytique liée à la fois aux interférences de cette méthode et aux conditions drastiques nécessaires à la formation du dérivé MDA-(TBA)₂ coloré, limite cependant son intérêt. En effet, la lecture de la réaction colorée mesure non seulement le malondialdéhyde préexistant, mais aussi le malondialdéhyde formé de manière artefactuelle par la décomposition thermique des peroxydes, et par celle de ceux générés au cours de la réaction.Ce dosage est

donc la somme du malondialdéhyde préexistant lié ou non aux molécules biologiques, des peroxydes lipidiques, des produits d'auto-oxydation des acides gras et d'autres substances qui donnent naissance soit à du malondialdéhyde, soit à des molécules réagissant avec l'acide en milieu acide et à chaud. Une des sources de l'hétérogénéité des résultats observés avec les TBARS est liée au nombre important de molécules différentes qui ne relèvent pas forcément du stress oxydant, mais qui réagissent avec de l'acide thiobarbiturique. Les interférences avec la réaction au TBA sont nombreuses : autres aldéhydes (4-hydroxynonanal, hexanal, propanal), pigments biliaires, acides aminés, ADN. Par ailleurs, de nombreux constituants du plasma présentent une fluorescence dans la même zone spectrale que le complexe MDA-(TBA)₂. Cependant à ce jour, ce marqueur reste le plus utilisé pour déterminer le stress oxydant et la détermination des TBARS reste un test donnant un résultat global, permettant une première approche de la lipoperoxydation et du stress oxydant. Plusieurs modes de lectures permettent la quantification du dérivé MDA-(TBA)₂. La fluorimétrie, que nous utilisons au laboratoire, est une méthode simple, rapide, applicable en routine et particulièrement intéressante pour les études de dépistage. Elle peut se faire sur de faibles volumes d'échantillons et elle est dix fois plus sensible que la mesure de l'absorbance (Yagi, 1976). La principale difficulté de la fluorescence est liée à la proximité des longueurs maximales d'excitation et d'émission de l'adduit MDA-(TBA)₂. La mesure en fluorescence synchrone permet d'augmenter la spécificité et la sensibilité analytiques les rendant comparables à celles obtenues en HPLC. La chromatographie mise en œuvre après dérivation à l'acide thiobarbiturique ne permet pas d'éviter la production artéfactuelle engendrée par le chauffage en milieu acide, mais permet d'éliminer les TBARS autres que le malondialdéhyde. Des mesures effectuées au laboratoire ont montré une corrélation très significative ($r=0,80$; $p=0,0001$) entre la méthode de dosage par fluorimétrie et celle par CHLP selon Knight *et al.*, 1988. Ce résultat confirme que les méthodes par fluorimétrie donnent une vue globale de peroxydation et justifie leur utilisation dans une première approche pour l'étude d'un stress oxydant ou en complément d'autres marqueurs de stress oxydant, pour confirmer la présence d'un déséquilibre de la balance antioxydant/proxydant, ce que nous avons fait dans ce travail.

Dans notre travail, cette analyse a été réalisée sur plasma, sur tissus ou sur culture cellulaire. 750 μ L d'un mélange (2 /1 v:v) d'acide thiobarbiturique (TBA 0,55 mM, pH 7,4) et d'acide perchlorique (HClO₄) 7 % sont ajoutés à 100 μ l d'échantillon. Après agitation (vortexer vigoureusement pendant 2min), le mélange est incubé au bain marie à 95°C pendant 1 heure. Durant cette étape, les fonctions aldéhydiques du dialdéhyde malonique (MDA) sont libé-

rées par l'hydrolyse acide à 95°C. Elles réagissent avec le TBA en formant un complexe coloré en rose (MDA-TBA). Pour arrêter la réaction, les tubes sont placés dans la glace. Le complexe ainsi formé est extrait par le butanol pendant 2 minutes. Après centrifugation, la quantification du complexe est effectuée sur un spectrophotomètre à fluorescence Hitachi F4500 (Roche diagnostic France) à une longueur d'onde d'excitation de 532nm et une longueur d'onde d'émission de 553nm. La courbe de calibration est obtenue à partir d'une solution stock de 1,1,3,3-TétraEthoxyPropane (TEP) à 20mmol/L, la gamme étant comprise entre 1 et 8mmol/L

Oxydation des Protéines (dosage des groupements Thiols) (Faure et Lafond, 1995)

Réactifs nécessaires au dosage : Tampon phosphate, 50 mM, pH 8, (KH₂PO₄ 50 mM , Na₂HPO₄, 2H₂O), EDTA, 1 mM, DTNB 2,5 mM préparé dans le tampon phosphate à 50 mM.

Procédure : la technique a été automatisée sur Hitachi 704 : 20 µl d'échantillon ou de gamme sont ajoutés à 50 µl de tampon Phosphate et 20 µl de DTNB. Après 15 minutes d'attente à l'obscurité, la lecture est réalisée sur à 415 nm

Lors de l'oxydation des protéines, les groupements SH sont oxydés et forment des ponts disulfure S-S. Le principe du dosage des groupements SH est basé sur leur réaction avec le 5-5'-DiThiobis(2-acide NitroBenzoïque) (DTNB) pour former un composé coloré ($\lambda = 415$ nm). La gamme étalon est obtenue avec une solution de N-Acetyl-Cystéine (NAC) 0,125 à 0,6 mmol/L.

Glutathion réduit et oxydé : (Akerboom et Sies, 1981)

La compréhension du rôle physiopathologique exact du glutathion nécessite le développement de méthodes de dosage sensibles, spécifiques et rapides. Aucune méthode de référence n'a été établie. L'enzymocolorimétrie et la chromatographie liquide haute performance (CLHP) sont les principales actuellement utilisées. La méthode CLHP a l'avantage de permettre de pouvoir doser un grand nombre d'échantillons dans un temps limité. De plus, dans cette technique ce sont le glutathion réduit et le glutathion total qui sont dosés alors que, dans la méthode colorimétrique, la valeur du GSH est déduite à partir du GSH total et du glutathion oxydé. En raison de la faible teneur en GSSG des échantillons biologiques, une erreur due à un manque de sensibilité de la méthode de dosage n'est pas exclue et elle peut, de ce fait, être répercutée sur l'expression du GSH. Pour des raisons matérielles, nous avons utilisé une méthode spectrophotométrique. Toutefois, la qualité du dosage spectrophotométrique n'a jamais à notre connaissance été remise en cause.

600 µl de sang sont ajoutés, dans les 30 minutes suivant le prélèvement, à 120 µl d'Acide Méta-Phosphorique (MPA 6%) avant d'être centrifugés à 1700 g pendant 10 min à 4 °C. Le dosage est réalisé sur le surnageant. Les homogénats déprotéinés sont neutralisés par une solution de MOPS 0,4 M/EDTA 2 mM, pH 6,75. Le principe du dosage du glutathion est basé sur la réduction du 5-5'-DiThiobis(2-acide NitroBenzoïque) (DTNB à 1,5 mg/ml) par le NADPH (4 mg/ml, dissoudre 16 mg dans 4 ml de bicarbonate à 0,5%). La formation de 5-Thio-2-NitroBenzoate (TNB) est suivie par spectrophotométrie à 412 nm. La sensibilité du dosage peut être augmentée en mesurant la disparition du NADPH par fluorimétrie. La calibration est obtenue à partir d'une solution mère de glutathion standard à 40 µM (de 2 µM à 40 µM).

1ml de MOPS, 50µl NADPH, 20 µl de GRase (5 U/ml), et 20 µl de DTNB sont ajoutés à 100 µl d'échantillon, la lecture est effectuée par spectrométrie à 412 nm

Dosage du glutathion oxydé :

Les échantillons sont préparés selon la procédure suivante :

Echantillon : 500 µl ou 250 µl

Ethanolamine (diluée au 1/2) : 40µl ou 20 µl

2 Vinyl Pyridine (à 97%) : 10µl ou 5 µl

Après 1 h d'attente à température ambiante, les échantillons sont dosés comme précédemment.

Remarque : le 2vinyl Pyridine permet de bloquer les fonctions SH du glutathion réduit ; L'éthanolamine neutralise les surnageants de déprotéinisation afin de permettre la réaction GSH avec le 2vinyl Pyridine .

Calcul : $[GSSG] = Y(\text{lue sur la gamme}) \times 5 \mu\text{M/l}$

- facteur 5 =dilution par 10 dans MPA et divisé par 2(car 2 molécules de GSH réduit pour 1 molécule GSSG).
- Le GSH est déduit de la formule = $[GSht] - [GSSG]$

Dommages oxydatifs des ADN : (Hininger et al., 2004).

Cette technique a été réalisée à partir de sang total congelé ou sur cellules ou sur tissus frais.

Préparations des échantillons pour analyse sur

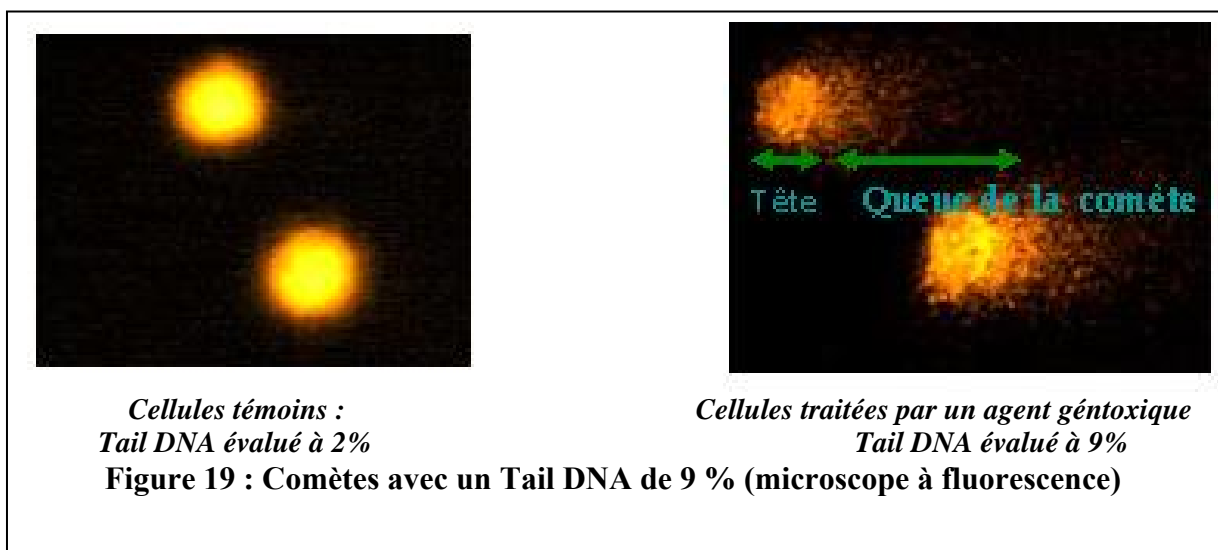
- le sang : 500 µl de sang total sont traités avec 500 µl de RPMI-1640, contenant 20 % de DMSO et congelés progressivement dans un congélateur progressif (bicell) une nuit à

-80°C puis stockés dans l'azote liquide jusqu'à analyse. Les échantillons sont rapidement décongelés à 37°C, puis repris dans 1,4 ml de PBS 1 X sans Ca⁺⁺ et sans Mg⁺⁺ et centrifugés à 300g pendant 10 min à température ambiante. Cette étape de lavage est répétée une fois. Le culot est remis en suspension dans 300 µl de PBS 1 X sans Ca⁺⁺ et sans Mg⁺⁺ et mélangé délicatement.

- les tissus : un éminçat est réalisé à partir de 200 mg de tissus dans 2 ml de PBS 1 X sans Ca⁺⁺ et sans Mg⁺⁺.
- les cultures cellulaires : Une suspension cellulaire (20000 cellules) à partir du sang total, de l'éminçat ou d'une culture cellulaire est diluée au 1/2 dans de l'agarose à point de fusion à basse température (Low-Melt) (1,2 % dans PBS) (soit 60 µl de la préparation de sang pour 120 d'agarose). Un volume de 110 µl de ce mélange est ensuite déposé sur une sous-couche d'agarose (1% dans du PBS) coulée préalablement sur une lame de verre dépolie puis recouvert d'une lamelle et déposé sur un lit de glace et protégé de la lumière par une feuille d'aluminium pendant 10 minutes pour une prise en masse rapide du Low-Melt. Les membranes plasmiques et nucléaires sont éliminées par un tampon de lyse (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tris-acide, 1% de sarcosinate de sodium, pH 10, additionné extemporanément par 1 % de triton X100 et de 10 % de DMSO). Les lames sont immergées dans ce tampon toute la nuit à 4°C et à l'obscurité. L'ADN ainsi libéré peut se dérouler dans des conditions dénaturantes. La dénaturation de l'ADN est effectuée en milieu basique pH = 13. Les lames sont placées dans la cuve d'électrophorèse et recouvertes du tampon d'électrophorèse (75 ml de NaOH 10 N, 12,5 ml EDTA 200 mM, qsp 2500 ml d'eau distillé), pendant 40 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Cette étape permet de débobiner l'ADN et de mettre en évidence des sites alcali-labiles. L'ADN est soumis à une électrophorèse. Le matériel génomique cassé migre alors vers l'anode, ce qui forme la comète (Figure 19). L'expérience peut se faire en milieu neutre ou alcalin, ce qui permet la détection respectivement des cassures doubles et simples de brin d'ADN. Une tension de 25 V, 300 mA est appliquée pendant 30 minutes afin d'obtenir la migration des fragments d'ADN. Après électrophorèse, les lames sont retirées de la cuve, égouttées, et rincées avec le tampon de neutralisation (Tris-base 0,4 M, pH 7,5, trois fois 5 minutes). Enfin, l'ADN est visualisé grâce à un intercalant (BET à 20 µg/ml, $\lambda_{ex}=510$ nm et $\lambda_{em}=595$ nm) qui le rend fluorescent. Une lamelle est ensuite délicatement déposée sur chaque lame et l'ensemble est gardé à l'abri de la lumière et à 4 °C dans un milieu humide jusqu'à la lecture qui doit avoir lieu dans la semaine qui suit la préparation des lames.

Les comètes sont lues sous microscope à épifluorescence Zeiss Axioscope 20 (lampe à vapeur HBO JOW) à raison de 50 cellules par lame pour obtenir une moyenne par lame. Pour chaque essai, trois lames sont réalisées.

Le logiciel Comète [Komet 4.0 (Kinitic Imaging)] mesure l'intensité lumineuse des cellules choisies et détermine de manière semi-empirique la taille de la tête et celle de la comète. Ce logiciel utilise des paramètres qui peuvent être changés par l'utilisateur, selon ses besoins. L'intégration se fait grâce à une caméra digitale reliée au système informatique d'analyse Komet 4.0 (Kinitic Imaging). Les résultats sont exprimés en Tail DNA, qui représente le pourcentage de l'ADN dans la queue de la comète.



Activité Superoxyde Dismutase (Cu-Zn SOD) (Marklund et Marklund, 1974)

L'activité de la SOD est mesurée par une réaction colorimétrique. L'auto-oxydation du pyrogallol en présence d'EDTA est inhibée par la SOD. Le principe du dosage est basé sur la compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol (10 mM) par l' $O_2^{\bullet -}$ et la dismutation de l' $O_2^{\bullet -}$ par la SOD, quantifié par spectrophotométrie à 420 nm (Uvikon 860, Kontron instruments, France).

Préparer :

- Tampon tris 50 mM /DTPA 1mM, et ajuster le pH à $8,2 \pm 0.1$ avec de l'acide cacodylique 220 mg/ml,
- Pyrogallol 10 mM (Diluer 0.126g de pyrogallol qsp 100 ml d'HCl 0.01N).

Evaluation de l'autooxydation du pyrogallol : le mélange réactionnel est constitué de :

960 µl de tampon tris/DTPA,

40 µl de pyrogallol,

Après 45 secondes, la cinétique est lancée à 420nm pendant 1 min, la Δ DO/min doit être comprise entre 30 et 31. Sinon, faire varier le pH avec l'acide cacodylique. (Recherche du pH donnant une variation d'absorbance maximum correspondant à 0% d'inhibition de l'oxydation du pyrogallol).

chaque dosage est réalisé en double : pour chaque essai, on dépose 880µl de Tampon Tris/DTPA

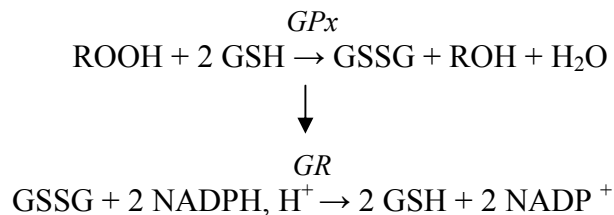
80µl d'échantillon

40µl de pyrogallol

Une unité d'activité enzymatique étant définie comme la quantité capable d'inhiber 50% de l'oxydation du pyrogallol.

Activité Glutathion peroxydase (GPx) : (Gunzler et al., 1974)

Le dosage de la GPx est effectué à partir de la réaction suivante :



Le principe du dosage de la GPx est basé sur une réaction couplée entre la GPx et la glutathion réductase (GR). La détermination de l'activité de la GPx repose ainsi sur la mesure de la disparition du NADPH, H⁺ suivie par spectrométrie à 340 nm, avec comme substance réactionnel le t-butyl hydroperoxyde.

Le mélange réactionnel comprend :

900 µl de tampon Tris /EDTA pH 7,6 (Trisma base 50 mM, EDTA Na₂ 1 mM, Azide 4 mM)

50 µl d'échantillons

20 µl de Glutathion (0,15 M)

20 µl de Glutathion réductase (208 U/ml)

20 µl de NADPH (8,4 mM)

Après une minute d'attente , 20 µl d'une solution de Ter butyl hydroperoxyde (30 mM), sont rajouter au mélange réactionnel, la décroissance de densité optique du NADPH₂ à et suivie 340 nm sur spectrophotomètre thermostaté à 25 °C

Signalisation de l'insuline et expression des gènes :

Les analyses ont été réalisées au laboratoire Nutrient Requirements and Functions Laboratory (Dr Anderson), Beltsville Human Nutrition Research Center par le Dr Cao Heping que nous remercions.

La signalisation hépatique et musculaire de l'insuline (Cao *et al.*, 2006 ; Cao *et al.*, 2007) ainsi que, dans ces tissus, l'expression des gènes impliqués dans les voies de cette signalisation, ont été mesurées après extraction des ARN messagers. L'extraction des ARN, la synthèse des ADNC, la PCR quantitative en temps réel sont décrits dans la publication B (*Green tea polyphenol extract regulates the expression of genes involved in glucose uptake and insulin signaling in rats fed a high fructose diet*).

VIII-3 - Etude sur culture cellulaire

VIII-3-1 - Modèle cellulaire :

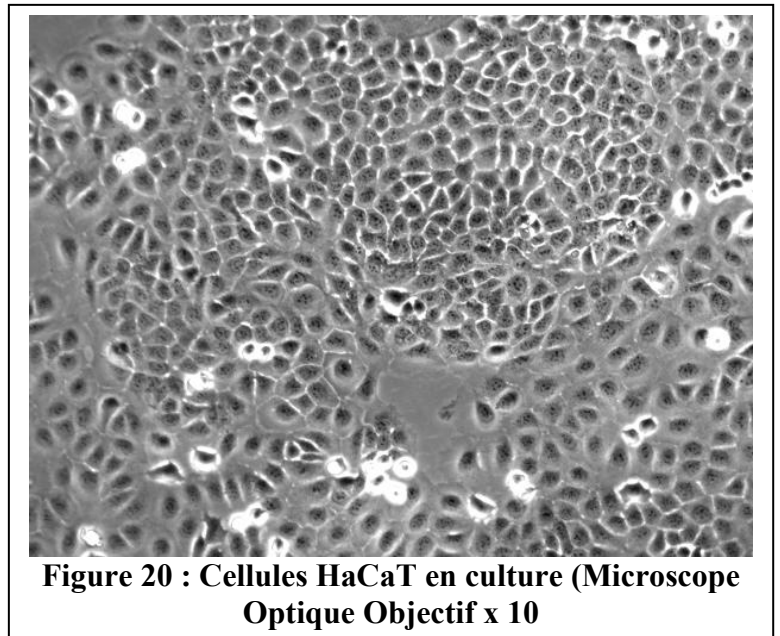
Le modèle cellulaire utilisé dans ce travail est une lignée de kératinocytes humain issue d'un explant cutané, spontanément immortalisée *in vitro* (HaCaT), cultivée en monocouche (Boukamp *et al.*, 1988) (Figure 20).

Le comportement de ces cellules est identique aux kératinocytes humains normaux (Schurer *et al.*, 1993).

Les cellules sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 tamponné avec du bicarbonate de sodium, supplémenté en glutamine 2 mM et en sérum de veau fœtal (SVF 10 %).

Afin de limiter les contaminations par des micro-organismes, un mélange d'antibiotiques et d'antifongique (antifongique 2,5 mg/ml ; pénicillines 1,25 U/ml et streptomycine 0,00125 U/ml) est ajouté au milieu.

Les cellules sont mises en cultures dans des flacons de culture de 75 cm² contenant 15 ml du milieu de culture avec antibiotiques. Les flacons contenant la suspension cellulaire sont en-



suite placés dans un incubateur (température 37°C) sous une atmosphère enrichie en CO₂ (5 %). Le milieu est renouvelé une fois par semaine. A confluence, les cellules sont repiquées selon la méthode suivante.

Le milieu est éliminé par aspiration, et le tapis cellulaire est rincé deux fois avec 7 ml de tampon phosphate stérile (PBS sans Ca⁺² ni Mg⁺²), puis 3 ml de trypsine (2,5 %) sans EDTA sont ajoutés au flacon. Les cellules sont incubées pendant 5 minutes à 37 °C. Une fois qu'elles sont dissociées, l'action de l'enzyme est arrêtée par l'ajout de 7 ml du milieu RPMI. (Pour une amplification cellulaire : 1ml de cette suspension cellulaire est remis en culture dans 15 ml du milieu de culture avec antibiotiques comme dans l'étape précédente).

Le comptage des cellules est réalisé sur une cellule de Neubauer, en utilisant le bleu de trypan, un colorant qui reflète la modification de la perméabilité membranaire. Le comptage est ensuite effectué sous microscope optique (objectif x10). Selon les besoins des expériences, le volume de la suspension cellulaire est ajusté par une quantité de milieu nécessaire pour obtenir la concentration en cellules désirée.

-Pour le dosage des TBARS et groupement SH cellulaires

Les cellules (20 millions) sont récoltées et lavées par un tampon isotonique, le culot cellulaire est repris dans un tampon de lyse hypotonique (Tampon tris-HCL à 20 mM, PH 7,30). Elles sont lysées par 5 cycles de congélation/décongélation. Les fractions de lysat sont recueillies afin de réaliser les différents dosages (Protéines, TBARS, groupements thiols).

-Pour le dosage des dommages à l'ADN par la technique Comete

20000 cellules sont nécessaires, elles seront remises en suspension dans un milieu d'agarose.

Evaluation de la poussée cellulaire : Test au bleu de trypan

Le bleu de trypan est un colorant qui a la propriété de colorer spécifiquement le noyau des cellules mortes. Comme celui-ci ne peut pas ordinairement pénétrer à l'intérieur de la membrane cytoplasmique, il laisse incolores les cellules vivantes. A confluence, les cellules sont trypsinées puis remises en suspension dans 6 ml de milieu.

Après homogénéisation, 100 µL de la suspension sont mélangés avec 100 µl d'une solution bleu trypan à 0,4 %. Une goutte du mélange est ensuite déposée sur une cellule de comptage (cellule de Neubauer), puis les cellules vivantes et mortes sont dénombrées sous un microscope optique.

VIII-3-2 - Test de cytotoxicité : Test au MTT

Principe

Cette technique colorimétrique (Hansen *et al.*, 1989) permet de mesurer la viabilité cellulaire. Dans ce test, la viabilité cellulaire est appréciée par la mesure de l'activité de l'enzyme (succinate déshydrogénase : SD) mitochondriale des cellules vivantes. Rappelons que, dans le cycle de Krebs, cette enzyme catalyse la déshydrogénation de l'acide succinique pour former de l'acide fumarique. Cette méthode est basée sur la capacité des cellules vivantes à réduire, par l'intermédiaire de la SD, un sel de tétrazolium de couleur jaune, le MTT, en un sel de formazan de couleur bleue, ce qui a pour effet de permettre l'évaluation par colorimétrie de la respiration cellulaire.

Cette technique permet d'évaluer l'effet d'une molécule, en fonction de sa concentration ou du temps d'incubation, sur la survie cellulaire en culture. Le test est réalisé dans des microplaques stériles de 96 puits. 20000 cellules sont incubées dans un volume de 100 µl de milieu de culture. Le témoin est constitué d'une colonne de puits contenant 100 µl de milieu seul, et d'une colonne de cellules, maintenues dans du milieu de culture. Ces cellules ne subissent pas de traitement. Les puits des autres colonnes contiennent 100 µl de la suspension cellulaire.

Dans notre travail, après 24 heures de croissance, les cellules ont été mises en présence de la molécule à tester à différentes concentrations, et pendant différentes durées, afin de mesurer leur effet sur la viabilité cellulaire et d'en déduire la dose létale DL25 et DL50. Après traitement, 10 µl de MTT (5 mg/ml dans du PBS) par puits sont additionnés, et les cellules sont incubées à l'étuve pendant deux heures.

Après élimination du milieu, le précipité de formazan de couleur bleue ainsi formé est dissous dans 100 µl de DMSO. Les plaques sont ensuite agitées jusqu'à homogénéisation de la coloration (5 min). Les densités optiques (DO) sont mesurées à 570 nm avec un spectrophotomètre lecteur de micro plaques (Multiskan, Labsystem, France). La densité optique mesurée est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie par rapport aux cellules non traitées (cellules témoins) selon la formule suivante :

$$\% \text{ de viabilité} = [(A-B)/(C-B)] \times 100$$

Où : A est la DO₅₇₀ de l'échantillon.

B est la DO₅₇₀ du milieu de culture.

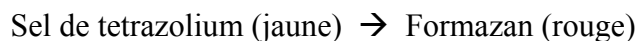
C est la DO₅₇₀ du contrôle négatif (cellules traitées par le milieu) correspondant à 100% de viabilité.

VIII-3-3 - Test de cytotoxicité à la LDH (lactate déshydrogénase)

Principe

La lactate déshydrogénase est une enzyme exclusivement cytoplasmique, présente dans tous les types cellulaires et relativement stable. L'augmentation de l'activité de cette enzyme mesurée dans le milieu de culture des cellules en croissance permet de détecter une altération de la perméabilité membranaire, et donc d'estimer la mort cellulaire. Une augmentation de la mort cellulaire ou du dommage de la membrane plasmique entraîne une augmentation de l'activité de l'enzyme LDH.

Le dosage repose sur la réaction suivante :



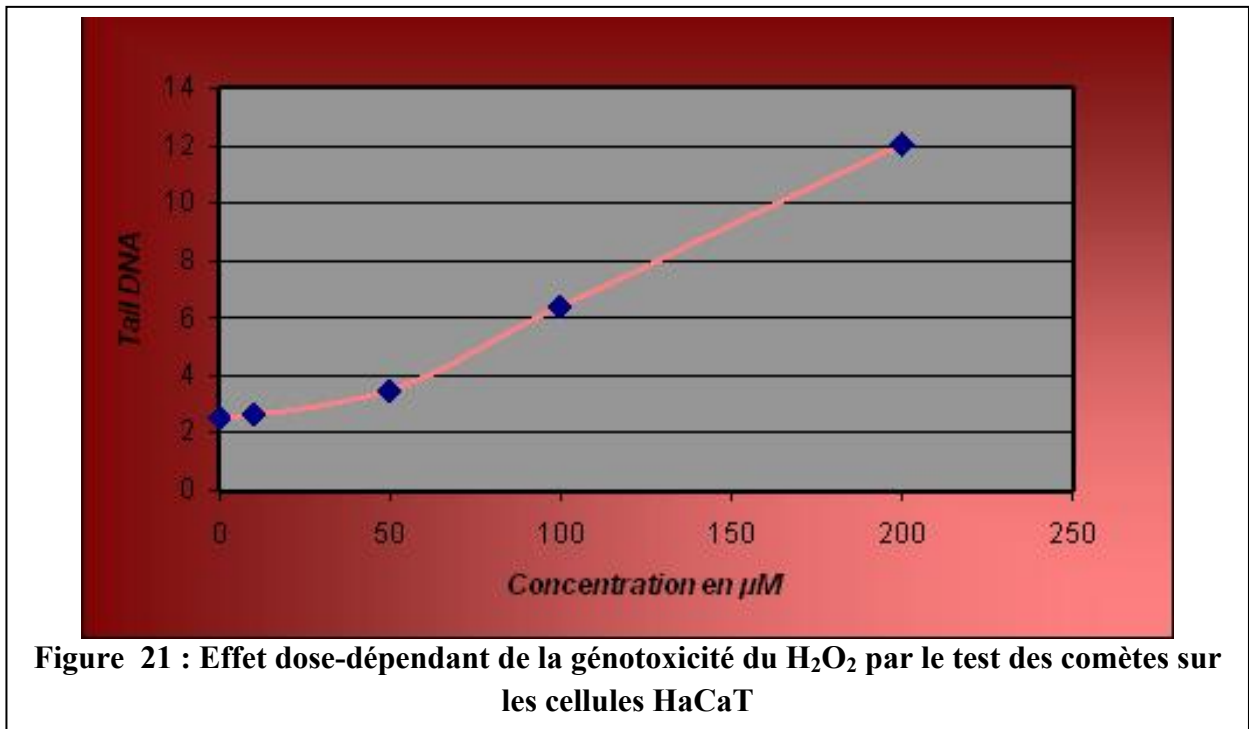
C'est un test colorimétrique. Le Formazan est soluble dans l'eau et absorbe avec un maximum vers 500 nm.

Ce dosage a été réalisé à l'aide d'un kit Cytoxicity Détection® : brièvement, 20000 cellules dans 100 µl de milieu de culture sont déposées dans les puits d'une microplaque et sont laissées une nuit. Les densités optiques (DO) sont mesurées à 500 nm avec un spectrophotomètre lecteur de micro plaques (Multiskan, Labsystem, France). La densité optique mesurée est directement proportionnelle au nombre de cellules mortes.

VIII-3-4 - Stress oxydant induit par H₂O₂

Les cellules sont soumises à un stress induit par 50 µM H₂O₂, préparée extemporanément dans du PBS et incubées pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. La concentration de 50 µM a été déterminée après plusieurs gammes de concentration. Elle est celle qui induit un doublement des dommages à l'ADN.

Dans l'étude utilisant la biopuce (publication F), les mesures s'effectuent après 30 min (temps zero) ou 6 heures après l'exposition à H₂O₂ (temps 6).



VIII-3-5 - Dosage des bases oxydées (8-OH-dG) de l'ADN extrait des cellules HaCaT

Extraction de l'ADN cellulaire

La technique d'extraction de l'ADN cellulaire consiste à isoler ce polymère biologique de tous les autres constituants cellulaires. Pour cela, l'extraction s'effectue en plusieurs étapes et commence, quel que soit le protocole, par une lyse des membranes plasmiques nucléaires. Les cellules sont centrifugées à 20°C et 1400 tours/min pendant 3 min. Le culot cellulaire (10-12 10⁶ cellules/échantillon) est repris deux fois dans 2 ml de tampon de lyse A (MgCl₂ 5 mM Tris/ HCL 10 mM, deferoxamine 0,1mM, 320 mM sucrose, 1% TritonX-100) et centrifugé à 3500 tours/min à 4°C pendant 10 min. Puis ce culot est repris dans 0,6 ml de tampon de lyse B (5 mM Na₂ EDTA, 10 mM tris/HCL, 0,15 mM deferoxamine). Du SDS (35 µl, 10 %) est ajouté, et le mélange est agité vigoureusement avant l'addition de 30 µl de ribonucléase A (1 mg/ml) et de 8 µl de ribonucléase T1. Les échantillons sont incubés à 50°C pendant 15 min. Ensuite, 30 µl de la protéase Qiagen (20 mg/ml) sont ajoutés, et les échantillons sont incubés pendant 1 heure à 37°C. L'ADN est précipité par l'ajout de 1,2 ml de solution NaI (20 mM Na₂EDTA, 7,6 M NaI, 40 mM Tris/HCL, 0,3 mM deferoxamine) et 2 ml d'isopropanol à 100 %. L'ADN obtenu est centrifugé à 1000 g à 4°C pendant 12 min et rincé successivement avec 1 ml d'isopropanol à 40 %. Le culot est ensuite dissous dans 175 µl d'une solution de déféroxamine à 0,1 mM.

Hydrolyse enzymatique de l'ADN sous forme de nucléosides

L'hydrolyse de l'ADN sous forme de nucléosides par le couple d'enzymes nucléase P1 phosphatase / phosphatase alcaline permet la mesure de la 8-oxo-dG par CLHP (Chromatographie Liquide à Haute Performance). L'ADN extrait est incubé à 37°C pendant 1 heure en présence de 10 µl de tampon 10X de la nucléase P1 (300 mM acétate de sodium, 1 mM Zn SO₄, 2,5 mM deferoxamine pH 5,3), de 10 µl de P1 et de 15 µl de la phosphatase alcaline. Les échantillons sont ultrafiltrés à l'aide d'un kit d'ultrafiltration par centrifugation 15 min à 2500 tours/min.

Mesure de la 8-oxo-dG

Après ultrafiltration, les échantillons sont analysés par CLHP. Le mélange de nucléosides est injecté sur la colonne de chromatographie. En sortie de colonne, un détecteur UV recueille le signal des nucléosides normaux et un détecteur électrochimique celui de la 8-oxo-dG selon Gedik *et* Collins (2005).

Deux gammes étalons sont préparées : l'une de déoxyguanosine [332 à 66,4 μM] est obtenue à partir d'une solution mère à 600 μM ; l'autre est une gamme de 8OXODG (4,83 à 0,302 nm) préparée à partir d'une solution mère de 4,83nM. Un volume de 50 μl d'échantillons de gamme et d'ADN cellulaire sont analysés par chromatographie liquide haute pression (HPLC detector 430 ; biotek-kontron, Montigny le Bretonneau, France) couplée à une détection électro-chimique (ESA coulochem, Bedford, MA, USA), équipé d'un détecteur Jasco UV1565 (Jasco, Nantes, France). La coulométrique se fait avec un potentiel de 190 mv sur la première électrode et de 320 mv sur la deuxième électrode. La phase mobile est un tampon phosphate 50 mM, PH 5,5, qui contient 12% de méthanol. La séparation par HPLC se fait à 26°C. Dans ces conditions le temps d'élution de la 8 oxo dGua est de 12 minutes (Mousseau *et al.*, 2005).

VIII-3-6 - Différentes formes de chrome étudiées

Les différentes formes de chrome ont été fournies par le Dr Anderson (USDA, BHNRC, MD, USA) que nous remercions.

- Chrome VI :

Chromate de sodium (CrO_4Na_2 , 32% de Cr), poids moléculaire : 162 g

- Chrome III :

Chrome histidine [$(\text{His})_3\text{Cr}$, 5,5% de Cr] poids moléculaire : 945 g

Chlorure de chrome $6\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Cl}_3\text{Cr } 6\text{H}_2\text{O}$, 19,6% de Cr), poids moléculaire : 266,48 g

Picolinate de chrome ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{CrN}_3\text{O}_6$, 12,4% de Cr), poids moléculaire : 418,3 g

Les solutions mères des différentes formes de chrome ont été préparées par dissolution dans de l'eau distillée, puis stérilisées par filtration (0,22 μm). Les gammes de concentration ont été ensuite préparées extemporanément à partir de ces solutions mères par dilution dans du RPMI.

VIII-4 - Etude de l'expression des gènes antioxydants et de réparation de l'ADN des cellules (Biopuce)

Le concept de biopuce naît dans les années 90. Il repose sur une technologie pluridisciplinaire incluant la microélectronique, la chimie des acides nucléiques, l'analyse d'image et la bioinformatique. La biopuce a rendu possible l'étude du transcriptome, qui est l'étude simultanée de l'expression d'un grand nombre de gènes dans un contexte cellulaire donné.

Le principe de la puce repose sur le phénomène d'hybridation entre deux séquences de nucléotides. Cette hybridation est rendue possible grâce à la complémentarité des bases, formant un complexe double brin entre :

- le brin (intégral ou partiel) dont la séquence connue est déposée sur le support (membrane de nylon),
- le brin à caractériser qui est l'ADNc marqué provenant d'une transcription inverse de l'ARNm extrait du tissu à étudier.

Les ARNm sont marqués. Le marquage utilisé est un marquage radioactif : les ARNm sont marqués au $\alpha^{33}\text{P}$ dCTP lors de la transcription inverse et au terme de la réaction, c'est un ADNc radioactif simple brin qui est obtenu et qui peut-être hybridé avec le produit PCR déposé sur la membrane. Le niveau d'intensité détecté est relatif à l'expression du transcript.

La liste des gènes d'intérêts de la biopuce que nous avons utilisé appartenait aux familles:

- des gènes de la réparation de l'ADN (BER, REN, GGR),
- des gènes des enzymes antioxydantes,
- des gènes de régulation de la matrice extracellulaires,
- des gènes régulant l'apoptose (pro et anti-apoptotique),
- des gènes relatifs au vieillissement cellulaire,
- des gènes de l'inflammation cellulaire,
- des gènes ménagers.

Au total, 82 ESTs (*Expressed sequence tags*), qui sont des portions d'ADNc du gène d'intérêt, étaient présents.

Les choix des gènes, l'amplification des EST, l'hybridation du vecteur, la procédure de la préparation de la membrane de nylon ont été décrits par Hazane *et al*, (2005).

VIII-4-1 - Extraction des ARNs totaux

Les ARNs totaux sont extraits par le RNeasy® mini Kit (50) commercialisé par Qiagen, à partir de culot cellulaire congelé à -80 °C et contenant $6 \cdot 10^6$ cellules. Brièvement, les cellules subissent une étape de lyse (Tampon RLT® enrichi de β mercaptoéthanol 10 %). Le lysat est alors déposé sur une colonne à base de silica gel qui a des affinités de liaison sélectives pour les ARNs. Après trois lavages qui permettent l'élimination des contaminants, l'ARN total est élué dans 50 μl d'eau sans RNase.

VIII-4-2 - Dosage et contrôle qualité des extractions des ARNs totaux

La quantité d'ARN totaux extraits a été estimée par spectrophotométrie après une dilution au 100^{ième} dans de l'eau stérile. Les lectures sont effectuées à 260 nm (dosage des acides nucléiques), 280 nm (contamination par les protéines), 220 et 230 nm (contamination par le phénol et l'urée) et 310 nm (contaminations dues à la cuve de quartz). Le calcul du rapport 260/280 doit être compris entre 1,8 et 2, et la concentration de l'ARNt est exprimée en µg/µl. Les extraits d'ARN ont ensuite été dilués dans du tampon Tris-HCl 0,1 M, de façon à obtenir une concentration comprise entre 25 et 500 ng/µl afin d'être analysée qualitativement et quantitativement avec précision par le bio analyseur Agilent 2100 (RNA 6000 Nano). Les échantillons sont déposés sur des puits constituant des micro-réseaux dans lesquels est également déposé un gel pour l'analyse qualitative. La durée de migration est de 30 minutes à 100 volts. Pour chaque échantillon déposé, l'analyse quantitative est déterminée par fluorescence en fonction du temps de rétention des sous-unités (su) 18 S et 28S au sein du micro-réseau. Le temps de rétention (données qualitatives) et l'intensité de la fluorescence (données quantitatives) sont validés par rapport au marqueur de poids moléculaire. Les résultats quantitatifs sont exprimés en ng/µl d'ARN. L'analyse qualitative est déterminée par l'aspect des bandes de la sous-unité 28S et de celle de la sous-unité 18S, la bande 28S devant être deux fois plus intense que la 18S.

VIII-4-3 - Synthèse et hybridation de l'ADNc radioactif

A) Synthèse de l'ADNc radiomarqué

5 µg d'ARNt sont soumis à une digestion avec la DNase (1 X de tampon de l'enzyme, 10 U Dnase dans de l'eau DEPC) pour éliminer l'ADN contaminant. La réaction se déroule pendant 15 min à température ambiante, puis 1 µl d'EDTA (25 mM) est rajouté dans le tube réactionnel. Ce dernier est placé à 65 °C pendant 10 minutes, afin d'arrêter la réaction enzymatique. Afin que l'ARNm perde sa conformation secondaire et que l'amorce poly-T puisse s'hybrider avec la partie 3' de l'ARNm, ce dernier est mis pendant 5 minutes à 70 °C, avec 8 µg dT 25 et avec 0,25 ng d'ARNm CGO3 d'*Arabidopsis thaliana* (0.25 ng/µl) qui lui aussi doit être soumis à une transcription reverse. C'est un contrôle supplémentaire de la réaction dans son ensemble (transcription inverse, hybridation, ...). Puis, le tube réactionnel est placé 15 min à température ambiante. Les sondes radiomarquées sont préparées dans un mélange réactionnel qui contient 40 U RNAsine, 30 µCi [α^{33} P]dCTP, 1 mM de déoxynucléotides non marqués dATP, dTTP et dGTP (20 mM) et 2,4 µM dCTP 0,1 M DDT, 1,6 X tampon pour la transcription inverse. La transcription inverse est réalisée par 200 U d'enzyme SuperScript™

II RNase H pendant deux heures à 42°C. Puis la sonde radiomarquée est purifiée dans une colonne en silice Amicon YM-50 (Millipore) : elle est déposée sur la colonne, puis 300 µl d'eau stérile sont ajoutés sur la colonne, puis elle est centrifugée pendant 10 minutes à 9000 g à température ambiante. L'opération est répétée deux fois avec 500 µl d'eau stérile. Afin de récupérer la sonde radiomarquée, la colonne est retournée, puis 100 µl d'eau stérile y sont déposés, suivi d'une légère agitation pour favoriser le décrochage du matériel génomique. La colonne est centrifugée pendant 5 minutes à 6000 g et à température ambiante. L'efficacité de l'incorporation radioactive est contrôlée par comptage radioactif, par un dépôt de 1 µl de la sonde purifiée sur le Ready CapTM puis une lecture est effectuée sur spectrophotomètre SL 30 (Intertechnique). A ce niveau, les ADNc forment des hétéroduplexes avec l'ARN messager matrice. L'ARNm matrice de l'hétéroduplex est dégradé par 10 % SDS, 0,5 M EDTA, 3 M NaOH dans l'eau stérile, pendant 30 minutes à 68 °C. Puis, le tube réactionnel est placé à température ambiante pendant 15 minutes. La réaction est neutralisée par l'ajout de 1 M Tris pH 7,2 et 2N HCl.

Enfin, la sonde est dénaturée pendant 5 minutes à 100°C, puis le tube est déposé rapidement dans de la glace, afin de figer l'état conformationnel de l'ADNc (ou sonde complexe). Ainsi dans la bonne conformation, l'ADNc radio-marqué peut être hybridé.

B) La préhybridation et l'hybridation

La préhybridation doit avoir lieu avant la synthèse d'ADNc, afin que, dès que ce dernier a été synthétisé, il soit mis au contact de la membrane pour l'étape d'hybridation.

a) la préhybridation

Les membranes préalablement préparés et contenant les gènes cibles sont déposées dans des tubes en verre de 4 ml. 3 ml de tampon de préhybridation (5X SSC, 5X Denhardt's, 0,5 % SDS, 10 % Dextran, 100 µg/ml de sperme de saumon préalablement dénaturé, dT80 (1 µg/µl) dans de l'eau stérile) sont rajoutés dans chaque tube. La préhybridation se déroule pendant 4 heures à 60 °C dans un four à hybridation.

b) L'hybridation

Lorsque la cible complexe est synthétisée, 2,5 ml de tampon de préhybridation sont retirés du tube, et la totalité de l'ADNc est déposée directement dans les 500 µl restant dans le tube et homogénéisé par une légère agitation. Le volume final est donc inférieur à 700 µl. Le tube est ensuite replacé soigneusement dans un grand tube Apligene pour hybridation en verre résistant à haute température pendant une nuit.

c) Lavage des membranes après hybridation avec la sonde complexe

Les membranes sont lavées à 60°C directement dans le tube, dans des tampons de lavage différents. Le premier contient un tampon 2X de Saline sodium citrate (SSC), 1 % SDS dans de l'eau stérile, pour un volume final de 2 ml. La durée de ce lavage est de 15 minutes et il est répété deux fois.

Le deuxième lavage est réalisé avec un tampon constitué de 0,1 X Saline sodium citrate 0,5 % SDS, dans de l'eau stérile, pour un volume final de 2 ml. Comme précédemment, la durée de lavage est de 15 minutes et cette étape est répétée deux fois.

Les membranes sont ensuite mises à sécher à l'air libre, puis placées dans une cassette BAS Fujifilm 2025 pendant 48 heures pour impression de l'écran phosphore.

d) Lecture, quantification et analyse

Après ce temps d'exposition, les écrans sont révélés par une lecture laser au Phosphoimager haute résolution BAS 5000 de Fujifilm distribué par Raytest. La lecture est pilotée par le logiciel Image Reader BAS 5000 version 1.12 (Raystest) et se fait à une résolution de 25 μm . L'image est codée en huit niveaux de gris qui révèlent l'intensité de la radioactivité, puisque celle-ci est proportionnelle à la quantité de cible qui s'est hybridée avec la sonde et correspond donc aux taux bruts d'expression de transcripts.

Les images obtenues ont été traitées par un logiciel de quantification (Fujifilm Array GaugeTM micro/macroarray software). Chaque dépôt est délimité sur l'écran en dessinant un anneau autour du spot. Il permet d'attribuer à chaque signal radioactif une valeur brute en pixel en fonction de la surface quantifiée. La valeur brute correspond donc à une valeur en pixel/mm^2 . Le logiciel génère un fichier texte qui est ensuite exporté vers une macro Excel permettant la transformation des données brutes en données utilisables pour les traitements suivants.

e) Corrections des données

Il s'agit de soustraire le bruit de fond en fonction de la localisation du dépôt, de faire une vérification visuelle des dépôts et une normalisation médiane afin que toutes les expériences soient comparables entre elles. La vérification visuelle est particulièrement importante, car elle permet d'éliminer les artéfacts. Enfin le traitement statistique est appliqué afin d'analyser les résultats obtenus.

Si le bruit de fond (BF) sur la membrane est homogène, alors une seule mesure de moyenne suffit par bloc. Par contre, si plusieurs zones de BF apparaissent, il est indispensable de faire

autant de moyenne de BF que de zones différentes et de soustraire la valeur du signal radioactif à la moyenne BF en fonction de sa localisation. Dans notre cas, nous avons soustrait une valeur de BF aux données brutes de quantification. Ce travail de validation visuelle permet aussi d'identifier des dépôts présentant un signal radioactif trop important et qui de ce fait peu contaminer la valeur brute du point voisin. Dans ce cas, il n'y a pas d'autre solution que de refaire une quantification en diminuant la surface prise en compte, pour chacun des dépôts, ou de remettre les membranes en exposition sur une durée plus courte.

f) Normalisation médiane

Plusieurs méthodes de normalisations sont décrites (par les gènes ménagers, par l'activité de la radioactivité en cpm/ μ l). Nous avons choisi d'appliquer une normalisation par la valeur de la médiane des signaux, qui permet de corriger l'intensité du signal de chaque valeur radioactive, en ne considérant que les valeurs radioactives corrigés du bruit de fond.

g) Statistiques

Nous avons appliqué un traitement statistique aux valeurs ainsi corrigées par le BF et par la médiane, en utilisant le logiciel StatView, par un test ANOVA. Les valeurs significatives étaient celles obtenues avec un $p < 0,05$.

IX - Résultats

En raison de l'implication du stress oxydant et de la baisse de la sensibilité à l'insuline dans le syndrome métabolique et le diabète de type II, nous avons voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle l'apport de nutriments à la fois antioxydants et insulino-potentialisateurs pourrait être efficace dans une prévention nutritionnelle de ces deux facteurs.

Parmi les nutriments potentiellement insulino-potentialisateurs et antioxydants, nous présentons successivement les résultats portant sur :

- le thé, antioxydant reconnu mais, paradoxalement, peu étudié quant à son effet sur la fonction insulinique .
- la cannelle, décrit comme insulino-potentialisateur mais non encore étudiée comme antioxydant.
- le chrome III, oligoélément essentiel, que plusieurs travaux ont décrit comme insulino-potentialisateur et antioxydant, mais dont la génotoxicité fait l'objet d'une controverse.

IX-1 – Polyphénols du thé vert

Les polyphénols du thé vert semblent présenter un intérêt par leurs propriétés potentialisatrices de l'insuline, par leurs effets antioxydants, et leur intérêt dans la prévention du syndrome métabolique.

Le but de notre travail a été de montrer, sur un modèle expérimental de syndrome métabolique chez le rat, non seulement les effets antioxydants d'extraits de thé vert, mais également les effets potentialisateurs de l'insuline (publication A), et de relier ces résultats à l'expression des gènes impliqués et à l'activation des voies de signalisation de l'insuline (publication B).

IX-1-1 - Contexte de la recherche

Le syndrome métabolique est étroitement associé à des désordres métaboliques, avec pour caractéristique essentielle une insulino-résistance (Reaven, 2003; Avogaro, 2006). La prévalence croissante de ce désordre nutritionnel est préoccupante, car il est l'une des causes majeures de diabète et de maladies cardiovasculaires. Alors que la présence d'un stress oxydant dans le diabète de type 2 et dans les maladies cardiovasculaires est largement documentée (Stump *et al.* 2005), il a été récemment démontré que l'association entre stress oxydant et désordre métabolique pouvait également être présente dans le syndrome métabolique (Evans *et al.*, 2005), suggérant ainsi la précocité du stress oxydant dans l'obésité et le diabète de type 2. Le stress oxydant, dans le syndrome métabolique, est en partie expliqué par l'hyperglycémie, source de production d'ERO, l'hyperinsulinisme et la diminution des défenses antioxydantes présentées par les patients. L'altération de la sensibilité à l'insuline conduit à l'installation d'une insulino-résistance qui participe à une élévation chronique de la glycémie, donc un taux d'oxydation du glucose plus élevé et une augmentation de la production de OH[°] (Vincent *et al.*, 2006).

De ce fait, considérant que l'association entre insulino-résistance et stress oxydant est impliquée dans la sévérité du syndrome métabolique, augmenter les apports nutritionnels antioxydants pourrait être un des moyens de prévention nutritionnelle pour les patients présentant ces altérations métaboliques. Parmi les antioxydants nutritionnels, les polyphénols semblent particulièrement intéressants, en raison de leur fort pouvoir antioxydant (Leighton *et al.* 1999), largement décrit pour participer aux bénéfices santé des polyphénols (Scalbert *et al.* , 2005 ; McKay *et* Blumberg, 2003), mais aussi, comme plus récemment suggéré, pour leur effet sur le métabolisme de l'insuline.

Les polyphénols du thé vert, et plus particulièrement, au sein de la famille des catéchines, l'épigallocatechine gallate (EGCG), ont la propriété d'augmenter l'activité de l'insuline, mesurée sur des adipocytes en culture en présence ou non d'insuline (Anderson *et* Polansky, 2002).

Le but de cette étude a été de mettre en évidence les effets d'un régime riche en extraits de thé vert dans un modèle expérimental de syndrome métabolique sur les marqueurs de stress oxydant et d'établir l'éventuelle corrélation de ces effets avec un effet insulino-sensibilisateur.

IX-1-2 - Présentation de la publication A :

Green tea extract decreases oxidative stress and improves insulin sensitivity in an animal model of the metabolic syndrome, the fructose-fed rat.

Isabelle Hininger-Favier, Rachida Benaraba, Sara Coves, Diane Agay, Richard A Anderson and Anne-Marie Roussel

Soumis à Am J Clin Nutr., 2007, Tracking number MS3032

Nous avons soumis des rats Wistar mâles (10 par groupe) à un régime riche en fructose (65 %) induisant les signes biologiques du syndrome métabolique ou au même régime enrichi en extraits de thé vert à 1 g ou à 2 g d'extrait de thé par kilogramme de régime.

La teneur des extraits de thé vert en polyphénols totaux était de 373 mg/g, dont 127,5 mg d'EGCG. Extrapolés à la consommation de l'homme, les régimes riches en extraits de thé vert correspondent à une consommation de 3 à 6 tasses de thé. Ce niveau de consommation a souvent été associé à un effet bénéfique dans la prévention des maladies cardiovasculaires dans de nombreuses études épidémiologiques (Rietveld *et* Wisseman, 2003).

L'alimentation riche en fructose induit une hypertriglycéridémie, conséquence d'une activation de la lipogénèse, d'une surproduction de VLDL, et de la diminution de la clearance des TG (Mayes, 1993). Nous avons vérifié que, conformément à la littérature (Busserolles *et al.* 2003 a) (Thresher *et al.*, 2000), le régime riche en fructose induisait un syndrome métabolique chez nos animaux, évalué par une augmentation du taux des triglycérides, de la glycémie et de l'insuline à jeun. Les régimes riches en extraits de thé vert ont significativement modifié ces paramètres. Après 6 semaines de régime enrichi en extrait de thé, nous observons une diminution significative des taux plasmatiques de glucose, de triglycérides, et d'insuline chez les animaux (Tableau V). L'amélioration de la sensibilité à l'insuline est particulièrement significative (baisse de l'insulinémie de plus de 50 % et retour à des valeurs physiologiques comparables à celle des animaux témoins) et confirme *in vivo*, dans un modèle animal de syndrome

métabolique, une augmentation de l'efficacité de l'insuline déjà rapportée dans les études *in vitro* (Broadhurst *et al.* 2000) (Anderson *et Polansky*,2002).

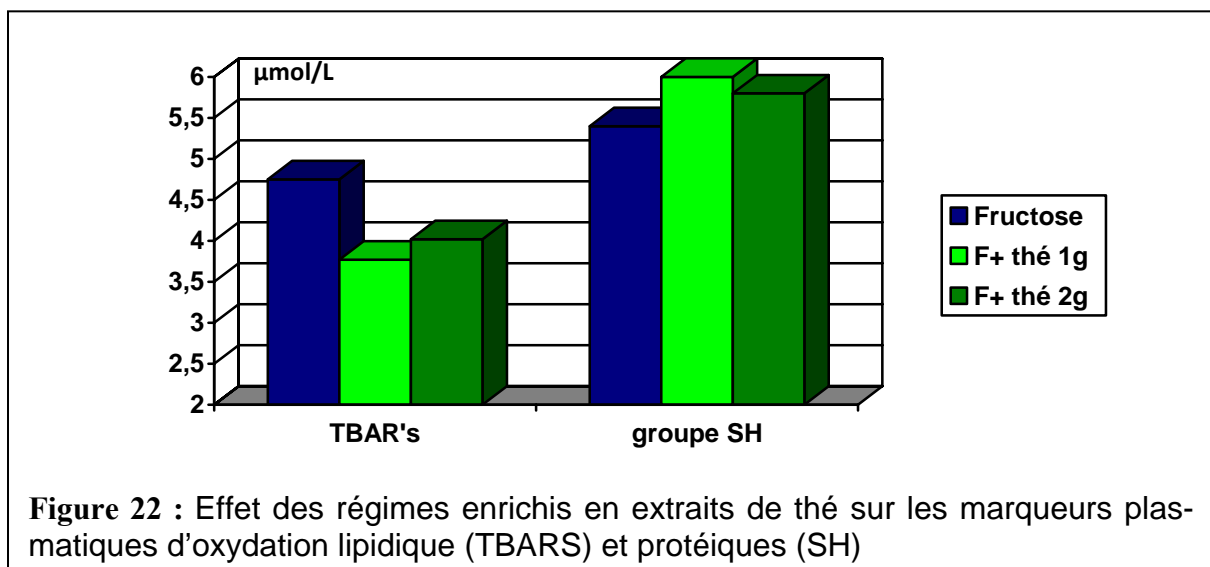
En termes de prévention nutritionnelle, ces résultats permettent d'envisager un rôle bénéfique des extraits de thé vert dans la prévention des dyslipidémies et de l'insulinorésistance associées au syndrome métabolique. Cependant, nous n'observons pas d'effet dose-dépendant de la teneur en polyphénols du régime sur ces métabolismes. Au contraire, il semble que le régime à 1g d'extrait de thé/kg ait un effet plus marqué que le régime à 2 g/kg de régime.

Tableau V : Impact du régime sur la glycémie et les taux de triglycérides plasmatiques

	<u>Contrôle</u>	Régime fructose (FD)	<u>FD+1g</u> extrait thé/ <u>kg</u> régime	<u>FD+2g</u> extrait thé/ <u>kg</u> régime
Prise de nourriture <u>g/j</u>	<u>21.5±0.6^a</u>	<u>20.7±0.8^a</u>	<u>20.5±0.9^a</u>	<u>20.3±1.5^a</u>
Poids des rats <u>g</u>	<u>339±6^a</u>	<u>360±7^a</u>	<u>350±5^a</u>	<u>353±7^a</u>
<u>Glycémie mmol/L</u>	<u>7.6±0.4^b</u>	<u>10.7±0.4^a</u>	<u>7.9±0.5^b</u>	<u>8.4±0.32^b</u>
<u>Triglycéridémie g/L</u>	<u>0.48±0.06^b</u>	<u>1.27±0.33^a</u>	<u>0.58±0.05^b</u>	<u>0.65±0.06^b</u>
<u>Insulinémie pmol/L</u>	<u>107.2±34.5^b</u>	<u>411.7±99.9^a</u>	<u>113.2±28.1^b</u>	<u>197.2±42.9^b</u>

Les valeurs ne partageant pas la même lettre sont significativement différentes $p < 0.05$

Parallèlement aux effets de grande amplitude des extraits de thé vert sur les taux plasmatiques de triglycérides, d'insuline et de glucose, nous avons également observé un effet antioxydant (figure 22).



Cet effet protecteur du thé vert dans un régime induisant un syndrome métabolique est illustré par une diminution significative de la peroxydation lipidique ($p < 0.05$) et une augmentation des groupements réduits protéiques (SH). Ces effets pourraient avoir des répercussions cliniques importantes si l'on considère que la lipoperoxydation est un facteur de risque de maladies cardiovasculaires, et que l'oxydation des protéines est un facteur de risque de néphropathie et de glomérulopathie en cas de diabète (Giugliano *et al.*, 1996). De plus, une diminution significative des dommages à l'ADN est mesurée lorsque le régime est enrichi en extraits de thé (Tableau VI). Ce résultat est en accord avec des travaux expérimentaux montrant que les catéchines du thé vert protègent l'ADN (Anderson *et al.*, 2001 b) et avec des études cliniques montrant le bénéfice d'une consommation de thé dans la prévention des dommages à l'ADN (Hakim *et al.*, 2004).

Tableau VI: Effets d'un régime enrichi en thé sur les dommages à l'ADN induit par un régime fructose.

	Groupe I Fructose (F)	Groupe II : F + 1g extrait de thé /kg	Group II : F + 2g extrait de thé /kg
Dommages à l'ADN % tail ¹	12.8 ± 0.75 ^a	8.1 ± 0.61 ^c	10.8 ± 0.58 ^b

Les valeurs ne partageant pas la même lettre sont significativement différentes $p < 0.05$.

¹ *unité arbitraire*

L'effet bénéfique du régime à 1 g d'extrait de thé/kg *versus* le régime à 2 g d'extrait de thé/kg à la fois sur la sensibilité à l'insuline et sur les marqueurs de stress oxydant se confirme par un résultat plus protecteur du régime à 1 g d'extrait de thé/kg sur les dommages à l'ADN (Tableau VI), suggérant que le bénéfice obtenu à des doses nutritionnelles est transposable à la consommation chez l'homme.

La cohérence des résultats sur les marqueurs métaboliques et ceux du stress oxydant pour la dose à 1 g/kg d'extrait de thé renforce l'hypothèse d'un lien étroit entre stress oxydant et effet insulino-sensibilisateur. Cette relation a été établie pour un insulino-sensibilisateur bien connu, la metformine, qui entraîne chez le rat en syndrome métabolique une augmentation des systèmes de défenses antioxydantes plasmatiques (Faure *et al.*, 1999). A l'inverse, dans une

autre étude, les mêmes auteurs ont aussi rapporté qu'un antioxydant, la vitamine E, pouvait améliorer la sensibilité à l'insuline (Faure *et al.*, 1997).

En revanche, dans le foie, nous n'avons observé aucun bénéfice sur le statut rédox lorsque l'alimentation est enrichie en extraits de thé vert. Il est possible que cette absence d'efficacité soit due aux faibles taux d'extraits de thé utilisés (0,1 et 0,2 %), puisque, avec un régime apportant 3 % d'extraits de thé, d'autres auteurs ont observé un effet antioxydant au niveau hépatique (Sano *et al.*, 1995).

En conclusion, dans cette partie du travail, nous démontrons *in vivo*, sur un modèle animal de syndrome métabolique, l'effet insulinosensibilisateur des extraits de thé et nous confirmons les résultats décrits *in vitro*. De plus, nous montrons l'existence d'un parallélisme étroit entre une amélioration des métabolismes glucidique et lipidique, et un bénéfice sur le stress oxydant, lorsque le régime est enrichi en extraits de thé. Les améliorations que nous observons sont tout à fait compatibles avec un effet préventif chez l'homme, car les doses utilisées sont équivalentes à une consommation normale journalière. Considérant le rôle du stress oxydant dans les complications du diabète et la relation étroite entre stress oxydant et insulino-résistance, il est tentant de penser que les polyphénols du thé, à la fois par leurs propriétés antioxydantes et insulino-sensibilisatrices, sont un moyen de prévention nutritionnelle important du syndrome métabolique, pathologie en pleine expansion à l'échelle mondiale. Des essais randomisés en double aveugle de plus grande envergure sont nécessaires pour confirmer chez l'homme le bénéfice clinique des polyphénols du thé vert dans le syndrome métabolique.

IX-1-3 - Publication A

Green tea extract decreases oxidative stress and improves insulin sensitivity in an animal model of the metabolic syndrome, the fructose-fed rat.

Isabelle Hininger-Favier^{1,2}, Rachida Benaraba^{1,2}, Sara Coves³, Diane Aguay⁴, Richard A Anderson⁵ and Anne-Marie Roussel^{1,2}

¹ INSERM, U884, Grenoble, F-38000, France

² LBFA, Université Joseph Fourier, Grenoble I, F-38041, France

³ UNILEVER France, F-92842, Rueil Malmaison, France.

⁴ Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, F-38702, La Tronche, France

⁵ Nutrient Requirements and Functions Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, Beltsville, MD, USA;

Acknowledgement

We are grateful to Unilever France for supporting this work by a Research grant.

Corresponding author: Hininger-Favier I, PH.D, Laboratoire LBFA– Université Joseph Fourier, 38700, Grenoble, France / tél : (+33) (0)4 76 63 71 31 ; Fax : (+33) (0)4 76 63 71 80 ; email: Anne-Marie.Roussel@ujf-grenoble.fr

ABSTRACT:

Metabolic syndrome is characterized by insulin resistance, dyslipidemia and increased oxidative stress. Tea polyphenols, as both insulin potentiating factors and antioxidants, might act in preventing the metabolic syndrome. We aimed to determine the effects of green tea extract consumption on oxidative stress and insulin sensitivity using fructose-fed diet rats as an animal model of the metabolic syndrome. Wistar rats, 10 per group, received a high fructose diet (FD) for six weeks or FD plus either 1 or 2 g of green tea solids/kg diet. Signs of the metabolic syndrome (hyperglycemia, hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia) were developed in rats receiving the FD diet compared to those of a control group. Rats receiving added tea solids exhibited an important decrease of glycemia, insulinemia and triglyceridemia indicating an insulin potentiating effect of tea. In parallel, oxidative stress was decreased. Significantly lowered plasma lipid peroxidation, sulfhydryl (SH) group oxidation and DNA oxidative damage were also present. In conclusion, addition of green tea extracts to animals with the metabolic syndrome led to beneficial effects of green tea both on oxidative stress markers and on insulin/glucose regulation, indicating that tea may be of benefit for people at risk of the metabolic syndrome and diabetes.

Key words: green tea, oxidative stress, insulin sensitivity, fructose rich diet, rats.

INTRODUCTION:

The metabolic syndrome is a cluster of metabolic abnormalities with insulin resistance as a major characteristic [1, 2]. This nutritional disorder is increasing rapidly and is a leading cause of diabetes and cardiovascular diseases. Oxidative stress is linked to insulin resistance and cardiovascular implications of oxidative stress in insulin resistant conditions are well documented [3]. This association is not restricted to insulin resistance in type 2 diabetes, but is also evident in patients with the metabolic syndrome [4]. In the metabolic syndrome, a clustering of sources of oxidative stress exists, related to hyperglycemia, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia and inadequate antioxidant defenses. Alteration of insulin sensitivity leads to a higher rate of glucose oxidation and an increased production of OH° [5]. Oxidative stress has been identified as a key factor in diabetes, and atherosclerosis is associated with impaired fasting and postprandial glycaemia [6] and obesity [7-11]. Thus uncontrolled free radical production might be a unifying mechanism underlying the development of co-morbidities in peo-

ple with metabolic syndrome. For these patients, the increase of dietary antioxidant intakes could represent a potential strategy to reduce the incidence of diabetes and cardiovascular diseases and have positive health effects [12]. Many polyphenols in foods are potent antioxidants [13] and they have been linked with the hypothesis that their redox activities may confer specific health benefits [14]. Polyphenols from tea could be of special interest in the metabolic syndrome and epidemiological observations and laboratory studies have shown that green tea has a variety of health effects including antioxidant and hypolipemic activities [15-17]. The most widely known health benefits of tea relate to the polyphenols as the principal active ingredients in protection of oxidative damage, but polyphenols in tea may also increase insulin activity and consequently may act in preventing diabetes. Antidiabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes have been reported [18]. Tea contains compounds with in vitro insulin-enhancing activity [19, 20]. The predominant active ingredient seems to be epigallocatechin gallate (EGCG) and we have previously reported that black and green tea extracts and EGCG increased glucose uptake by rat epididymal adipocytes both in the presence or absence of added insulin [20].

Therefore, given the link between insulin resistance and oxidative stress in the metabolic syndrome and the potential insulin-enhancing activity of green tea polyphenols, the aim of this study was to investigate, using an animal model of the metabolic syndrome, the effects of green tea consumption on plasma oxidative stress parameters and their correlation with insulin sensitivity.

MATERIALS AND METHODS:

Diets:

The diets were purchased from SAFE, 89290 Augis, France. A fructose-rich (60 %) diet (FD) was fed to rats [21] to induce the metabolic syndrome. The control group (C) received a standard Purina chow for 6 weeks. The synthetic FD diet contained in g/kg casein, 200, fructose, 600, corn oil, 50, alphacel, 50, DL methionine, 3, choline bitartrate, 2, AIN-76 mineral mix, 35 and AIN 76A vitamin mix, 10 [22]. The green tea solids were obtained from Unilever France, F 92842 Rueil Malmaison, France. They contained 373 mg/g of total polyphenols (127.48 EGCG, 92.4 EGC, ECG 37.29, EC 24.00, Caffeine 59.36, L theanine 1.95).

Animals:

Forty male Wistar rats (Charles River, L'Arbresle, France), 6 weeks old, weighing roughly 150 g, were housed in wire-bottomed cages in a temperature controlled room (22°C) with a 12

h light / 12 h dark cycle. The rats were maintained and handled in accord with the Guide for the Care and Use of Laboratory Rats (NIH 1985). All rats were adapted and fed a standard Purina chow for one week. They were then randomly divided in four groups of ten rats. FD Group received, at libitum for 6 weeks, the fructose-rich diet (FD). Two other groups received the same diet for 6 weeks but containing either 1 g or 2 g green tea solids / kg diet (FD plus 1 g Group) (FD plus 2 g group). The control group received a standard Purina chow for 6 weeks. Rats had unrestricted access to food and water.

Blood sampling:

After overnight food deprivation, rats were weighed and then anesthetized with sodium pentobarbital intraperitoneally. Blood was collected by heart puncture in heparinized tubes protected from light and centrifuged at room temperature for 10 min at 3000 g. Plasma was immediately isolated, aliquoted, stored at -80°C and analyzed within 6 months. Immediately after blood collection, the rats were killed and liver was removed, weighed, frozen in liquid nitrogen and stored until analysis. 500 mg of tissue sample were extracted in buffer (10 mmol/L Tris-NaOH, 1 mmol/L DPTA, 1 mmol.LLPMSF, pH = 7.4) and centrifuged at 3000 g and 4°C for 10 min.

For the comet assay and DNA damage determinations, total blood was stored as described in [23] 500 μl of blood was stabilized with 500 μl of a 20/80 (v/v) mixture of dimethylsulfoxide (DMSO) and RPMI 1640 cell culture medium. Aliquots of this mixture were progressively frozen to -80°C by use of cryopreservation vessels (Bicell, Fisher Bioblock Scientific, Lyon, France) in a -80°C freezer overnight. After one night, samples were transferred from the cryopreservation vessels to storage at -80°C until analyses within 4 months.

Biological parameters:

Glucose, TG, insulin

Insulin was measured by ELISA, American Laboratory Products Co., Windham, N.

Glucose and triglycerides were assessed, as routine laboratory analyses, by enzymatic and colorimetric methods on Roche/Hitachi modular P.

Lipid oxidation

Plasma TBAR's concentrations were assessed as described by Richard *et al.*, [24].

Plasma thiol groups

Plasma SH groups were assayed as described by Faure and Lafond (1995). The calibration was obtained from a stock solution of 100 mM N-acetyl cysteine (NAC) in the range of 0.125 to 1 mM. Standards and plasma samples were diluted in phosphate buffer 0.05 M, EDTA 1 mM, pH 8 and DTNB, 2.5 mM, and absorbance measured at 412 nm.

DNA damage

The evaluation of DNA damage was achieved by the comet assay (single-cell gel electrophoresis) on total blood following the method of modified by [23]. Results were expressed as tail moment (TEM). Three samples per animals were assayed with 50 cells/sample. The mean of three determinations were calculated for each rat.

Statistical analyses

Statistical analyses of the data were performed by analysis of variance. Individual mean comparisons were identified with Duncan's Multiple Range Test (SAS Institute, Cary, NC). Values were expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS:

Food intake and body weight (Table I):

Fructose in the diet did not affect food intake and body weight. Green tea solid added to the FD diet did not change food intake. Body weight tended to be lower when tea solids were added compared with FD group ($p = 0.08$).

Plasma triglycerides, glucose and insulin (table I)

Rats receiving the fructose rich diet (FD group) developed signs of the metabolic syndrome. Plasma insulin, glucose, and triglyceride concentrations were significantly ($p < 0.05$) higher than in control group. Addition of green tea solids to the FD diet lowered ($p < 0.001$) plasma TG, fasting glucose and insulin concentrations compared with FD group.

Oxidative stress markers:

As shown in Table II, we observed increased lipid peroxidation measured by plasma MDA in FD rats compared with the control group ($p < 0.05$). In contrast, FD animals receiving added tea solids exhibited lowered plasma TBAR's levels indicating a lesser extent of lipid peroxidation. DNA oxidative damages, measured by the comet assay, were also decreased. Plasma thiol (SH) groups were increased demonstrating a protective effect of green tea against protein oxidation. In liver, no significant changes between the FD groups receiving or not green tea

extracts were observed in SH groups and TBAR's (Table III). The beneficial effects of tea on oxidative stress and insulin sensitivity were not dose-dependant and the effect was not improved at the higher level of tea consumption (2 g tea extracts / kg diet).

DISCUSSION :

The aim of this study was to investigate, in an animal model of the metabolic syndrome, the effects of consumption of green tea extract on plasma oxidative stress parameters and insulin sensitivity. Our study, in agreement with previous work [21, 26], confirms that consumption of a high fructose diet leads to signs of the metabolic syndrome (increased plasma insulin, glucose and triglycerides). Fructose intake has increased steadily during the past two decades and elevated intakes of fructose have been associated with numerous abnormalities in humans and laboratory animals. The underlying mechanisms for the detrimental consequences of a high fructose diet in animal models are not totally understood. Fructose-induced hypertriglyceridemia is a result of enhanced lipogenesis, overproduction of VLDL, TG and decreased TG clearance [27]. A link between oxidative stress and insulin resistance has been demonstrated [28] and oxidative stress has been proposed as the root cause underlying the development of insulin resistance, beta-cell dysfunction and impaired glucose tolerance [29]. High levels of dietary fructose have been reported to enhance oxidative damage in rats by [21, 30, 31]. In the present work, we observed the deleterious impact of fructose rich diet not only on insulin sensitivity, but also on oxidative stress since the FD animals exhibited both increased levels of oxidative stress parameters, higher glycemia, triglyceridemia and fasting insulinemia compared with the control group.

Green tea extracts added to the fructose diet, improve insulin sensitivity. These data are consistent with the insulin-enhancing activity of green tea that we observed previously *in vitro* [20]. Fasting insulinemia, glycaemia and triglyceridemia are dramatically decreased while oxidative stress parameters are also lowered due to the components of tea. We measured increased levels of SH groups in FD rats receiving green tea solids, indicating protective antioxidant effects of tea against protein oxidation while lipid peroxidation, monitored by plasma TBAR's concentrations, and DNA damage, assessed by comet assay, were decreased. The improvement of insulin sensitivity could therefore participate to the well-documented antioxidant effects of green tea [17]. An insulin sensitizer, metformin, has also been shown to improve the free-radical defense system [32]. Conversely, previous studies in fructose-fed rats have reported that a free radical scavenger, like vitamin E, improved insulin-sensitivity [33].

Green tea extracts in the diet resulted in decreased plasma lipid peroxidation. For patients suffering from cardiovascular diseases and diabetes, it is well-known that decreasing lipid peroxidation is an important health challenge to avoid oxidative damage of the arterial walls. In the present work, the lowering effects of tea on lipid peroxidation are thus a predictive benefit for patients with type 2 diabetes. As suggested by Saffari *et al.*[34], EGCG can act as an antioxidant by trapping proxyl radicals, inhibiting lipid peroxidation and protecting cell membranes against oxidative stress.

Tea consumption also decreases oxidative DNA damage, assessed by the comet assay in fructose-fed rats. In agreement with our findings, green tea catechins have been reported to partially protect DNA from $^{\circ}\text{OH}$ radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair [35]. In healthy human subjects, dietary polyphenols such as quercetin decrease DNA oxidative damage [36]. Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA [37]. In heavy smokers, at high risk of oxidative stress, a beneficial effect of a 4 month tea intervention on oxidative damage has also been reported [38]. In humans, consumption of two cups of green tea containing 250 mg of total catechins for 42 days led to a decrease in plasma peroxides and lowered induced DNA damage[4].

Moreover, the increase in plasma SH groups, whose oxidation is an early determinant of oxidative stress [39] indicated protective activity of green tea against free radicals and glucose mediated protein damage confirming previous data reported by [40]. Protein oxidation has been reported as a risk factor of oxidative complications like nephropathies and glomerulopathies in diabetes[41].

Conversely to plasma parameters, there were no significant changes in lipid or protein oxidation in the liver of animals receiving green tea extracts. Antioxidant effects of tea consumption have however been reported in the liver from rats fed diets containing 3 % green tea leaf powder [42] with decreased levels of liver peroxides. The lower levels of green tea extracts (0.1 and 0.2 %) used in our study could possibly explain this discrepancy.

Regarding the concentration of green tea extracts in the diet, the effects were also beneficial but not greater in animals consuming 2 g of tea solids/kg diet compared with animals consuming 1 g of tea solids/kg diet. These data strongly suggest that tea acts at moderate doses and agree with study showing in humans, the effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidant status with two cups/day of green tea containing 250 mg of total catechins [43].

In conclusion, in rats consuming a diet that increases the signs and symptoms of the metabolic syndrome, we observed both beneficial antioxidant and insulin enhancing effects of tea. Since insulin resistance is associated with an increased oxidative stress not only in people with diabetes but also in people with metabolic syndrome, these data suggest beneficial effects in these patients whose numbers are increasing worldwide. The antioxidant properties of tea polyphenols associated with their potential insulin enhancing effects may represent a viable nutritional approach in people with metabolic syndrome who are known to exhibit high levels of oxidative stress and insulin resistance leading to cardiovascular diseases and vascular complications.

REFERENCES

- 1) Reaven GM: The insulin resistance syndrome. *Curr Atheroscler Rep* 5:364-371,2003
- 2) Avogaro A: Insulin resistance: trigger or concomitant factor in the metabolic syndrome. *Panminerva Med.*48:3-12, 2006.
- 3) Stump CS, Clark SE, Sowers JR: Oxidative stress in insulin-resistant conditions: cardiovascular implications. *Treat. Endocrinol.* 4:343-351, 2005.
- 4) Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID: The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid. Redox Signal* 7:1040-1052, 2005.
- 5) Vincent HK, Taylor AG: Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int. J. Obes. (Lond)* 30:400-418, 2006.
- 6) Wright E, Jr., Scism-Bacon JL, Glass LC: Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int. J. Clin. Pract.* 60:308-314, 2006.
- 7) Pennathur S, Heinecke JW: Mechanisms of oxidative stress in diabetes: implications for the pathogenesis of vascular disease and antioxidant therapy. *Front. Biosci.* 9:565-574, 2004.
- 8) 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.* 114:1752-1761, 2004.
- 9) Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G: Inflammation, insulin resistance, and obesity. *Curr. Atheroscler. Rep.* 6:424-431, 2004.

- 10) Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R: Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 111:1448-1454, 2005.
- 11) Govindarajan G, Whaley-Connell A, Mugo M, Stump C, Sowers JR: The cardiometabolic syndrome as a cardiovascular risk factor. *Am. J. Med. Sci.* 330:311-318, 2005.
- 12) Vega-Lopez S, Devaraj S, Jialal I: Oxidative stress and antioxidant supplementation in the management of diabetic cardiovascular disease. *J. Investig. Med.* 52:24-32, 2004.
- 13) Leighton F, Cuevas A, Guasch V, Perez DD, Strobel P, San Martin A, Urzua U, Diez MS, Foncea R, Castillo O, Mizon C, Espinoza MA, Urquiaga I, Rozowski J, Maiz A, Germain A: Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans. *Drugs Exp. Clin. Res.* 25:133-141, 1999.
- 14) Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L: Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:287-306, 2005.
- 15) McKay DL, Blumberg JB: The role of tea in human health: an update. *J. Am. Coll. Nutr.* 21:1-13, 2002.
- 16) Rietveld A, Wiseman S: Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J. Nutr.* 133:3285S-3292S, 2003.
- 17) Coimbra S, Castro E, Rocha-Pereira P, Rebelo I, Rocha S, Santos-Silva A: The effect of green tea in oxidative stress. *Clin. Nutr.* 25:790-796, 2006.
- 18) Sabu MC, Kuttan R: Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *J. Ethnopharmacol.* 81:155-160, 2002.
- 19) Broadhurst CL, Polansky MM, Anderson RA: Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. *J. Agric. Food. Chem.* 48:849-852, 2000.
- 20) Anderson RA, Polansky MM: Tea enhances insulin activity. *J. Agric. Food. Chem.* 50:7182-7186, 2002.
- 21) Busserolles J, Gueux E, Rock E, Demigne C, Mazur A, Rayssiguier Y: Oligofructose protects against the hypertriglyceridemic and pro-oxidative effects of a high fructose diet in rats. *J. Nutr.* 133:1903-1908, 2003.
- 22) Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J. Nutr.* 107:1340-1348, 1977.

- 23) Hininger I, Chollat-Namy A, Sauvaigo S, Osman M, Faure H, Cadet J, Favier A, Roussel AM: Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. *Mutat Res* 558:75-80, 2004.
- 24) Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A: High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J Chromatogr* 577:9-18, 1992.
- 25) Faure, P.; Lafond, J. L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier, A. E.; Cadet, J.; Kalnyanaraman, M.; Fontecave M. and Pierre J. L., Eds. *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Basel, Boston, Berlin: Birkäuser Press; 1995:237-48
- 26) Thresher JS, Podolin DA, Wei Y, Mazzeo RS, Pagliassotti MJ: Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279:R1334-1340, 2000.
- 27) Mayes PA: Intermediary metabolism of fructose. *Am. J. Clin. Nutr.* 58:754S-765S, 1993.
- 28) Bloch-Damti A, Bashan N: Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal* 7:1553-1567, 2005.
- 29) Paolisso G, Giugliano D: Oxidative stress and insulin action: is there a relationship? *Diabetologia* 39:357-363, 1996.
- 30) Busserolles J, Rock E, Gueux E, Mazur A, Grolier P, Rayssiguier Y: Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats. *Br. J.Nutr.* 87:337-342, 2002.
- 31) Delbosc S, Paizanis E, Magous R, Araiz C, Dimo T, Cristol JP, Cros G, Azay J: Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis* 179:43-49, 2005.
- 32) Faure P, Rossini E, Wiernsperger N, Richard MJ, Favier A, Halimi S: An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats. *Diabetes* 48:353-357, 1999.
- 33) Faure P, Rossini E, Lafond JL, Richard MJ, Favier A, Halimi S: Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. *J. Nutr.* 127:103-107, 1997.

- 34) Saffari Y, Sadrzadeh SM: Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life Sci.* 74:1513-1518, 2004.
- 35) Anderson RF, Fisher LJ, Hara Y, Harris T, Mak WB, Melton LD, Packer JE: Green tea catechins partially protect DNA from OH radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals. *Carcinogenesis* 22:1189-1193, 2001.
- 36) Beatty ER, O'Reilly JD, England TG, McAnlis GT, Young IS, Geissler CA, Sanders TA, Wiseman H: Effect of dietary quercetin on oxidative DNA damage in healthy human subjects. *Br. J. Nutr.* 84:919-925 2000.
- 37) Lean ME, Noroozi M, Kelly I, Burns J, Talwar D, Sattar N, Crozier A: Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes* 48:176-181, 1999.
- 38) Hakim IA, Harris RB, Chow HH, Dean M, Brown S, Ali IU: Effect of a 4-month tea intervention on oxidative DNA damage among heavy smokers: role of glutathione S-transferase genotypes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13:242-249, 2004.
- 39) Balcerczyk A, Bartosz G: Thiols are main determinants of total antioxidant capacity of cellular homogenates. *Free Radic. Res.* 37:537-541, 2003.
- 40) Nakagawa T, Yokozawa T, Terasawa K, Shu S, Juneja LR: Protective activity of green tea against free radical- and glucose-mediated protein damage. *J. Agric. Food Chem.* 50:2418-2422, 2002.
- 41) Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-267, 1996.
- 42) Sano M, Takahashi Y, Yoshino K, Shimoi K, Nakamura Y, Tomita I, Oguni I, Konomoto H: Effect of tea (*Camellia sinensis* L.) on lipid peroxidation in rat liver and kidney: a comparison of green and black tea feeding. *Biol. Pharm. Bull.* 18:1006-1008, 1995.
- 43) Erba D, Riso P, Bordoni A, Foti P, Biagi PL, Testolin G: Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *J. Nutr. Biochem.* 16:144-149, 2005.

Table I : Effect of tea solid consumption on FD-induced metabolic syndrome in rats

	<u>Control</u>	<u>FD</u>	<u>FD+1g tea solids/kg diet</u>	<u>FD+2g tea solids/kg diet</u>
<u>Food intake g/d</u>	<u>21.5±0.6^a</u>	<u>20.7±0.8^a</u>	<u>20.5±0.9^a</u>	<u>20.3±1.5^a</u>
<u>Body weight g</u>	<u>339±6^a</u>	<u>360±7^a</u>	<u>350±5^a</u>	<u>353±7^a</u>
<u>Glycemia mmol/L</u>	<u>7.6±0.4^b</u>	<u>10.7±0.4^a</u>	<u>7.9±0.5^b</u>	<u>8.4±0.32^b</u>
<u>Triglyceridemia g/L</u>	<u>0.48±0.06^b</u>	<u>1.27±0.33^a</u>	<u>0.58±0.05^b</u>	<u>0.65±0.06^b</u>
<u>Insulinemia pmol/L</u>	<u>107.2±34.5^b</u>	<u>411.7±99.9^a</u>	<u>113.2±28.1^b</u>	<u>197.2±42.9^b</u>

Numbers in each row with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

Table II: Effects of tea consumption on plasma oxidative stress parameters

<u>Plasma parameters</u>	<u>Group I Fructose diet (FD)</u>	<u>Group II FD + 1g tea solid/kg</u>	<u>Group III FD + 2g tea solid/kg</u>
<u>TBAR's, $\mu\text{mol/L}$</u>	<u>4.75 ± 0.28^a</u>	<u>3.77 ± 0.25^b</u>	<u>4.02 ± 0.38^{ba}</u>
<u>SH groups, $\mu\text{mol/L}$</u>	<u>5.4 ± 0.05^b</u>	<u>6.0 ± 0.15^a</u>	<u>5.8 ± 0.05^a</u>
<u>DNA Damage¹, Comet (TEM)</u>	<u>12.8 ± 0.75^a</u>	<u>8.1 ± 0.61^c</u>	<u>10.8 ± 0.58^b</u>

Numbers in each row with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

¹ *arbitrary units*

Table III: Effects of tea consumption on oxidative stress parameters in liver

<u>Liver parameters</u>	<u>Group I Fructose diet(FD)</u>	<u>Group II FD + 1g tea solid/kg</u>	<u>Group III FD + 2g tea solid/kg</u>
<u>TBAR's, $\mu\text{mol/g prot}$</u>	<u>0.36 ± 0.02</u>	<u>0.36 ± 0.02</u>	<u>0.39 ± 0.02</u>
<u>SH groups, $\mu\text{mol/g prot}$</u>	<u>62.7 ± 3.9</u>	<u>57.9 ± 3.9</u>	<u>65.1 ± 5.5</u>

IX-1-4 - Présentation des résultats de la publication B

Green tea polyphenol extract regulates the expression of genes involved in glucose uptake and insulin signaling in rats fed a high fructose diet

Heping Cao,^{*,†} Isabelle Hininger-Favier,[‡] Meghan A Kelly,[†] **Rachida Benaraba**,[‡] Harry D Dawson,[†] Sara Coves,[§] Anne M Roussel,[‡] and Richard A Anderson^{*,†}

J Agric Food Chem, 2007, sous presse

Les extraits de thé vert améliorent l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie induites par un régime fructose chez le rat. Dans le deuxième volet de ce travail, nous nous sommes attachés à identifier les mécanismes moléculaires susceptibles d'expliquer l'effet potentialisateur de l'insuline associé à la consommation de thé vert.

Des études *in vitro* sur des adipocytes en culture avaient montré la capacité de certains polyphénols issus du thé vert comme l'épigallocatechine gallate à activer les voies de signalisation de l'insuline dans des adipocytes (Anderson *et* Polansky, 2002 ; Broadhurst *et al.*, 2000). Une autre étude chez l'animal montrait que la consommation de polyphénols extraits du thé vert était capable d'augmenter l'expression des transporteurs du glucose GLUT-4, suggérant un mécanisme d'action au niveau moléculaire des polyphénols. Mais l'effet des polyphénols sur les autres voies impliquées dans la transduction du signal de l'insuline n'avait pas été exploré (Cao *et al.*, 2007a). Nous avons donc étudié l'induction de l'expression de gènes transporteurs du glucose et celle de ceux impliqués dans les voies de signalisation de l'insuline par les extraits de thé vert dans le muscle et le foie des animaux. L'étude de l'expression des gènes a été menée par PCR-quantitative en temps réel.

Ce travail a été réalisé sur le plan technique par le Dr Cao (centre de nutrition humaine de Beltsville, MD, USA) que nous remercions.

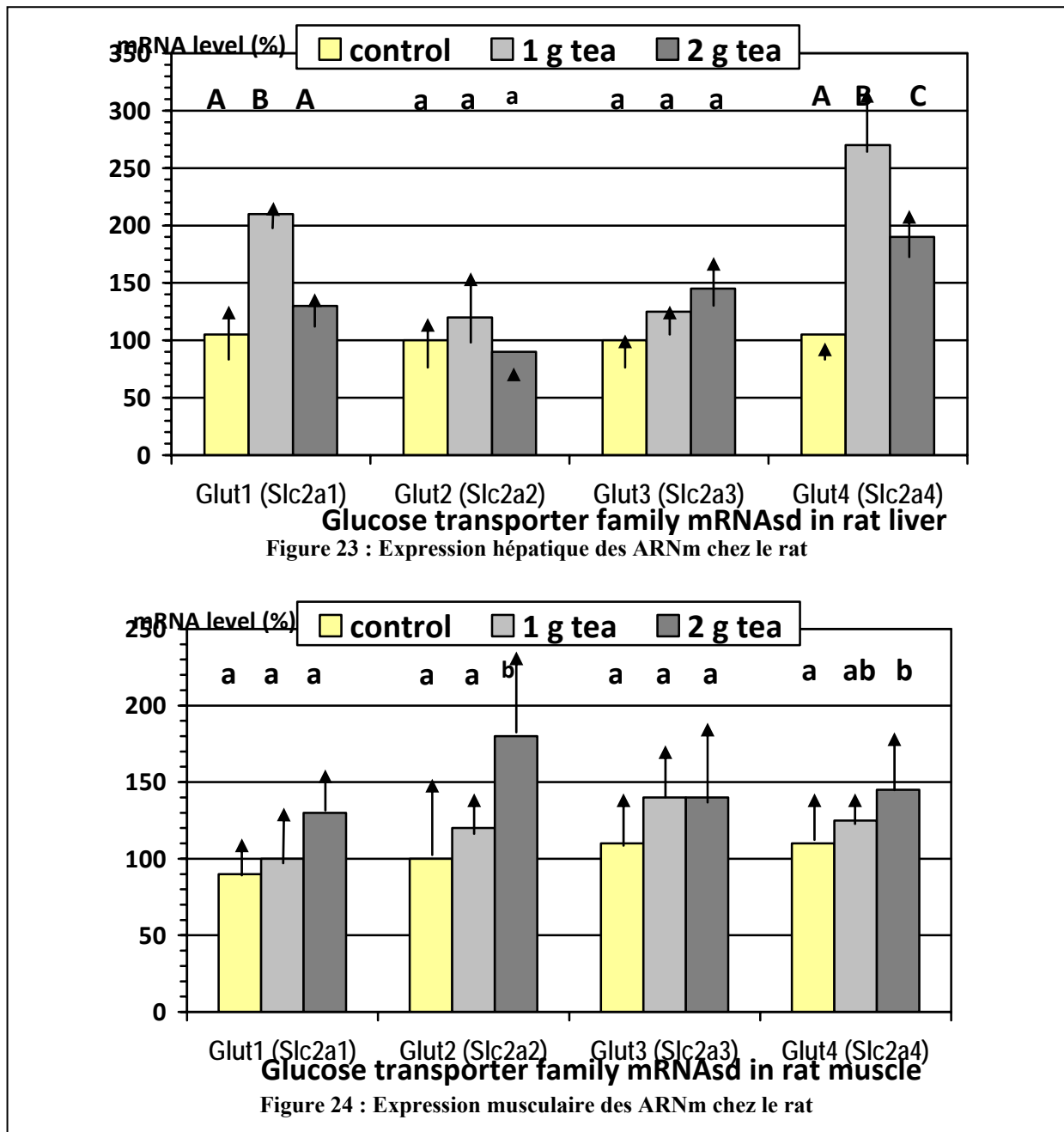
La principale observation issue de ce travail est que les polyphénols du thé sont capables d'augmenter l'expression des ARNm du gène codant pour la protéine transporteur du glucose GLUT4 à la fois dans le muscle et dans le foie. L'étude a porté sur l'effet du régime sur les transporteurs GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, et il a été ainsi vérifié que le transporteur GLUT4 était celui le plus exprimé, à la fois au niveau du muscle et du foie, et que son niveau d'expression au niveau musculaire était largement supérieur à celui du foie (Tableau VII).

Tableau VII. Expression des mRNA des transporteurs Glut /Slc2a et expression au niveau musculaire et hépatique chez des rats.

Tissue	mRNA	Diet control Cycle of threshold (CT ± SD)	Expression ratio (relative to Glut1) (Fold)	Expression ratio (relative to liver) (Fold)
Liver	Rpl32	18.8 ± 0.6	Internal control	Internal control
	Glut1/Slc2a1	25.8 ± 0.6	1.0	1.0
	Glut2/Slc2a2	20.7 ± 1.0	34.3	1.0
	Glut3/Slc2a3	31.7 ± 0.9	0.02	1.0
	Glut4/Slc2a4	32.1 ± 2.2	0.01	1.0
	Akt1	22.7 ± 0.9		1.0
	Grb2	23.0 ± 1.8	1.0	
	Gsk3b	23.7 ± 0.7		1.0
	Gys1	28.9 ± 0.9		1.0
	Ins1	37.2 ± 1.0		1.0
	Ins2	38.4 ± 1.2		1.0
	Insr	24.0 ± 1.4		1.0
	Igf1	0		
	Igf2	40.4 ± 4.1		1.0
	Igf1r	26.6 ± 0.4		1.0
	Igf2r	24.0 ± 0.6		1.0
	Irs1	22.3 ± 0.6		1.0
	Irs2	23.6 ± 0.5		1.0
	Pik3cb	24.2 ± 1.3		1.0
	Pik3r1	23.2 ± 0.9		1.0
	Shc1	27.7 ± 3.4		1.0
	Sos1	26.8 ± 2.0		1.0
	Muscle	Rpl32	19.5 ± 0.2	Internal control
Glut1/Slc2a1		28.7 ± 0.6	1.0	0.2
Glut2/Slc2a2		37.2 ± 1.4	0.003	0.00002
Glut3/Slc2a3		28.0 ± 0.3	1.6	21.1
Glut4/Slc2a4		20.5 ± 0.2	294.1	5042.8
Akt1		23.6 ± 0.3		0.9
Grb2		26.2 ± 2.9		0.2
Gsk3b		24.2 ± 0.9		1.1
Gys1		27.2 ± 4.9		5.3
Ins1		36.6 ± 1.2		2.5
Ins2		36.0 ± 0.4		8.6
Insr		25.1 ± 0.7		0.8
Igf1		0		1.6
Igf2		36.8 ± 1.2		19.7
Igf1r		25.0 ± 0.6		4.9
Igf2r		24.9 ± 0.5		0.9
Irs1		23.4 ± 0.6		0.8
Irs2		24.6 ± 1.0		0.8
Pik3cb		26.8 ± 3.1		0.3
Pik3r1		25.2 ± 1.4		0.4
Shc1		29.9 ± 3.8		0.4
Sos1		24.2 ± 1.2		9.8

Des différences entre le muscle et le foie dans l'expression des ARNm impliqués dans les voies de signalisation de l'insuline ont également été mises en évidence (Tableau VII). Concernant les effets des régimes sur l'expression des ARNm, on observe une augmentation de 110 et 160 % respectivement des transporteurs du GLUT1 et du GLUT4 au niveau hépatique avec le régime à 1 g d'extraits de thé vert/kg régime (figure 23), alors que le régime à 2 g/kg a des effets moindres, puisque seule l'induction du GLUT4 apparaît (figure 23).

Au niveau musculaire, en revanche, un effet sur le taux d'expression des ARNm n'est observé qu'avec le régime à 2g/kg capable d'induire une augmentation de 80 et 60 % de l'expression des ARNm des gènes codant pour GLUT2 et GLUT4 respectivement (figure 24).



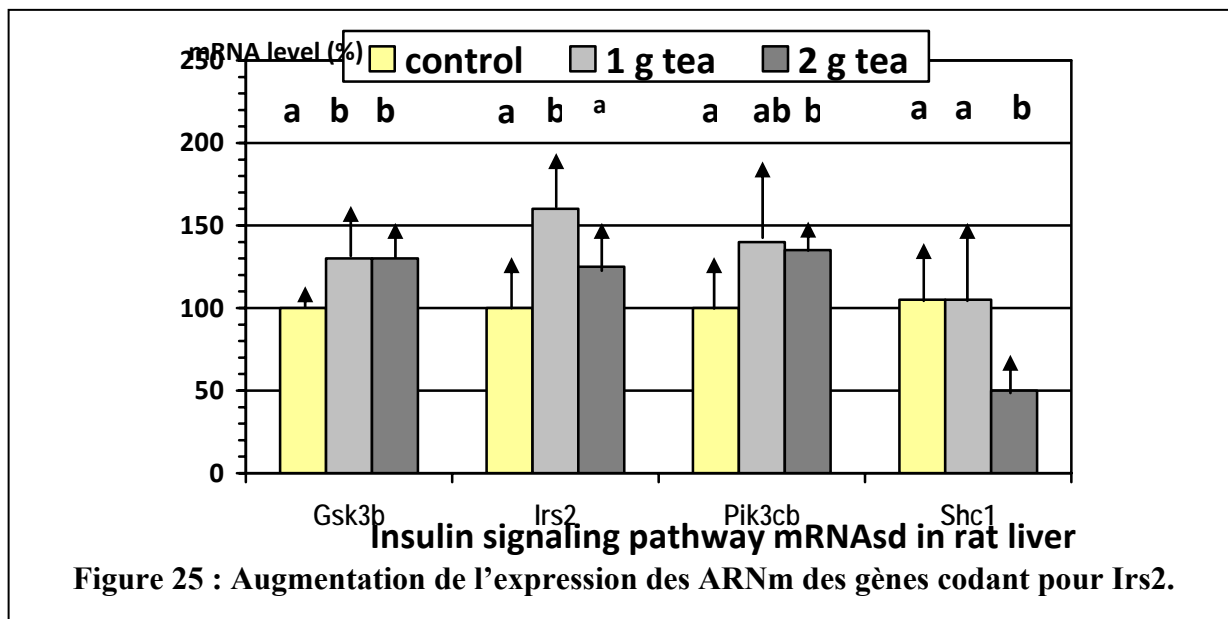
L'augmentation de l'expression des ARNm du GLUT4 pourrait avoir des répercussions physiologiques puisque il est décrit que :

- Le GLUT4 est la forme majoritaire dans le muscle de la famille des transporteurs du glucose,
- Le GLUT4 est l'élément essentiel dans la réponse insulinique au niveau du muscle (Shepherd *et al.*, 1999).

- La quantité de GLUT4 est diminuée en cas d'obésité (Garvey *et al.*, 1991), suggérant ainsi que tout élément pouvant contribuer à son augmentation pourrait être bénéfique.
- L'insuline augmente l'expression des ARNm de GLUT4 dans des adipocytes en culture (Valverde *et al.*, 1999 ; Hernandez *et al.*, 2003 ; Yu *et al.*, 2001).

L'autre observation importante issue de ce travail est que les polyphénols du thé vert sont aussi capables d'agir sur la voie de signalisation de l'insuline. Ainsi, quelque soit la dose utilisée, nous retrouvons un effet commun sur l'expression de l'ARNm de Gs3kb au niveau hépatique. La protéine GS3KB code pour une kinase multifonctionnelle, dont l'activité est inhibée par phosphorylation de ses résidus sérines par une AKT1/PKB kinase induite par l'insuline (Frame *et Cohen*, 2001). Une diminution de l'activité de la GS3KB a pour conséquence une activation de la glycogène synthase et du facteur d'initiation 2B, ce qui se traduit par une augmentation de la synthèse du glycogène et de la synthèse protéique (Frame *et Cohen*, 2001). Il a également été décrit que GS3KB était capable de phosphoryler la protéine TTP (tristretapoline) *in vitro* (Cao *et al.*, 2006). Or, dans sa forme phosphorylée, elle reconnaît plus faiblement les séquences de fixation mARN ARE (Cao, 2004 ; Carballo *et al.*, 2001). De plus, cette forme hyperphosphorylée de la protéine TTP exerce une activité anti-inflammatoire médiée par une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Blackshear, 2002 ; Anderson *et al.*, 2004c). En effet la protéine TTP, en se liant au RNAm des cytokines proinflammatoires comme le TNF- α et le GM-CSF, induit leur dégradation (Cao, 2004 ; Carballo *et al.*, 1998 ; Carballo *et al.*, 2000). Il est par ailleurs décrit que l'insuline à faible concentration (nM) était capable, après seulement quelques minutes, d'augmenter la quantité de protéine TTP et le taux de son ARNm (Lai *et al.*, 1990 ; Cao *et al.*, 2007 a). De ce fait, l'augmentation du taux d'expression de Gs3kb semble être en contradiction avec les effets biologiques des polyphénols issus d'extraits de thé verts à augmenter l'activité de l'insuline, et avec leurs actions anti-inflammatoires.

Nous avons également observé que la consommation de thé pouvait également affecter d'autres gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'insuline, et que les effets pouvaient être différents selon la dose d'extraits de thé vert utilisés. Ainsi, au niveau du foie, avec le régime à 1 g/kg, nous mettons en évidence une augmentation de 60 % de l'expression des ARNm des gènes codant pour Irs2, sans effet significatif pour l'ensemble des autres gènes étudiés (figure 25), alors que le régime à 2 g/kg est associé à une augmentation de 30 % de l'expression de Pik3r1 et à une diminution de 50 % de l'expression de Shc1, sans modification de l'expression des autres gènes.



Au niveau du muscle, le régime à 1 g/kg augmente de 80 % l'expression de Irs1, alors que le régime à 2 g/kg augmente de 50 % l'expression des ARNm codant pour Shc1 et sos1. Cependant, malgré ces effets moléculaires, l'expression de nombreux ARNm de gènes également impliqués dans les voies de signalisation de l'insuline comme Ins1, Ins2, Insr, Irs1, Irs2, Akt1, Grb2, IGf1, IGf2,IGf1r, IGf2r, Gys1, Pik3r1 n'est peu ou pas modifiée, à la fois au niveau hépatique et musculaire, suggérant ainsi que l'effet des polyphénols de thé vert sur les voies de signalisation de l'insuline que nous observons sont faibles. Nos résultats sont en accord avec des travaux *in vitro* réalisés sur des adipocytes de souris (Kim *et al.*, 2006), et il est possible que cette faible efficacité des polyphénols du thé vert soit due au fait que les signaux de transduction de l'insuline impliquent des phosphorylations. Il est en outre possible que la dose, la durée des expérimentations et le moment où les polyphénols sont administrés puisse en partie rendre compte de nos résultats, puisque une étude ne rapporte aucun bénéfice de la consommation de thé vert à la fois au niveau inflammatoire et dans la sensibilité à l'insuline chez des patients diabétiques de type 2 (Ryu *et al.*, 2006).

En conclusion, les extraits de thé vert sont capables de moduler l'expression des ARNm des gènes codant pour les transporteurs du glucose et de ceux impliqués dans les voies de signalisation de l'insuline sur un modèle expérimental de syndrome métabolique. Les effets peuvent être différents selon la dose administrée, sans que l'on puisse conclure avec certitude quant à la traduction biologique des effets observés selon les doses au niveau moléculaire. Ces résultats sont en accord avec les résultats du premier volet de ce travail, où nous avons montré des

effets différents sur les métabolismes et le statut rédox selon la dose en extraits de thé du régime, en particulier l'augmentation de l'expression du taux des ARNm de GLUT4 au niveau musculaire et des ARNm de Gsk3b dans le foie. Ces résultats suggèrent donc que l'amélioration de la glycémie et de l'insulinémie par les extraits de thé verts, observée dans le premier volet de ce travail, s'expliquent par une augmentation des transporteurs du GLUT4 musculaire, réduisant de fait l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie induite par le régime riche en fructose.

La consommation de thé pourrait donc, via ce mécanisme, avoir des effets bénéfiques *in vivo* chez des personnes atteintes de syndrome métabolique.

IX-1-5 - Publication B

Green tea polyphenol extract regulates the expression of genes involved in glucose uptake and insulin signaling in rats fed a high fructose diet

Heping Cao,^{*,†} Isabelle Hininger-Favier,[‡] Meghan A Kelly,[†] **Rachida Benaraba**,[‡] Harry D Dawson,[†] Sara Coves,[§] Anne M Roussel,[‡] and Richard A Anderson^{*,†}

*Nutrient Requirements and Functions Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Building 307C, BARC-East, 10300 Baltimore Avenue, Beltsville, MD 20705, USA;

‡Laboratoire de NVMC (Nutrition, Vieillesse et Maladies Cardiovasculaires), Faculté de Pharmacie, Joseph Fourier University, Domaine de la Merci, 38700 La Tronche, France, and Unilever France, F92842 Rueil Malmaison, France.

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: 301-504-5253 (ext 270). Fax: 301-504-9062. E-mails: Heping.Cao@ars.usda.gov, peacetd2003@yahoo.com (H. Cao); or Richard.Anderson@ars.usda.gov (R.A. Anderson).

† Nutrient Requirements and Functions Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center.

‡ Laboratoire de NVMC, Faculté de Pharmacie, Joseph Fourier University.

§ Unilever France, F92842 Rueil Malmaison, France.

Running Title: Green tea regulates gene expression in rats

ABSTRACT

Green tea has anti-diabetic and anti-obesity activities, but the molecular mechanisms of these effects have not been fully understood. Quantitative real-time PCR was used to investigate the relative expression levels and the effects of green tea (1 and 2 g solid extract/kg diet) on the expression of glucose transporter family genes (*Glut1/Slc2a1*, *Glut2/Slc2a2*, *Glut3/Slc2a3*, *Glut4/Slc2a4*) and insulin signaling pathway genes (*Ins1*, *Ins2*, *Insr*, *Irs1*, *Irs2*, *Akt1*, *Grb2*, *Igf1*, *Igf2*, *Igf1r*, *Igf2r*, *Gsk3b*, *Gys1*, *Pik3cb*, *Pik3r1*, *Shc1*, *Sos1*) in liver and muscle of rats

fed a high-fructose diet known to induce insulin resistance and oxidative stress. Glut2 and Glut4 were the major Glut mRNAs in rat liver and muscle, respectively. Green tea (1 g) increased Glut1, Glut4, Gsk3b and Irs2 mRNA levels by 110%, 160%, 30% and 60% in the liver, respectively and increased Irs1 by 80% in the muscle. Green tea (2 g) increased Glut4, Gsk3b and Pik3cb mRNA levels by 100%, 30% and 30% but decreased Shc1 by 50% in the liver and increased Glut2, Glut4, Shc1 and Sos1 by 60%, 80%, 50% and 50% in the muscle. This study shows that green tea regulates gene expression in glucose uptake and insulin signaling pathway in rats fed a fructose-rich diet.

Keywords : Diabetes, fructose-rich diet, green tea; glucose transporter; insulin signaling pathway, obesity; polyphenol extract, rat

INTRODUCTION

Insulin resistance, diabetes, and obesity have been studied extensively, but the prevention and treatment of obesity and type 2 diabetes mellitus (type 2 DM¹) has not been resolved (1-4). Diet plays an important role in the development of these conditions, and the diets widely consumed in the developed countries may increase the incidence of diabetes (5). The combination of higher content of refined sugars and fats and lower intake of traditional herbs, spices, and other plant products may contribute to the higher incidences of diabetes and obesity in the US (6). Drug treatment for diabetes in the developing countries is not feasible for the majority of people and alternative and inexpensive therapies need to be evaluated.

Plants have been used for the treatment of diabetes since 1550 BC (7). Plants are important for the prevention and control of type 2 DM for people with elevated levels of blood glucose and glucose intolerance who have a greater risk of developing diabetes. Plant seeds, fruits, leaves and bark contain polyphenolic compounds. These compounds are the end products of the plant flavonoid biosynthetic pathway and are used by plants for the protection against predators (8). Plant polyphenols are also widely present in the diet (9) and are important for human health (10).

Tea (*Camellia sinensis*) is a popular beverage worldwide. Recent studies indicate that tea has a wide range of preventive effects on diabetes and obesity for animal and human health (11, 12). A number of studies have suggested that green tea polyphenols mimic insulin action. First, rat epididymal adipocyte assays indicate that green tea has insulin-potentiating activity on utilization of glucose (13, 14), and that the predominant active ingredient is epigallocatechin gallate (EGCG) (13, 14), the major polyphenol in green tea. Second, green tea decreases

fasting plasma levels of glucose, insulin, triglyceride, and free fatty acid, and increases the insulin-stimulated glucose uptake in rats fed green tea extract and polyphenols for 12 weeks (15). Third, EGCG inhibits BCH-stimulated insulin secretion and glutamate dehydrogenase (16). Fourth, EGCG induces forkhead transcription factor family O (FOXO) phosphorylation by a similar but not identical mechanism to insulin and insulin growth factor I (IGF-I) (17). Finally, both insulin and green tea increases mRNA levels coding for the anti-inflammatory mRNA destabilizing protein tristetraprolin (TTP/ZFP36/TIS11) (18-20). However, a recent study suggests that green tea consumption does not improve blood glucose, lipid profiles, insulin resistance or serum adiponectin levels in type 2 diabetes patients (21). Clearly, more studies are needed to conclusively demonstrate tea's insulin-like activity and the underlining molecular mechanisms.

A fructose-rich diet has been used as a model for the study of insulin resistance and oxidative stress in rats (22). Green tea was shown to decrease fasting plasma levels of glucose, insulin, triglyceride, and free fatty acids, and increases the insulin-stimulated glucose uptake and glucose transporter 4 (GLUT4) protein in rats fed a fructose-rich diet for 12 weeks (23). However, that study did not address more potential targets in the GLUT family and the insulin signal transduction pathway (24).

The aims of this study were to explore the effects of green tea on the expression of multiple genes coding for GLUT family (25) and components in the insulin signal transduction pathway (24, 26). Quantitative real-time PCR was used to investigate the profiles and the effects of green tea polyphenolic compounds on the expression levels of Glut family and insulin signal transduction pathway family genes. Our results suggest that green tea consumption regulates gene expression in glucose uptake and insulin signaling in rats fed a fructose-rich diet. These results suggest that drinking adequate amounts of green tea may play a role in the prevention of diabetes and obesity.

MATERIALS AND METHODS

Green tea extract and fructose-rich diet.

The green tea polyphenolic extract contained 12.75 % (w/w) EGCG, 9.21 % epigallocatechin (EGC), 3.73 % epicatechin gallate (ECG), 2.4 % epicatechin (EC), 5.94 % caffeine, and 0.195 % L-theanine (Unilever France). The fructose-rich diet contained 60 % (w/w) fructose, 20.7 % casein, 5 % corn oil, 8 % alphacel, 1 % mineral mix, 1 % vitamin mix, and 0.3 % casein (SAFE, 89290, Augis, France).

Animal study.

Male Wistar rats (6 weeks old, 150 ± 10 g, Charles River Laboratories, Les Oncins, France) were kept under the conditions as described (19, 27). All rats were fed a standard Purina chow for one week before being randomly divided into three groups with 10 rats per group. The first group of rats was given the high-fructose diet (diet control). The second group of rats was given the high-fructose diet plus 1 g of green tea solid extract/kg diet (1 g tea) and the third group of rats was given the high-fructose diet plus 2 g of green tea solid extract/kg diet (2 g tea). Animals were sacrificed after 6 weeks on the diet. Rat tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. The mean food intake was 20.7, 20.5, and 20.3 g/d for rats fed the diet control, 1 g tea, and 2 g tea, respectively. The mean body weight was 360, 350, and 353 g for rats fed the diet control, 1 g tea, and 2 g tea for 6 weeks, respectively. The mean body gain by week was about 35, 34, and 34.5 g for rats fed the diet control, 1 g tea, and 2 g tea, respectively. The insulin levels were 412 ± 100 pmol/l, 113 ± 28 , and 197 ± 43 for the diet control, 1 g tea, and 2 g tea treatments for 6 weeks, respectively (27). All procedures were in accord with guidelines of the National Institutes of Health and were approved by the French Army Ethical Committee.

RNA isolation and cDNA synthesis.

The procedures for RNA isolation and cDNA synthesis have been described (19). Briefly, rat liver and muscle were homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. RNA integrity and concentrations were determined using RNA 6000 Nano Assay Kit and the Bioanalyzer 2100 according to the manufacturer's instructions (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with RNA 6000 Ladder as the standards (Ambion, Inc., Austin, TX, USA). Total cDNA synthesis was performed using the ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI). The reaction mixture contained 5 μ g total RNA, 1 μ g oligo(dT)₁₅ primer (Invitrogen), 0.25 μ g random primers (Invitrogen), 500 μ M dNTPs, 5 mM MgCl₂, 2.5 μ l RNasin ribonuclease inhibitor, and 5 μ l ImProm-II reverse transcriptase in 1X ImProm-II reaction buffer in a total volume of 20 μ l.

PCR primers and TaqMan probes.

The primers and probes were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and synthesized by BioSource International, Invitrogen Corp. (Camarillo, CA, USA) or Biosearch Technologies, Inc. (Novato, CA, USA). The mRNA names,

GenBank accession numbers, amplicon sizes, and the sequences (5' to 3') of the forward primers, TaqMan probes (TET - BHQ1) and reverse primers, respectively, are described in **Table 1**. The nomenclature of genes, mRNAs, and proteins were as described (19). For example, *Glut4*, Glut4, and GLUT4 represent Glut4 gene, mRNA, and protein, respectively.

Quantitative real-time PCR assays.

Real-time PCR assays were performed using an ABI Prism 7700 real time PCR instrument (Applied Biosystems) as described (19). Briefly, the TaqMan reaction mixture (25 μ l) contained 25-50 ng of total RNA-derived cDNAs, 200-1000 nM each of the forward primer and reverse primer, and 200-280 nM of TaqMan probe, and 12.5 μ l of 2X Absolute QPCR Mix (ABgene House, Epsom, Surrey, UK). The thermal cycle conditions were as follows: 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C, followed by 40-60 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s. Fluorescence signals measured during amplification were considered positive if the fluorescence intensity was more than 20-fold greater than the standard deviation of the baseline fluorescence (28). The $\Delta\Delta C_T$ method of relative quantification was used to determine the fold change in expression (29). This was done by first normalizing the resulting threshold cycle (C_T) values of the target mRNAs to the C_T values of the internal control Rpl32 in the same samples ($\Delta C_T = C_{T\text{Target}} - C_{T\text{Rpl32}}$). It was further normalized with the samples with only the high-fructose diet but without tea supplement ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{Tea}} - \Delta C_{T\text{Diet}}$). The fold change in expression was then obtained ($2^{\Delta\Delta C_T}$) as described (19).

Statistical analyses.

Real-time PCR data were analyzed by SigmaStat 3.1 software (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA) using One Way Analysis of Variance (ANOVA). Multiple comparisons were performed with Duncan's Multiple Range Test as described (19). Values with different lower case and upper case letters displayed above the columns of the figures are significantly different at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

RESULTS

Glucose transporter family mRNAs in rat liver and muscle.

Multiple members of the glucose transporter family exist in mammals (GLUT1/SLC2A1, GLUT2/SLC2A2, GLUT3/SLC2A3, GLUT4/SLC2A4, and GLUT5/SLC2A5) (25). We examined the expression levels of the first four forms of genes in the liver and skeletal muscle of rats fed a high-fructose diet known to induce insulin resistance and oxidative stress (22). The

C_T values of the Glut family and the internal control Rpl32 mRNAs and the relative ratios of Glut family mRNAs in the liver and muscle are shown in **Table 2**. Glut2 was the major Glut mRNA in the liver and Glut4 was the major one in the muscle. In liver, the relative mRNA levels of Glut1, Glut2, Glut3, and Glut4 were 1-, 34.3-, 0.02-, and 0.01-fold, respectively. In muscle, the relative mRNA levels of Glut1, Glut2, Glut3, and Glut4 were 1-, 0.003-, 1.6-, and 294.1-fold, respectively (**Table 2**, middle column). Glut1, Glut2, Glut3, and Glut4 mRNAs in the muscle were 0.2-, 0.00002-, 21.1-, and 5042.8-fold of those in the liver, respectively (**Table 2**, right column).

Insulin signaling pathway mRNA levels in rat liver and muscle.

Numerous components exist in the insulin signal transduction pathway (26). We analyzed the mRNA levels of the following genes coding for insulin signaling pathway components (*Ins1*, *Ins2*, *Insr*, *Irs1*, *Irs2*, *Akt1*, *Grb2*, *Igf1*, *Igf2*, *Igf1r*, *Igf2r*, *Gsk3b*, *Gys1*, *Pik3cb*, *Pik3r1*, *Shc1*, *Sos1*) in liver and muscle of rats fed a high-fructose diet known to induce insulin resistance and oxidative stress (22).

The C_T values of the insulin signaling pathway family mRNAs and the internal control Rpl32 mRNAs (Table 2, left column) and the relative ratios of the insulin signaling pathway family mRNAs in the liver and muscle are shown in Table 2. *Grb2*, *Pik3cb*, *Pik3r1*, and *Shc1* mRNAs were more abundant in the liver than those in the muscle, whereas *Gys1*, *Ins1*, *Ins2*, *Igf2*, *Igf1r*, and *Sos1* mRNAs were more abundant in the muscle than those in the liver (Table 2, right column). *Akt1*, *Gsk3b*, *Insr*, *Igf1*, *Igf2r*, *Irs1*, and *Irs2* mRNA levels were less than 2-fold differences in both the liver and the muscle, whereas *Ins1*, *Ins2*, *Igf1*, and *Igf2* mRNAs were either undetectable or expressed at very low levels (Table 2, right column).

Green tea effects on glucose transporter family mRNA levels in rat liver.

Green tea (1 g solid extract/kg diet) increased Glut1 and Glut4 mRNA levels by 110 % and 160 %, respectively but did not have statistically significant effects on Glut2 or Glut3 mRNA levels in the liver (**Figure 1**). Green tea (2 g solid extract/kg diet) significantly increased Glut4 mRNA levels by 100 % but did not have statistically significant effects on Glut1, Glut2, or Glut3 mRNA levels in the liver (**Figure 1**).

Green tea effects on glucose transporter family mRNA levels in rat muscle.

Green tea (1 g solid extract/kg diet) did not significantly alter the mRNA levels of Glut1, Glut2, Glut3, or Glut4 (**Figure 2**). Green tea (2 g solid extract/kg diet) significantly increased Glut2 and Glut4 mRNA levels by 80 % and 60 % over the diet control, respectively, but did

not have statistically significant effect on Glut1 or Glut3 mRNA levels in the muscle (**Figure 2**).

Green tea effects on insulin signaling pathway family mRNA levels in rat liver.

Green tea (1 g solid extract/kg diet) increased Gsk3b and Irs2 mRNA levels by 30 % and 60 %, respectively (**Figure 3**), but did not have statistically significant effects on Akt1, Grb2, Gys1, Ins1, Ins2, Insr, Igf1r, Igf2r, Irs1, Pik3r1, Shc1, or Sos1 mRNA levels in the liver (**Figure 3** and data not shown). Green tea (2 g solid extract/kg diet) significantly increased Gsk3b and Pik3cb mRNA levels by 30% (**Figure 3**) and decreased Shc1 mRNA levels by 50 %, but did not have statistically significant effects on Akt1, Grb2, Gys1, Ins1, Ins2, Insr, Igf1r, Igf2r, Irs1, Irs2, Pik3r1, or Sos1 mRNA levels in the liver (**Figure 3** and data not shown).

Green tea effects on mRNA levels of insulin signal pathway in rat muscle.

Green tea (1 g solid extract/kg diet) increased Irs1 mRNA levels by 80 % (**Figure 4**), but did not have statistically significant effects on Akt1, Grb2, Gsk3b, Gys1, Ins1, Ins2, Insr, Igf1r, Igf2r, Irs2, Pik3cb, Pik3r1, Shc1, or Sos1 mRNA levels in the liver (**Figure 4** and data not shown). Green tea (2 g solid extract/kg diet) significantly increased Shc1 and Sos1 mRNA levels by 50 % (**Figure 4**) but did not have statistically significant effects on Akt1, Grb2, Gsk3b, Gys1, Ins1, Ins2, Insr, Igf1r, Igf2r, Irs1, Irs2, Pik3cb, or Pik3r1 mRNA levels in the liver (**Figure 4** and data not shown).

DISCUSSION

Plants have been used for the treatment of diabetes for thousands of years (7). In search for plant products for diabetic prevention and cure, a number of studies have shown that tea and common spices (cinnamon, cloves, tumeric and bay leaves) display insulin-like activity *in vitro*. We have demonstrated that cinnamon improves glucose and lipid profiles of people with type 2 diabetes (30), and that cinnamon exhibits insulin-like activity in cells, animals and people with type 2 diabetes (30-34). We further showed that cinnamon extract and polyphenols affect the expression of Ttp/Zfp36/Tis11), Insr, and glut4 in mouse 3T3-L1 adipocytes (24). Several studies also indicate that tea has insulin-potentiating activity (13, 14, 17, 23, 27, 35), however, no investigation at the molecular level was substantially performed to support these observations. In this study, we analyzed the mRNA profiles and the effects of green tea polyphenolic extracts on the expression of glucose transporter family and insulin signal transduction pathway family mRNA levels in liver and muscle of rats fed a high-fructose diet known to induce insulin resistance and oxidative stress (22).

The major finding reported in this study is that green tea polyphenolic extract increased Glut4 mRNA levels in both liver and muscle. The increases of Glut4 mRNA levels in the muscle may be physiologically significant for the following reasons: 1) Glut4 is the major Glut family mRNAs in the muscle (**Table 2**); 2) GLUT4 protein is the insulin-responsive glucose transporter in the muscle (25); 3) The amount of GLUT4 protein is decreased in obesity (36); 4) Insulin increases Glut4 mRNA and protein levels in rat fetal brown adipocytes (37, 38) and increases GLUT4 protein level in 3T3-F442A adipocytes (39)., and 5) The amount of GLUT4 protein is increased in fructose-fed rats with green tea supplementation resulting in amelioration of fructose-induced insulin resistance (23). The increases of Glut4 mRNA levels by tea extract reported here suggest a positive effect of these polyphenolic compounds on the long-term regulation of glucose transport. The significance of the increased levels of Glut1 and Glut4 mRNAs in the liver and Glut2 mRNA in the muscle is not clear because these Glut mRNAs are the minor forms in their respective tissues.

The other finding is that green tea polyphenolic extract increased Gsk3b mRNA levels in the liver. GSK3B protein is a multifunctional protein kinase and its activity is inhibited by AKT1/PKB-mediated phosphorylation at its serine residue, which is induced by insulin (40). Less GSK3 activity results in more activities of glycogen synthase and initiation factor 2B and results in stimulating glycogen and protein synthesis (40). It was also reported that GSK3B phosphorylated TTP in vitro (18), and phosphorylated TTP has less mRNA ARE-binding activity than the unphosphorylated form (41, 42). TTP is a hyperphosphorylated protein (43) with anti-inflammatory function through the down-regulation of pro-inflammatory cytokines (44, 45). TTP binds to and subsequently promotes the degradation of those mRNAs encoding pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and GM-CSF (41, 46, 47). The mRNA and protein levels of TTP are dramatically induced by nM concentrations of insulin in minutes (20, 24). Therefore, the elevated Gsk3b mRNA levels appear to be in conflict with green tea's effect on increasing insulin sensitivity (27) and anti-inflammatory activity (19). We did not pursue this further in the current study.

Green tea extract consumption also affected some of the other gene expressions involved in the insulin signaling pathway. Specifically, green tea increased Irs2 and Pik3cb but decreased Shc1 mRNA levels in the liver, and green tea increased Irs1, Shc1, and Sos1 mRNA levels in the muscle. However, green tea consumption exhibited no or minimal effects on the other mRNA levels in the liver or muscle, including Ins1, Ins2, Insr, Irs1, Irs2, Akt1, Grb2, Igf1, Igf2, Igf1r, Igf2r, Gys1, and Pik3r1 mRNAs. The small effects of green tea consumption on

mRNA levels in the insulin signaling pathway reported are in agreement with previous observations, in which it was reported that the effects of insulin on gene expression in the insulin signaling pathway are minimal in mouse 3T3-L1 adipocytes (48). The plausible reason for the small effects of green tea and insulin in insulin signal transduction pathway in rat liver and muscle as well as mouse 3T3-L1 adipocytes is probably due to the nature of insulin signal transduction mainly through protein phosphorylation. It is also possible that the effectiveness of the treatments is affected by various other factors, such as the timing, dosages, and/or the physiological status of the cells and tissues when the treatments are performed, since it was reported that green tea consumption does not have significant effects on inflammation and insulin resistance in type 2 diabetes patients (21). Additional studies are needed to determine the role of tea in the prevention and alleviation of glucose intolerance, insulin resistance, diabetes, and obesity.

In conclusion, this study describes profiles of the glucose transporter family and the insulin signaling pathway family mRNAs in the liver and muscle of rats with metabolic syndrome induced by a high-fructose diet. Green tea polyphenolic extract significantly increased the mRNA levels of Glut4 in the muscle and of Gsk3b in the liver. Green tea also increased Irs2 and Pik3cb but decreased Shc1 mRNA levels in the liver and increased Irs1, Shc1, and Sos1 mRNA levels in the muscle. However, green tea consumption exhibited no or minimal effects on the other mRNA levels in the liver or muscle, including Ins1, Ins2, Insr, Irs1, Irs2, Akt1, Grb2, Igf1, Igf2, Igf1r, Igf2r, Gys1, and Pik3r1 mRNAs. These results suggest that green tea consumption could regulate gene expression in the glucose uptake and insulin signal transduction pathway in rats fed a fructose-rich diet. These results also suggest that drinking adequate amounts of green tea may play a role in the prevention of glucose intolerance, insulin resistance, diabetes, and obesity.

ABBREVIATIONS

ANOVA: one way analysis of variance;

Akt1: thymoma viral proto-oncogene 1;

EGCG: Epigallocatechin gallate;

Glut: glucose transporter;

Grb2: growth factor receptor bound protein 2;

Gsk3b: glycogen synthase kinase 3 beta;

Gys1: glycogen synthase 1;

Igf1: insulin-like growth factor 1;

Igf1r: insulin-like growth factor I receptor;
Igf2: insulin-like growth factor 2; Igf2r:
insulin-like growth factor 2 receptor;
Ins1: insulin I;
Ins2: insulin II;
Insr: insulin receptor;
Irs1: insulin receptor substrate 1;
Irs2: insulin receptor substrate 2;
Pik3cb: phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta;
Pik3r1: phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit 1;
Shc1: Src homology 2 domain-containing transforming protein 1;
Sos1: Son of sevenless 1;
Rpl32: ribosomal protein L32;
Ttp: tristetraproline.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is part of the Scientific Cooperative Convention Agreement (# 58-1235-4N-F033) between the Human Nutrition Research Center (Beltsville, MD, USA) and the Joseph Fourier University (Grenoble, France). We thank Noella Bryden for technical assistance and Dr. Joseph F Urban Jr and Dr. Alison A Yates for critically reading the manuscript.

LITERATURE CITED

1. Dandona, P.; Aljada, A.; Bandyopadhyay, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 2004, 25, 4-7.
2. Eckel, R. H.; Grundy, S. M.; Zimmet, P. Z. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005, 365, 1415-1428.
3. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006, 444, 860-867.
4. Stumvoll, M.; Goldstein, B. J.; van Haeften, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005, 365, 1333-1346.
5. Carter, J. S.; Pugh, J. A.; Monterrosa, A. Non-insulin-dependent diabetes mellitus in minorities in the United States. *Ann. Intern. Med.* 1996, 125, 221-232.
6. Gross, L. S.; Li, L.; Ford, E. S.; Liu, S. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 774-779.

7. Gray, A. M.; Flatt, P. R. Pancreatic and extra-pancreatic effects of the traditional anti-diabetic plant, *Medicago sativa* (lucerne). *Br. J. Nutr.* 1997, 78, 325-334.
8. Dixon, R. A.; Xie, D. Y.; Sharma, S. B. Proanthocyanidins--a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* 2005, 165, 9-28.
9. Prior, R. L.; Gu, L. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry* 2005, 66, 2264-2280.
10. Yang, C. S.; Landau, J. M.; Huang, M. T.; Newmark, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 2001, 21, 381-406.
11. Kao, Y. H.; Chang, H. H.; Lee, M. J.; Chen, C. L. Tea, obesity, and diabetes. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006, 50, 188-210.
12. Wolfram, S.; Wang, Y.; Thielecke, F. Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006, 50, 176-187.
13. Anderson, R. A.; Polansky, M. M. Tea enhances insulin activity. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 7182-7186.
14. Broadhurst, C. L.; Polansky, M. M.; Anderson, R. A. Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 849-852.
15. Wu, L. Y.; Juan, C. C.; Ho, L. T.; Hsu, Y. P.; Hwang, L. S. Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague-Dawley rats. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 643-648.
16. Li, C.; Allen, A.; Kwagh, J.; Doliba, N. M.; Qin, W.; Najafi, H.; Collins, H. W.; Matschinsky, F. M.; Stanley, C. A.; Smith, T. J. Green tea polyphenols modulate insulin secretion by inhibiting glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 10214-10221.
17. Anton, S.; Melville, L.; Rena, G. Epigallocatechin gallate (EGCG) mimics insulin action on the transcription factor FOXO1a and elicits cellular responses in the presence and absence of insulin. *Cell Signal.* 2006.
18. Cao, H.; Polansky, M. M.; Blackshear, P. J.; Anderson, R. A. Insulin and cinnamon polyphenols increase the amount of insulin receptor b, glucose transporter 4, and anti-inflammatory protein tristetraprolin in mouse 3T3-L1 adipocytes [abstract]. *FASEB J* 2006, 20, A93.

19. Cao, H.; Kelly, M. A.; Kari, F.; Dawson, H. D.; Urban, J. F., Jr.; Coves, S.; Roussel, A. M.; Anderson, R. A. Green tea increases anti-inflammatory tristetraprolin and decreases pro-inflammatory tumor necrosis factor mRNA levels in rats. *J. Inflamm. (Lond)* 2007, 4, 1.
20. Lai, W. S.; Stumpo, D. J.; Blackshear, P. J. Rapid insulin-stimulated accumulation of an mRNA encoding a proline-rich protein. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 16556-16563.
21. Ryu, O. H.; Lee, J.; Lee, K. W.; Kim, H. Y.; Seo, J. A.; Kim, S. G.; Kim, N. H.; Baik, S. H.; Choi, D. S.; Choi, K. M. Effects of green tea consumption on inflammation, insulin resistance and pulse wave velocity in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2006, 71, 356-358.
22. Faure, P.; Rossini, E.; Wiernsperger, N.; Richard, M. J.; Favier, A.; Halimi, S. An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats. *Diabetes* 1999, 48, 353-357.
23. Wu, L. Y.; Juan, C. C.; Hwang, L. S.; Hsu, Y. P.; Ho, P. H.; Ho, L. T. Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model. *Eur. J. Nutr.* 2004, 43, 116-124.
24. Cao, H.; Polansky, M. M.; Anderson, R. A. Cinnamon extract and polyphenols affect the expression of tristetraprolin, insulin receptor, and glucose transporter 4 in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007, in press.
25. Shepherd, P. R.; Kahn, B. B. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1999, 341, 248-257.
26. Taha, C.; Klip, A. The insulin signaling pathway. *J. Membr. Biol.* 1999, 169, 1-12.
27. Anderson, R. A.; Hininger, I.; Coves, S.; Roussel, A. M. Tea increases insulin sensitivity and decreases oxidative stress in rats with metabolic syndrome [abstract]. 2005; p 1.3.1.
28. Dawson, H. D.; Beshah, E.; Nishi, S.; Solano-Aguilar, G.; Morimoto, M.; Zhao, A.; Madden, K. B.; Ledbetter, T. K.; Dubey, J. P.; Shea-Donohue, T.; Lunney, J. K.; Urban, J. F., Jr. Localized multigene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. *Infect. Immun.* 2005, 73, 1116-1128.
29. Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001, 25, 402-408.

30. Khan, A.; Safdar, M.; li Khan, M. M.; Khattak, K. N.; Anderson, R. A. Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003, 26, 3215-3218.
31. Anderson, R. A.; Broadhurst, C. L.; Polansky, M. M.; Schmidt, W. F.; Khan, A.; Flanagan, V. P.; Schoene, N. W.; Graves, D. J. Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 65-70.
32. Jarvill-Taylor, K. J.; Anderson, R. A.; Graves, D. J. A hydroxychalcone derived from cinnamon functions as a mimetic for insulin in 3T3-L1 adipocytes. *J. Am. Coll. Nutr.* 2001, 20, 327-336.
33. Imparl-Radosevich, J.; Deas, S.; Polansky, M. M.; Baedke, D. A.; Ingebritsen, T. S.; Anderson, R. A.; Graves, D. J. Regulation of PTP-1 and insulin receptor kinase by fractions from cinnamon: implications for cinnamon regulation of insulin signalling. *Horm. Res.* 1998, 50, 177-182.
34. Qin, B.; Nagasaki, M.; Ren, M.; Bajotto, G.; Oshida, Y.; Sato, Y. Cinnamon extract (traditional herb) potentiates in vivo insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2003, 62, 139-148.
35. Li, R. W.; Douglas, T. D.; Maiyoh, G. K.; Adeli, K.; Theriault, A. G. Green tea leaf extract improves lipid and glucose homeostasis in a fructose-fed insulin-resistant hamster model. *J. Ethnopharmacol.* 2006, 104, 24-31.
36. Garvey, W. T.; Maianu, L.; Huecksteadt, T. P.; Birnbaum, M. J.; Molina, J. M.; Ciaraldi, T. P. Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J. Clin. Invest* 1991, 87, 1072-1081.
37. Valverde, A. M.; Navarro, P.; Teruel, T.; Conejo, R.; Benito, M.; Lorenzo, M. Insulin and insulin-like growth factor I up-regulate GLUT4 gene expression in fetal brown adipocytes, in a phosphoinositide 3-kinase-dependent manner. *Biochem. J.* 1999, 337, 397-405.
38. Hernandez, R.; Teruel, T.; Lorenzo, M. Insulin and dexamethasone induce GLUT4 gene expression in foetal brown adipocytes: synergistic effect through CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *Biochem. J.* 2003, 372, 617-624.
39. Yu, Z. W.; Buren, J.; Enerback, S.; Nilsson, E.; Samuelsson, L.; Eriksson, J. W. Insulin can enhance GLUT4 gene expression in 3T3-F442A cells and this effect is mimicked by va-

nadate but counteracted by cAMP and high glucose - potential implications for insulin resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1535, 174-185.

40. Frame, S.; Cohen, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* 2001, 359, 1-16.

41. Cao, H. Expression, purification, and biochemical characterization of the antiinflammatory tristetraprolin: a zinc-dependent mRNA binding protein affected by posttranslational modifications. *Biochemistry* 2004, 43, 13724-13738.

42. Carballo, E.; Cao, H.; Lai, W. S.; Kennington, E. A.; Campbell, D.; Blackshear, P. J. Decreased sensitivity of tristetraprolin-deficient cells to p38 inhibitors suggests the involvement of tristetraprolin in the p38 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 42580-42587.

43. Cao, H.; Deterding, L. J.; Venable, J. D.; Kennington, E. A.; Yates, J. R., III; Tomer, K. B.; Blackshear, P. J. Identification of the anti-inflammatory protein tristetraprolin as a hyperphosphorylated protein by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 2006, 394, 285-297.

44. Blackshear, P. J. Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem. Soc. Trans.* 2002, 30, 945-952.

45. Anderson, P.; Phillips, K.; Stoecklin, G.; Kedersha, N. Post-transcriptional regulation of proinflammatory proteins. *J. Leukoc. Biol.* 2004, 76, 42-47.

46. Carballo, E.; Lai, W. S.; Blackshear, P. J. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* 1998, 281, 1001-1005.

47. Carballo, E.; Lai, W. S.; Blackshear, P. J. Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood* 2000, 95, 1891-1899.

48. Kim, W.; Khil, L. Y.; Clark, R.; Bok, S. H.; Kim, E. E.; Lee, S.; Jun, H. S.; Yoon, J. W. Naphthalenemethyl ester derivative of dihydroxyhydrocinnamic acid, a component of cinnamon, increases glucose disposal by enhancing translocation of glucose transporter 4. *Diabetologia* 2006, 49, 2437-2448.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Green tea effects on Glut family mRNA levels in rat liver.

Total RNAs were isolated from livers of rats with metabolic syndrome induced by a high-fructose diet and reverse transcribed into cDNAs. Twenty-five to fifty nanograms of RNA-derived cDNAs were used for quantitative real-time PCR assays. The CT method of relative quantification was used to determine the fold change in expression.

The results represent the percentage means and the standard deviations from 5-8 samples with 2-4 repetitions of each sample.

Values with different upper case and lower case letters displayed above the columns of the figure are significantly different at $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively.

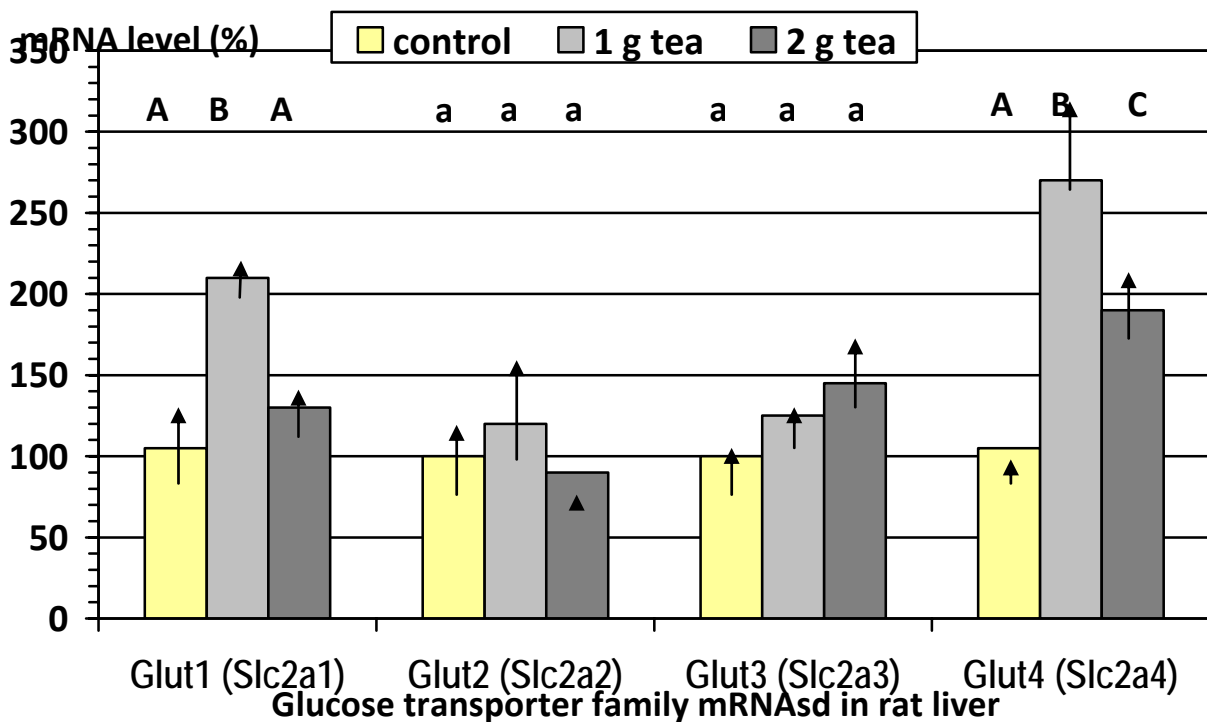


Figure 2. Green tea effects on Glut family mRNA levels in rat muscle.

RNA isolation, cDNA synthesis, real-time PCR assays, and statistical analyses were described in Fig. 1 legend.

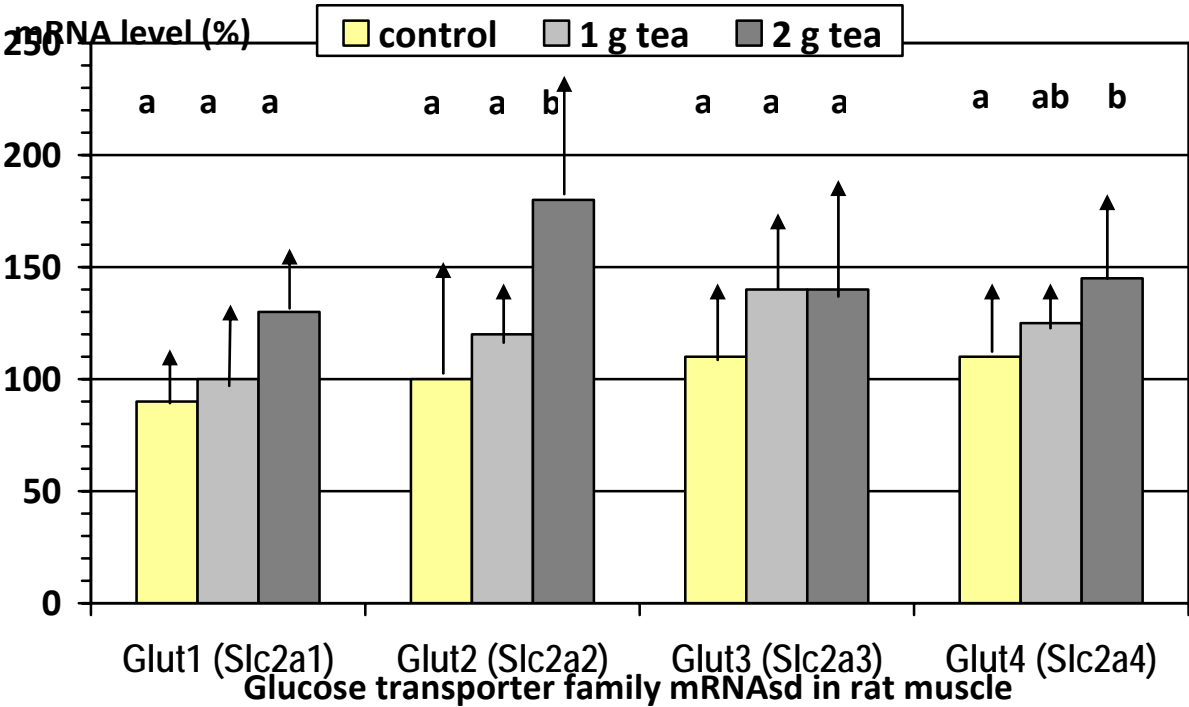


Figure 3. Green tea effects on insulin signaling pathway mRNA levels in rat liver.

RNA isolation, cDNA synthesis, real-time PCR assays, and statistical analyses were described in Fig. 1 legend.

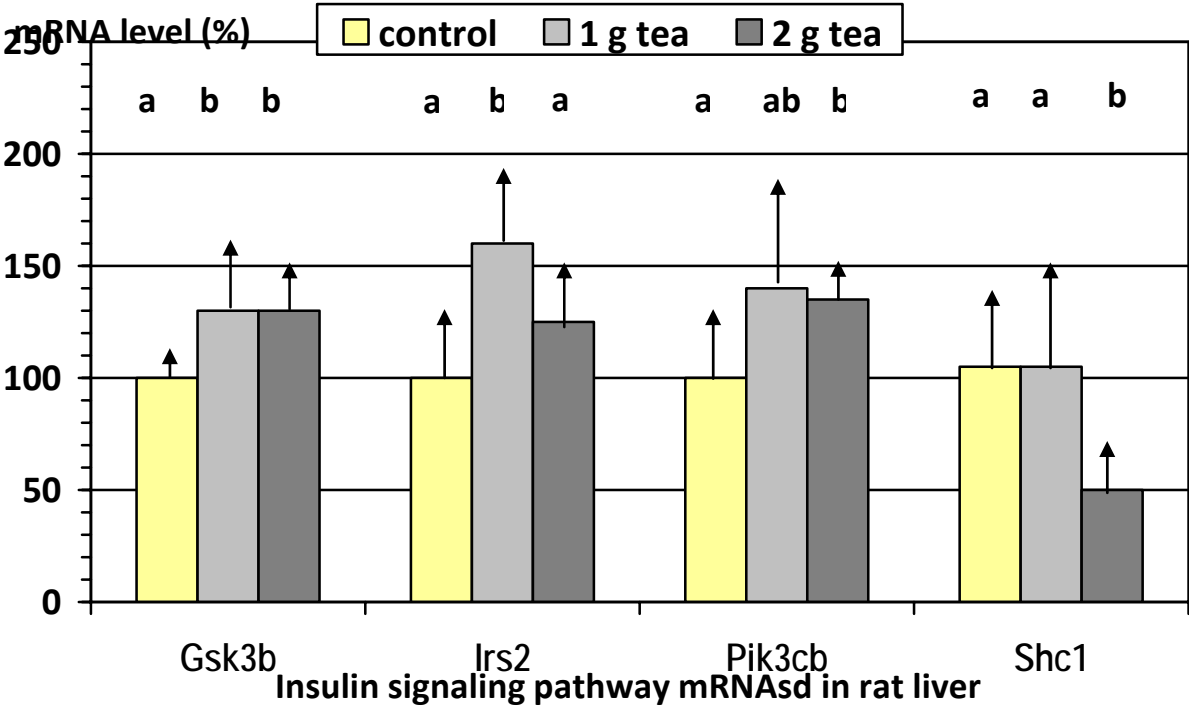


Figure 4. Green tea effects on insulin signaling pathway mRNA levels in rat muscle.

RNA isolation, cDNA synthesis, real-time PCR assays, and statistical analyses were described in Fig. 1 legend.

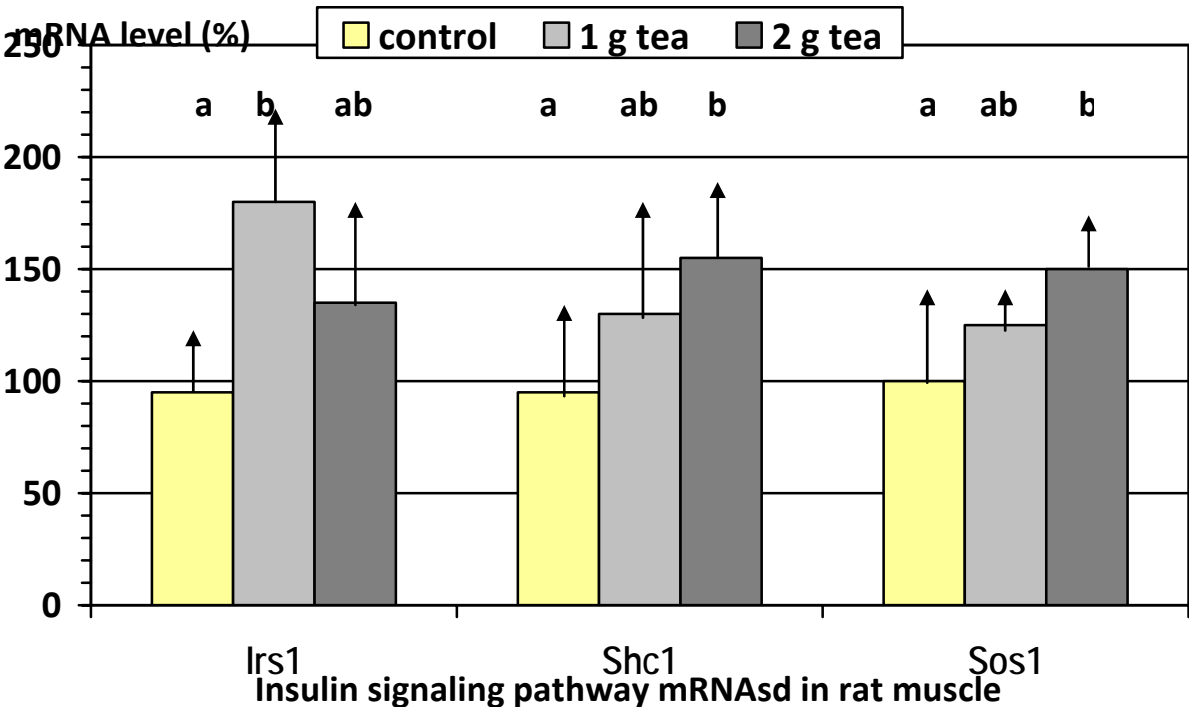


Table 1. Nucleotide sequences of real-time PCR primers and TaqMan probes

mRNA	AccessionN	Amplicon si	Forwardprimer (5' to 3')	TaqMan probe (TET - BHQ1)	Reverse primer (5' to 3')
Glut1/Slc2a1	M13979	123 bp	CGTGCTTATGGGTTTCTCCAAA	CAGGATCAGCATCTCAAAGGACTTGCCC	GACACCTCCCCACATACATG
Glut2/Slc2a2	NM_012879	80 bp	TTTGCAGTAGGCGGAATGG	TGTCCCCAAGCCACCCACCAAA	GCCAACATGGCTTTGATCCTT
Glut3/Slc2a3	NM_017102	112 bp	TGAAGCCATGAGCTTTGTCTGT	CCCCATTCCCTGGTTTATTGTGGC	GCCCTGGCTGAAGAGTTCAG
Glut4/Slc2a4	NM_012751	87 bp	CAACTGGACCTGTAACCTCATCGT	TCCGCAACATACTGGAAACCCATGC	ACGGCAAATAGAAGGAAGACGTA
Akt1	NM_033230	90 bp	TGGACTACTTGCACTCCGAGAA	CCAGCTTGAGGTCCCGGTACACCAC	TTATCTTGATATGCCCGTCCTT
Grb2	NM_030846	119 bp	GGCTTCATCCCAAGAATTACA	AGGCAGAAGAAATGCTTAGCAAACAGCG	ATCAGGAAGGCCCCGTCAT
Gsk3b	NM_032080	106 bp	TTAAGGAAGGAAAAGGTGAATCGA	AACCACCTCCTTTGCGGAGAGCTGCA	CCAAAAGCTGAAGGCTGCTG
Gys1	XM_229128	119 bp	TCCACTGTGCCTGTGTCTTCA	CTCAAGAGGAAACCAGATATTGTGACCCCCA	AGAGAACTTCTTCACATTCAGTCCATT
Ins1	NM_008386	89 bp	AGGTGGCCCGGCAGAAG	ATTGTGGATCAGTGCTGCACCAGCA	GCCTTAGTTGCAGTAGTTCTCCAGCT
Ins2	NM_008387	100 bp	TTGTGGTTCCCACTTGGTGGA	TTCTACACACCCATGTCCC GCCG	CACTTGTGGTCTCCACTTC
Insr	NM_017071	137 bp	CAAAAGCACAATCAGAGTGAGTATGAC	TCCTCCAGCTCCTTCAGGATCTGAGAGTC	ACCACGTTGTGCAGGTAATCC
Igf1	NM_184052	78 bp	GCTGTGCAATTTACTCATTG	TGGACAAAAGGCAGTTTACCCAGGCTC	TTGGACACCCAGGCAGGTAT
Igf1r	NM_010513	62 bp	CCGCTGCTGGACCACAA	TCGCTGCCAGAAAATGTGCCCA	AGGCTCGTTCGCCGACA
Igf2	NM_010514	78 bp	TGTCTACCTCTCAGGCCGTA CTT	CCCCAGATACCCCGTGGGCAA	TCCAGGTGTCATATTGGAAGAA
Igf2r	NM_010515	91 bp	GGATTCCA CTCAAGTCAAAA TAGCA	AAGACACCAGAACCAGACTCCGGTAC	ACCTCCAGAATAGATGAGGGTGAGGTC
Irs1	NM_012969	68 bp	GCCTGGAGTATTATGAGAACGAGAA	CGCTCGACTTGTGCCG CCACTT	GGGGATCGAGCGTTTGG
Irs2	AF050159	69 bp	AAGATAGCGGGTACATGCGAAT	TGGTGTGGCTCCAAGCTGTCCATG	GCAGCTTAGGGTCTGGGTTCT
Pik3cb	NM_053481	134 bp	TCCAGACCAGTATGTCCGAGAGTA	CACTCATCTGTGCGAGGCAGCCTACA	ATCTGGAGAGGGCACAGTCAA
Pik3r1	NM_013005	118 bp	CCTCTCCTTATAAAGCTCCTGGAA	CAACTCTATACAGAACACAGAGCTCCAGCAACCC	GATCACAATCAAGAAGCTGTCGTAA
Shc1	XM_216176	85 bp	GCGACGACGAGGAGAAAAGTC	CAGCTCTATCTGGGGAGGAGTAACTGAA	TGATCGGCACTCCAGCAAA
Sos1	D83014	104 bp	CAGAAGAAAGACAGTATCTACGGAACT	TTCCGGGAAGCCTTTCTTTTCAGACAAA	CTTTTCAATTCAGAAGACTTGAACAA
Rpl32	NM_172086	66 bp	AACCGAAAAGCCATTGTAGAAA	AGCAGCACAGCTGGCCATCAGAGTC	CCTGGCGTTGGGATTGG

Table 2. The mRNA levels of Glut /Slc2a family and insulin signaling pathway components in rat liver and muscle. The relative ratios of mRNA levels were calculated using the double delta CT method normalized with Rpl32 CT value as the internal control and TTP CT value or liver CT value as the calibrator.

Tissue	mRNA	Diet control Cycle of threshold (CT \pm SD)	Expression ratio (relative to Glut1) (Fold)	Expression ratio (relative to liver) (Fold)
Liver	Rpl32	18.8 \pm 0.6	Internal control	Internal control
	Glut1/Slc2a1	25.8 \pm 0.6	1.0	1.0
	Glut2/Slc2a2	20.7 \pm 1.0	34.3	1.0
	Glut3/Slc2a3	31.7 \pm 0.9	0.02	1.0
	Glut4/Slc2a4	32.1 \pm 2.2	0.01	1.0
	Akt1	22.7 \pm 0.9		1.0
	Grb2	23.0 \pm 1.8	1.0	
	Gsk3b	23.7 \pm 0.7		1.0
	Gys1	28.9 \pm 0.9		1.0
	Ins1	37.2 \pm 1.0		1.0
	Ins2	38.4 \pm 1.2		1.0
	Insr	24.0 \pm 1.4		1.0
	Igf1	0		
	Igf2	40.4 \pm 4.1		1.0
	Igf1r	26.6 \pm 0.4		1.0
	Igf2r	24.0 \pm 0.6		1.0
	Irs1	22.3 \pm 0.6		1.0
	Irs2	23.6 \pm 0.5		1.0
	Pik3cb	24.2 \pm 1.3		1.0
	Pik3r1	23.2 \pm 0.9		1.0
Shc1	27.7 \pm 3.4		1.0	
Sos1	26.8 \pm 2.0		1.0	
Muscle	Rpl32	19.5 \pm 0.2	Internal control	Internal control
	Glut1/Slc2a1	28.7 \pm 0.6	1.0	0.2
	Glut2/Slc2a2	37.2 \pm 1.4	0.003	0.00002
	Glut3/Slc2a3	28.0 \pm 0.3	1.6	21.1
	Glut4/Slc2a4	20.5 \pm 0.2	294.1	5042.8
	Akt1	23.6 \pm 0.3		0.9
	Grb2	26.2 \pm 2.9		0.2
	Gsk3b	24.2 \pm 0.9		1.1
	Gys1	27.2 \pm 4.9		5.3
	Ins1	36.6 \pm 1.2		2.5
	Ins2	36.0 \pm 0.4		8.6
	Insr	25.1 \pm 0.7		0.8
	Igf1	0		1.6
	Igf2	36.8 \pm 1.2		19.7
	Igf1r	25.0 \pm 0.6		4.9
	Igf2r	24.9 \pm 0.5		0.9
	Irs1	23.4 \pm 0.6		0.8
	Irs2	24.6 \pm 1.0		0.8
	Pik3cb	26.8 \pm 3.1		0.3
	Pik3r1	25.2 \pm 1.4		0.4
Shc1	29.9 \pm 3.8		0.4	
Sos1	24.2 \pm 1.2		9.8	

IX-2 – Polyphénols de la cannelle

Des travaux récents ont en évidence les propriétés antioxydantes de la cannelle et son intérêt dans la prévention du syndrome métabolique. Compte tenu des liens entre insulino-résistance et stress oxydant, nous avons poursuivi notre étude des sources alimentaires susceptibles d’agir à la fois sur la sensibilité à l’insuline et sur le stress oxydant.

Cette partie de la thèse s’est intéressée aux propriétés antioxydantes de la cannelle et de ses extraits aqueux. L’effet insulino-sensibilisateur de la cannelle et de ses extraits a été décrit au cours de la dernière décennie par plusieurs travaux sur modèle cellulaire (Imparl-Radosevich *et al.*, 1998) (Jarvill-Taylor *et al.*, 2001), ou animal (Quin *et al.*, 2003) (Kim *et al.*, 2006) et par des études cliniques dans des situations d’insulino-résistance (obésité, syndrome ovarien polykystiques, diabète type 2) (Khan *et al.*, 2003) (Mang *et al.*, 2006) (Ziegenfuss *et al.*, 2006) (Wang *et al.*, 2007). En revanche, et malgré l’hypothèse de l’intérêt des antioxydants pour lutter contre l’insulino-résistance (Vega-Lopez *et al.*, 2004), aucune étude n’avait décrit les effets potentiels antioxydants de la cannelle, et démontré son intérêt nutritionnel dans la prévention des situations pathologiques à haut risque de stress oxydant comme le syndrome métabolique.

Nous nous sommes donc attachés, dans cette partie de notre travail, à vérifier non seulement l’effet bénéfique de la cannelle sur la sensibilité à l’insuline et la régulation de la glycémie, mais aussi à démontrer les propriétés antioxydantes des extraits aqueux de cannelle.

IX-2-1 - Contexte de la recherche

Dans le travail sur le thé, nous avons travaillé sur une source de polyphénols largement décrite comme antioxydante, et nous avons démontré que l’effet bénéfique dans le syndrome métabolique était dû non seulement aux propriétés antioxydantes du thé, mais aussi à un effet insulino-potentialisateur (publications A et B).

Dans ce travail sur la cannelle, inversement, nous avons étudié une source de polyphénols largement décrite comme améliorant la sensibilité à l’insuline, mais non encore étudiée quant à ses propriétés antioxydantes potentielles.

Dans ce contexte, l’objectif de notre travail a été

- d’une part, de mesurer sur modèle animal de syndrome métabolique induit par le fructose, les effets de la consommation de cannelle sur les paramètres plasmatiques et tissulaires du stress oxydant (Publication C) en relation avec la régulation de la glycémie.

- d'autre part, les extraits aqueux de cannelle s'étant révélés antioxydants sur modèle animal, de vérifier dans une étude clinique d'intervention *versus* placebo ces propriétés chez des sujets en syndrome métabolique (Publication D).

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Centre de Nutrition Humaine de Beltsville, MD, USA (Dr Anderson) et l'Ohio Research Group, Wadsworth, OH (Dr Ziegenfuss).

IX-2-2 - Présentation des résultats de la publication C

Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article :

"Cinnamon decreases oxidative stress markers and fasting glycemia in rats with metabolic syndrome".

Isabelle Hininger-Favier, **Rachida Benaraba**, Mireille Osman, Richard A. Anderson and Anne Marie Roussel,

J Agric. Food Chem., 2007, submitted

Nous avons utilisé le même modèle animal de syndrome métabolique que celui précédemment décrit et validé dans le laboratoire. Dans ce modèle, les signes biologiques du syndrome métabolique sont induits par le régime comportant 65 % de fructose (Busserolles *et al.*, 2003 a).

4 groupes de 10 rats Wistar males au sevrage ont reçu pendant 8 semaines les différents régimes. Deux doses de cannelle ont été testées : 2 g et 20 g d'extraits aqueux/kg de régime. Ces doses ont été choisies pour avoir chez le rat hypertendu entraîné des effets bénéfiques sur l'hypertension et la sensibilité à l'insuline (Preuss *et al.*, 2006).

Au début de la 9^{ème} semaine, les animaux ont été sacrifiés, et les paramètres du stress oxydant dans le plasma, les adipocytes et le foie ont été mesurés, ainsi que la glycémie.

Dans les deux groupes de rats dont le régime contenait de la cannelle, la glycémie était significativement diminuée, et ramenée à un niveau comparable à celui des animaux en régime contrôle (Tableau VIII). Nous n'avons pas observé d'effet hypotriglycéridémiant contrairement à ce que nous avons observé lorsque les régimes étaient riches en thé.

La baisse significative de la glycémie confirme les propriétés régulatrices sur le système insuline/glucose des extraits aqueux de cannelle. Cet effet est décrit chez le rat en syndrome métabolique (Qin *et al.*, 2004) et chez la souris diabétique db/db (Kim *et al.*, 2006). L'effet régulateur de la glycémie serait dû à des polymères de type proanthocyanidine A, isolés et testés *in vitro* (Anderson *et al.*, 2004 a). Cependant, d'autres composés de la cannelle comme l'acide p-méthoxycinnamique pourraient également participer à l'effet potentialisateur de l'insuline

comme le rapportent Adisakwattana *et al.*, (2005). Le mécanisme de l'effet insulino potentialisateur de la cannelle, comme le rapportent récemment Cao *et al.* (2007 b), passe par l'activation des récepteurs à l'insuline et des transporteurs du Glut 4, action couplée avec un effet inflammatoire dû à la régulation de l'expression des gènes de certaines protéines impliquées dans l'inflammation.

Tableau VIII: Effet de la consommation de cannelle sur la glycémie et la triglycéridémie des rats

	Contrôle	Régime fructose (FD)	FD+2g cannelle /kg régime	FD+20g cannelle /kg régime
Glycémie mmol/L	7.6±0.4 ^a	12.58± 1.60 ^b	10.05± 3.08 ^a	9.91±1.54 ^a
Triglycéridémie g/L	0.48±0.06 ^a	1.79±0.69 ^b	1.73±0.52 ^b	1.37±0.93 ^b

Les valeurs ne partageant pas la même lettre sont significativement différentes p<0.05.

En ce qui concerne l'effet antioxydant (Tableau IX), il semble dépendant de la dose présente dans le régime, contrairement à l'effet régulateur de la glycémie, et il est retrouvé dans le plasma et le foie, mais non dans le tissu adipeux. Dans le groupe d'animaux recevant un régime à 20 g de cinnulin PF/kg de régimes, les effets antioxydants sont significatifs sur la lipoperoxydation, les dommages oxydatifs aux ADN, l'oxydation des groupements SH, ainsi que le pouvoir antioxydant total du plasma.

Table IX: Effets de la consommation de cannelle sur les marqueurs du stress oxydant

<u>Marqueurs plasmatiques</u>	Groupe I Régime Fructose (FD)	Groupe II : FD + 2g cannelle/kg régime	Group III : FD + 20g cannelle /kg régime
TBAR's ,µmol/L	4.80 ± 0.21 ^a	4.66 ± 0.52 ^a (<i>p</i> <0.27)	4.45 ± 0.45 ^{b*}
SH groupes, µmol/L	5.4 ± 0.2 ^a	6.0 ± 0.5 ^b	6.1 ± 0.6 ^{b*}
Dommages ADN ¹ , Comet (TEM)	5.04± 1.68 ^a	4.57 ± 0.87 ^a (<i>p</i> <0.27)	3.37 ± 0.15 ^{b*}
FRAP	249.8 ± 56.2 ^a	338.8±143.6 ^a (<i>p</i> <0.11)	375.1 ± 76.1 ^{b*}

**Les valeurs ne partageant pas la même lettre sont significativement différentes p<0.05.*

¹ unités arbitraires

En revanche, dans le foie et le tissu adipeux, seule la peroxydation lipidique est diminuée, et les groupements SH ne sont pas protégés de l'oxydation (**Tableau X**).

Tableau X : Effets de la consommation de cannelle sur les marqueurs de stress oxydant dans le foie et l'adipocyte

Paramètres	Group I Régime Fructose (FD)	Group II FD + 2g cannelle/kg	Group III FD + 20g cannelle/kg
TBAR's foie, μmol/g prot	0.40 ± 0.02 ^a	0.39 ± 0.08 ^a	0.35 ± 0.02 ^{b*}
groupes SH foie, μmol/g prot	62.7 ± 3.9 ^a	57.9 ± 3.9 ^a	65.1 ± 5.5 ^a
AdipocyteTBAR's, μmol/g prot	0,34± 0,06 ^a	0,34± 0,15 ^a	0,26 ± 0,04 ^{b*}
Adipocyte groupes SH, μmol/g prot	71,21± 11,86 ^a	71,5-± 14,06 ^a	71,4 ± 11,06 ^a

**Les valeurs ne partageant pas la même lettre sont significativement différentes p<0.05.*

Ces résultats suggèrent qu'un apport d'extraits de cannelle dans l'alimentation de sujets à stress oxydant accru pourrait participer à une prévention des complications oxydatives du diabète et des maladies cardiovasculaires, complications fréquentes dans le syndrome métabolique (Govindarajan *et al.*, 2005). Le mécanisme d'action proposé par Cao *et al.*, (2007b) associe l'effet potentialisateur de l'insuline et l'effet antiinflammatoire. Cette hypothèse est tentante à la lumière des interactions entre syndrome métabolique et inflammation (Dandona *et al.*, 2005). Nos résultats complètent ce schéma en y intégrant le rôle antioxydant.

IX-2-3 - Publication C

Cinnamon decreases oxidative stress markers and fasting glycemia in an animal model of the metabolic syndrome, the fructose-fed rat.

Isabelle Hininger-Favier^{1,2}, **Rachida Benaraba**^{1,2}, Mireille Osman^{1,2} Richard A Anderson³ and Anne-Marie Roussel^{1,2}

¹ INSERM, U884, Grenoble, F-38000, France

² LBFA, Université Joseph Fourier, Grenoble I, F-38041, France

³ Nutrient Requirements and Functions Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, Beltsville, MD, USA;

J Agric Food Chem., 2007, submitted

Acknowledgement

We are grateful to Integriy Nutraceuticals, Sarasota, USA for supporting this work by a Research grant.

Corresponding author: AM Roussel, Laboratoire LBFA– Université Joseph Fourier, 38700, Grenoble, France / tél : (+33) (0)4 76 63 71 31 ; Fax : (+33) (0)4 76 63 71 80 : email: Anne-Marie.Roussel@ujf-grenoble.fr
Running title: cinnamon and oxidative stress in metabolic syndrome

ABSTRACT

Uncontrolled free radical production due to insulin resistance might be a unifying mechanism underlying the development of co-morbidities in people with metabolic syndrome. Cinnamon polyphenols have been reported to improve insulin sensitivity. They could also act as antioxidant and, therefore, act in preventing oxidative pathologies associated to the metabolic syndrome such as diabetes and cardiovascular diseases. We aimed to determine the effects of aqueous extracts of cinnamon consumption on oxidative stress in the metabolic syndrome, using fructose-fed diet rats as an animal model. Wistar rats, 10 per group, received a high fructose diet (FD) for 8 weeks or FD plus either 2g or 20 g of aqueous cinnamon extracts (Cinnulin PF®, Integrity Nutraceuticals, Sarasota, FL)/kg diet. Signs of the metabolic syndrome (hyperglycemia, hypertriglyceridemia) were developed in rats receiving the FD diet compared to those of a control group. Rats receiving added aqueous cinnamon extracts/kg diet exhibited a significant decrease of glycemia. In parallel, oxidative stress was decreased. Significantly lowered plasma lipid peroxidation (TBAR's), Ferric Reducing Ability Power (FRAP) and DNA oxidative damage (comet) were also measured. In liver and adipocytes, TBAR's levels were lowered but SH groups were not enhanced by cinnamon containing diets. The strongest antioxidant effects were observed in animals fed FD plus 20g aqueous cinnamon extracts/kg diet compared to rats fed FD plus 2g aqueous cinnamon extracts (Cinnulin PF®)/kg diet. In conclusion, addition of aqueous cinnamon extracts (Cinnulin PF®) in animals with the metabolic syndrome led to beneficial effects on oxidative stress markers and glycemia indicating that cinnamon, as insulin potentiating factor but also as antioxidant, might be of benefit for people at risk of metabolic syndrome and diabetes.

Key words : cinnamon, oxidative stress, fructose rich diet, metabolic syndrome.

INTRODUCTION

Oxidative stress is presently accepted as a likely causative factor in the development of insulin resistance which is present in metabolic syndrome (Fujita *et al.*, 2006) and plays an important role in the development of diabetes and cardiovascular diseases in people with metabolic syndrome (Yu *et Lyons*, 2005). Conversely, insulin resistance is a leading cause of oxidative stress. Hyperglycemia causes auto-oxidation of glucose, glycation of proteins, and the activa-

tion of polyol metabolism (Robertson 2004). These changes accelerate the generation of reactive oxygen species (ROS) and increase oxidative modifications of lipids and proteins (Osawa and Kato, 2005). The mechanisms leading to the insulin cascade down-regulation in oxidized cells involve increased serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS1), impaired insulin-stimulated redistribution of IRS1 and phosphatidylinositol-kinase between cytosol and low-density microsomal fraction followed by a reduced protein kinase-B phosphorylation and GLUT4 translocation to the plasma membrane. In addition, prolonged exposure to ROS affects transcription of glucose transporters, whereas the level of GLUT1 is increased, GLUT4 level is reduced (Bloch-Damti and Bashan, 2005) Thus, uncontrolled free radical production might be a unifying mechanism underlying the development of comorbidities in people with metabolic syndrome. Many polyphenols in foods are potent antioxidants and they have been linked with the hypothesis that their redox activities may confer specific health benefits (Scalbert et al., 2005). Polyphenols from cinnamon could be of special interest in the metabolic syndrome in protection of oxidative damage. Compounds found in cinnamon have insulin potentiating properties (Khan et al.,1990). Water soluble compounds found in cinnamon potentiate insulin activity (Broadhurst et al., 2000). The insulin potentiating activity was reported to be present in the aqueous fraction (Anderson et al., 2004). Therefore, given the link between insulin resistance and oxidative stress in the metabolic syndrome and the potential insulin-enhancing activity of cinnamon polyphenols, the aim of this study was to investigate, using an animal model of the metabolic syndrome, the effects of aqueous extracts of cinnamon on plasma , liver and adipocytes oxidative stress parameters.

MATERIALS AND METHODS

Diets:

The diets were purchased from SAFE, 89290 Augis, France. A fructose-rich (65 %) diet (FD) was fed to rats to induce the metabolic syndrome. The control group received a standard Purina chow. The synthetic FD diet contained in g/kg casein, 200, fructose, 650, corn oil, 50, alphacel, 50, DL methionine, 3, choline bitartrate, 2, AIN-76 mineral mix, 35 and AIN 76A vitamin mix, 10 (Busserolles et al., 2003). The cinnamon extracts (Cinnulin PF®), were obtained from Integrity Nutraceuticals, Sarasota , FL,USA.

Animals

Forty male Wistar rats (Charles River, L'Arbresle, France), 6 weeks old, weighing roughly 150 g, were housed in wire-bottomed cages in a temperature controlled room (22°C) with a 12

h light / 12 h dark cycle. The rats were maintained and handled in accord with the Guide for the Care and Use of Laboratory Rats (NIH 1985). All rats were adapted and fed a standard Purina chow for one week. They were, then, randomly divided in four groups of ten rats. FD Group received, at libitum, for 8 weeks, the fructose-rich diet (FD). Two other groups received the same diet for 8 weeks but containing either 2 g or 20 g cinnamon (Cinnulin PF®) / kg diet. The control group received a standard Purina chow for 8 weeks. Rats had unrestricted access to food and water.

Blood and tissue sampling

After overnight food deprivation, rats were weighed and then anesthetized with sodium pentobarbital intraperitoneally. Blood was collected by heart puncture in heparinized tubes protected from light and centrifuged at room temperature for 10 min at 3000 g. Plasma was immediately isolated, aliquoted, stored at -80°C and analyzed within 6 months. Immediately after blood collection, the rats were killed and liver and adipocytes were removed, weighed, frozen in liquid nitrogen and stored until analysis. 500 mg of tissue sample were extracted in buffer (10 mmol/L Tris-NaOH, 1 mmol/L DPTA, 1 mmol.LLPMSF, pH = 7.4) and centrifuged at 3000 g and 4°C for 10 min.

For the comet assay and DNA damage determinations, total blood was stored as described in Hininger et al., (2004). 500 μl of blood was stabilized with 500 μl of a 20/80 (v/v) mixture of dimethylsulfoxide (DMSO) and RPMI 1640 cell culture medium. Aliquots of this mixture were progressively frozen to -80°C by use of cryopreservation vessels (Bicell, Fisher Bioblock Scientific, Lyon, France) in a -80°C freezer overnight. After one night, samples were transferred from the cryopreservation vessels to storage at -80°C until analyses within 4 months.

BIOLOGICAL PARAMETERS

Plasma Glucose, Triglycerides

Plasma glucose and triglycerides were assessed, as routine laboratory analyses, by enzymatic and colorimetric methods on Roche/Hitachi modular P.

Lipid oxidation

Plasma and tissular (liver, adipocyte) TBAR's concentrations were assessed as described by Richard et al., 1992

Thiol groups

Plasma and tissular (liver, adipocyte) SH groups were assayed as described by Faure et Lafond (1995). The calibration was obtained from a stock solution of 100 mM N-acetyl cysteine (NAC) in the range of 0.125 to 1 mM. Standards and plasma samples were diluted in phosphate buffer 0.05 M, EDTA 1 mM, pH 8 and DTNB, 2.5 mM, and absorbance measured at 412 nm.

Blood DNA damages

The evaluation of DNA damage was achieved by the comet assay (single-cell gel electrophoresis) on total blood following Hininger et al., (2004). Results were expressed as tail moment (TEM). Three samples per animals were assayed with 50 cells/sample. The mean of three determinations were calculated for each rat.

FRAP (Ferric Reducing Ability Power)

Plasma antioxidant status was evaluated using ferric reducing ability power (FRAP) assay. The FRAP assay uses antioxidants as reductants in a redox-linked colorimetric method. In this assay, at low pH, a ferric-tripyridyltriazine (Fe^{III} -TPTZ) complex is reduced to the ferrous form, which is blue and monitored by measuring the change in absorption at 593 nm. The change in absorbance is directly proportional to the reducing power of the electron-donating antioxidants present in plasma. The absorbance change is translated into a FRAP value (in $\mu\text{mol/l}$) by relating the change of absorbance at 593 nm of test sample to that of a standard solution of known FRAP value (Benzie and Strain, 1996)

Statistical analyses

Statistical analyses of the data were performed by analysis of variance. Individual mean comparisons were identified with Duncan's Multiple Range Test (SAS Institute, Cary, NC). Values were expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Food intake and body weight

Cinnamon added to the FD diet did not change food intake and mean body weights at sacrifice were not statistically different between the 4 groups.

Plasma triglycerides, glucose (table I)

Rats receiving the fructose rich diet (FD group) developed signs of the metabolic syndrome. Plasma glucose, and triglyceride concentrations were significantly ($p < 0.05$) higher than in

control group. Addition of (Cinnulin PF®), as 20g/kg diet to the FD diet lowered significantly plasma fasting glucose ($p < 0.001$) compared with FD group. The decrease of triglycerides was not significant ($p < 0,1$). Changes were observed in animals receiving 20g (Cinnulin PF®) /Kg of diet but not 2g/kg of diet.

Oxidative stress markers:

As shown in Table II, we measured an increased lipid peroxidation measured by plasma TBAR's in FD rats compared with the control group ($p < 0.05$). FD rats receiving added cinnamon (Cinnulin PF®) exhibited increased FRAP ($p < 0.05$) and lowered plasma TBAR's concentrations ($p < 0.05$) indicating a protective antioxidant effect of the diet. DNA oxidative damages, measured by the comet assay, were also significantly decreased. At a lesser extent, and not significantly ($p < 0,09$), plasma SH groups increased. In liver and adipocytes, no significant changes in SH group levels were observed but TBAR's concentrations were lower in groups receiving cinnamon diet than in FD group.

The beneficial effects of cinnamon on oxidative stress parameters were dose-dependant as observed only with 20 g cinnamon aqueous extracts / kg diet and not with 2g cinnamon aqueous extracts/kg diet cinnamon extracts (Table III).

DISCUSSION

Compounds found in cinnamon have insulin potentiating properties and may be involved in the alleviation of the signs and symptoms of diabetes and cardiovascular disease related to insulin resistance (Khan et al., 2003). Bioactivity relating to insulin function is present in the water-soluble material (Khan et al., 1990) (Broadhurst et al., 2000) (Imparl-Radosevich et al., 1998) (Jarvill-Taylor et al., 2001) and have been identified as type A procyanidin polymers (Anderson et al., 2004). Cinnamon extract fed to animals consuming the high fructose diet prevented the development of the metabolic syndrome (Qin and al., 2004). In addition, circulating insulin levels increased in the animals receiving cinnamon and insulin release was also higher in an insulin secreting cell line (Verspohl et al., 2005).

Given these findings, we hypothesized that polyphenolic polymers with insulin-like biological activity that we have isolated and identified in cinnamon (Cinnulin PF®), could both improve plasma fasting glucose and oxidative stress markers in the metabolic syndrome. Therefore, the aim of this study was to investigate, in an animal model of the metabolic syndrome, the effects of 8 week supplementation of cinnamon aqueous extract (Cinnulin PF®) on plasma and tissular oxidative stress parameters and fasting glycemia.

In animal fed the fructose rich diet for 8 weeks, plasma glucose, and triglyceride concentrations were significantly ($p < 0.05$) higher than in control group. This data agrees with previous reports indicating that a diet containing more than 60% fructose leads to decreased insulin sensitivity and hypertriglyceridemia (Thresher *et al.*, 2000) (Busserolles *et al.*, 2003). (Basciano *et al.*, 2005). We also measured higher concentrations of TBAR's in FD rats than in control group. Several studies reported an increased oxidative stress, monitored by higher levels of lipid peroxydes and decreased antioxidant enzymatic defenses (Armutcu *et al.*, 2005 ; Srividhya *et Anuradha*, 2002 ; Thirunavukkarasu *et Anuradha*, 2004).

When cinnamon aqueous extracts were added to the diet, glycemia was significantly decreased. This data is in agreement with previous observations. In rats fed a control diet, the administration of aqueous extracts of cinnamon improved glucose metabolism and potentiated the action of insulin (Qin *et al.*, 2003). After 3 weeks of oral administration of an aqueous cinnamon extract, 30 and 300 mg kg/body weight, there was significantly greater glucose utilization monitored during euglycemic clamp studies. In this work, skeletal muscle insulin-stimulated insulin receptor- β and IRS-1 tyrosine phosphorylation levels and the IRS-1/PI 3-kinase ratio were also increased. These results suggested that increased glucose uptake was due to enhancing of the insulin-signaling pathway. In rats fed a high fructose diet to simulate the metabolic syndrome, cinnamon extract, 300 mg/kg/d, also improved in vivo glucose utilization monitored using euglycemic clamp studies compared with values for the control animals (Qin *et al.*, 2004). In patients with poor glycemic control, cinnamon extracts have been also reported to have beneficial effects in reducing fasting plasma glucose (Wang *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2003).

The improvement of impaired fasting glycemia is predictive of health benefits of cinnamon since elevated fasting glucose is a leading cause of oxidative stress and plasma glucose levels plays a role in determining oxidative status (Hayden and Tyagi, 2004).Hyperglycemia causes the auto-oxidation of glucose, glycation of proteins, and the activation of polyol metabolism (Robertson 2004). These changes accelerate the generation of reactive oxygen species (ROS) and increase oxidative modifications of lipids and proteins (Osawa and Kato 2005). Poor glycemic control is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation in humans and an important factor in generation of protein oxidation (Ahmed *et al.*, 2005).

In this study, compounds found in cinnamon not only improve glycemia but also function as antioxidants. This is very important since insulin function and antioxidant status are closely linked. In cinnamon group, the decrease of fasting glycemia was associated with the antioxi-

dant effects of cinnamon supplementation assessed by the determination of plasma TBAR's, SH groups, FRAP and DNA oxidative damages. These data are consistent considering the link between oxidative stress and impaired glycemia. Plasma TBAR's levels were reduced, indicating decreased lipid peroxidation, while plasma SH groups were increased, indicating a protection of SH groups against oxidation. In parallel, the FRAP, which is a measure of the total antioxidant capacity of plasma, was increased thereby providing a contributory factor to the protective effects of cinnamon supplementation.

The insulin like effects of cinnamon extracts that lead to the improvement of impaired glycemia may be involved in the biochemical mechanisms underlying the antioxidant effects of the cinnamon supplementation, given the hyperglycemia-induced free radical production,. In addition, polyphenols act as reactive oxygen and nitrogen species scavengers, redox-active transition metal chelators and enzyme modulators (Rice-Evans, 1996) and a direct scavenging effect of cinnamon polyphenols as suggested by the increased FRAP in cinnamon group cannot be ruled out.

People with metabolic syndrome or diabetes have both decreased insulin sensitivity and decreased antioxidant status and, therefore the antioxidant and insulin potentiating effect of cinnamon should lead to decreased risk factors associated with diabetes and cardiovascular diseases. The antioxidant effects of cinnamon might also favorably impact hormone signaling via adipokine cross-talk and may help explain the beneficial effects of cinnamon on body composition (Ziegenfuss et al.,2006). Chrysohoou et al.(2006) recently reported an inverse relationship between body fat and antioxidant capacity. It is therefore possible that the observed improvements in fasting blood glucose, as well as plasma antioxidant status could be responsible, at least in part, for cinnamon's beneficial effects on body composition and features of the metabolic syndrome.

In summary, compounds found in cinnamon not only improve fasting glycemia as recently reported by others, but also function as antioxidants. These data supports the hypothesis that the inclusion of cinnamon extracts in the diet by lowering oxidative stress and decreasing impaired fasting glycemia, could reduce risk factors of diabetes and cardiovascular disease in people with metabolic syndrome or diabetes who exhibit both decreased insulin sensitivity and decreased antioxidant status.

REFERENCE LIST

- Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Howell SK, Thornalley PJ, Beisswenger PJ: Glycated and oxidized protein degradation products are indicators of fasting and postprandial hyperglycemia in diabetes. *Diabetes Care* 28: 2465-2471, 2005
- Anderson RA, Broadhurst CL, Polansky MM, Schmidt WF, Khan A, Flanagan VP, Schoene NW, Graves DJ. 2004. Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity. *J Agric Food Chem* 52:65-70.
- Armutcu F., Coskun O., Gürel A., Kanter M, Can M., Ucar F., Unalakak M. (2005). Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clin Biochem.* Jun;38(6)540-7.
- Basciano, H., Federico, L. and Adeli, K. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* 2, 5.
- Benzie IF, Strain JJ: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76, 1996
- Bloch-Damti A, Bashan N: Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 7: 1553-1567, 2005
- Broadhurst CL, Polansky MM, Anderson RA. 2000. Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. *J Agric Food Chem* 48:849-852.
- Busserolles J, Gueux E, Rock E, Demigne C, Mazur A, Rayssiguier Y: Oligofructose protects against the hypertriglyceridemic and pro-oxidative effects of a high fructose diet in rats. *J. Nutr.*133:1903-1908, 2003.
- Cao H, Polansky MM, Anderson RA. 2007. Cinnamon extract and polyphenols affect the expression of tristetraprolin, insulin receptor, and glucose transporter 4 in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem Biophys* 459:214-222.
- Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas I, Papademetriou L, Economou M, Stefanadis C. 2006. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: The ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* August 8; [Epub ahead of print].

- Couillard C, Ruel G, Archer WR, Pomerleau S, Bergeron J, Couture P, Lamarche B, Bergeron N. 2005. Circulating levels of oxidative stress markers and endothelial adhesion molecules in men with abdominal obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6454-6459.
- Faure, P.; Lafond, J. L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier, A. E.; Cadet, J.; Kalnyanaraman, M.; Fontecave M. and Pierre J. L., Eds. *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Basel, Boston, Berlin: Birkäuser Press; 1995:237-48
- Fujita K, Nishizawa H, Funahashi T, Shimomura I, Shimabukuro M: Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. *Circ J* 70: 1437-1442, 2006.
- Hayden MR, Tyagi SC. 2004. Neural redox stress and remodeling in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and diabetic neuropathy. *Med Sci Monit* 10:RA291-RA307.
- Hininger I, Chollat-Namy A, Sauvaigo S, Osman M, Faure H, Cadet J, Favier A, Roussel AM: Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. *Mutat Res* 558:75-80, 2004.
- Imparl-Radosevich J, Deas S, Polansky MM, Baedke DA, Ingebritsen TS, Anderson RA, Graves DJ. 1998. Regulation of PTP-1 and insulin receptor kinase by fractions from cinnamon: implications for cinnamon regulation of insulin signalling. *Horm Res* 50:177-182.
- Jarvill-Taylor KJ, Anderson RA, Graves DJ. 2001. A hydroxychalcone derived from cinnamon functions as a mimetic for insulin in 3T3-L1 adipocytes. *J Am Coll Nutr* 20:327-336.
- Khan A, Bryden NA, Polansky MM, Anderson RA. 1990. Insulin potentiating factor and chromium content of selected foods and spices. *Biol Trace Elem Res* 24:183-188.
- Khan A, Safdar M, Ali Khan MM, Khattak KN, Anderson RA. 2003. Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26:3215-3218.
- Kim SH, Hyun SH, Choung SY. 2006. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *J Ethnopharmacol* 104:119-123.
- Mang B, Wolters M, Schmitt B, Kelb K, Lichtinghagen R, Stichtenoth DO, Hahn A. 2006. Effects of a cinnamon extract on plasma glucose, HbA_{1c}, and serum lipids in diabetes mellitus type 2. *Eur J Clin Invest* 36:340-344.

Martin JA, Brooks DA, Prieto L, Gonzalez R, Torrado A, Rojo I, Lopez de UB, Lamas C, Ferritto R, Dolores Martin-Ortega M, Agejas J, Parra F, Rizzo JR, Rhodes GA, Robey RL, Alt CA, Wendel SR, Zhang TY, Reifel-Miller A, Montrose-Rafizadeh C, Brozinick JT, Hawkins E, Misener EA, Briere DA, Ardecky R, Fraser JD, Warshawsky AM. 2005. 2-Alkoxydihydrocinnamates as PPAR agonists. Activity modulation by the incorporation of phenoxy substituents. *Bioorg Med Chem Lett* 15:51-55.

Osawa T, Kato Y. 2005. Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Ann N Y Acad Sci* 1043:440-51.:440-451.

Preuss HG, Echard B, Polansky MM, Anderson RA. 2006. Whole cinnamon and aqueous extracts ameliorate sucrose-induced blood pressure elevations in spontaneously hypertensive rats. *J Am Coll Nutr* 25:144-150.

Qin B, Nagasaki M, Ren M, Bajotto G, Oshida Y, Sato Y. 2003. Cinnamon extract (traditional herb) potentiates in vivo insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes Res Clin Pract* 62:139-148.

Qin B, Nagasaki M, Ren M, Bajotto G, Oshida Y, Sato Y. 2004. Cinnamon extract prevents the insulin resistance induced by a high-fructose diet. *Horm Metab Res* 36:119-125.

Rice-Evans, C. A., Miller, N.J., and GP. (1997). Antioxydant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2, 152-159

Richard, M. J., Portal, B., Meo, J., Coudray, C., Hadjian, A. and Favier, A. (1992). Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem*, 38, 704-9.

Robertson RP. 2004. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 279:42351-42354.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L: Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*45:287-306, 2005

Srividhya, S. and Anuradha, C. V. (2002). Metformin improves liver antioxidant potential in rats fed a high-fructose diet. *Asia Pac J Clin Nutr* 11, 319-22
Stump CS, Clark SE, Sowers JR: Oxidative stress in insulin-resistant conditions: cardiovascular implications. *Treat. Endocrinol.* 4:343-351, 2005.

Thresher, J. S., Podolin, D. A., Wei, Y., Mazzeo, R. S. and Pagliassotti, M. J. (2000). Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R1334-40.

Vanschoonbeek K, Thomassen BJ, Senden JM, Wodzig WK, van Loon LJ. 2006. Cinnamon supplementation does not improve glycemic control in postmenopausal type 2 diabetes patients. *J Nutr* 136:977-980.

Verspohl EJ, Bauer K, Neddermann E. 2005. Antidiabetic effect of *Cinnamomum cassia* and *Cinnamomum zeylanicum* in vivo and in vitro. *Phytother Res* 19:203-206.

Wang JG, Anderson RA, Chu MC, Sauer MV, Guarnaccia MM, Lobo RA. 2007. The effect of cinnamon extract on insulin resistance parameters in polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Fertil Steril*, Feb 12 [Epub ahead of print].

Yu Y, Lyons TJ. 2005. A lethal tetrad in diabetes: hyperglycemia, dyslipidemia, oxidative stress, and endothelial dysfunction. *Am J Med Sci* 330:227-232.

Ziegenfuss TN, Hofheins JE, Mendel RW, Landis J, Anderson R. 2006. Effects of a Water-Soluble Cinnamon Extract on Body Composition and Features of the Metabolic Syndrome in Pre-Diabetic Men and Women. *Journal of Sport Nutrition* 3:45-53.

Table I : Effect of cinnamon consumption on Glucose and Triglycerides in rats with FD-induced metabolic syndrome

	Control	FD	FD +2g cinnamon/kg diet	FD +20g cinnamon/kg diet
Body weight g	23.2 ± 0.8	22.5±0.9	21.1±1.2	22.5±1.3
Glycemia mmol/L	7.6±0.4 ^a	12.58± 1.60 ^b	10.05± 3.08 ^a	9.91±1.54 ^a
Triglyceridemia g/L	0.48±0.06 ^a	1.79±0.69 ^b	1.73±0.52 ^b	1.37±0.93 ^b

Numbers in each row with different superscripts are significantly different at p<0.05.

Table II: Effects of cinnamon consumption on plasma oxidative stress parameters

Plasma parameters	Group I Fructose diet (FD)	Group II : FD + 2g cinnamon/kg diet	Group III : FD + 20g cinnamon/kg diet
TBAR's , $\mu\text{mol/L}$	4.80 ± 0.21^a	4.66 ± 0.52^a ($p < 0.27$)	4.45 ± 0.45^b
SH groups, $\mu\text{mol/L}$	5.4 ± 0.2^a	6.0 ± 0.5^b	6.1 ± 0.6^b
DNA Damage ¹ , Comet (TEM)	5.04 ± 1.68^a	4.57 ± 0.87^a ($p < 0.27$)	3.37 ± 0.15^b
FRAP	249.8 ± 56.2^a	338.8 ± 143.6^a ($p < 0.11$)	375.1 ± 76.1^b

Numbers in each row with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

¹ arbitrary units

Table III: Effects of cinnamon consumption on oxidative stress parameters in liver and adipocytes

Parameters	Group I Fructose diet (FD)	Group II : FD + 2g cinnamon/kg	Group III : FD + 20g cinnamon/kg
LiverTBAR's, $\mu\text{mol/g}$ prot	0.40 ± 0.02^a	0.39 ± 0.08^a	0.35 ± 0.02^b
Liver SH groups, $\mu\text{mol/g prot}$	62.7 ± 3.9^a	57.9 ± 3.9^a	65.1 ± 5.5^a
AdipocyteTBAR's, $\mu\text{mol/g prot}$	$0,34 \pm 0,06^a$	$0,34 \pm 0,15^a$	$0,26 \pm 0,04^b$
Adipocyte SH groups, $\mu\text{mol/g prot}$	$71,21 \pm 11,86^a$	$71,5 \pm 14,06^a$	$71,4 \pm 11,06^a$

Numbers in each row with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

IX-2-4 - Présentation des résultats de la publication D :

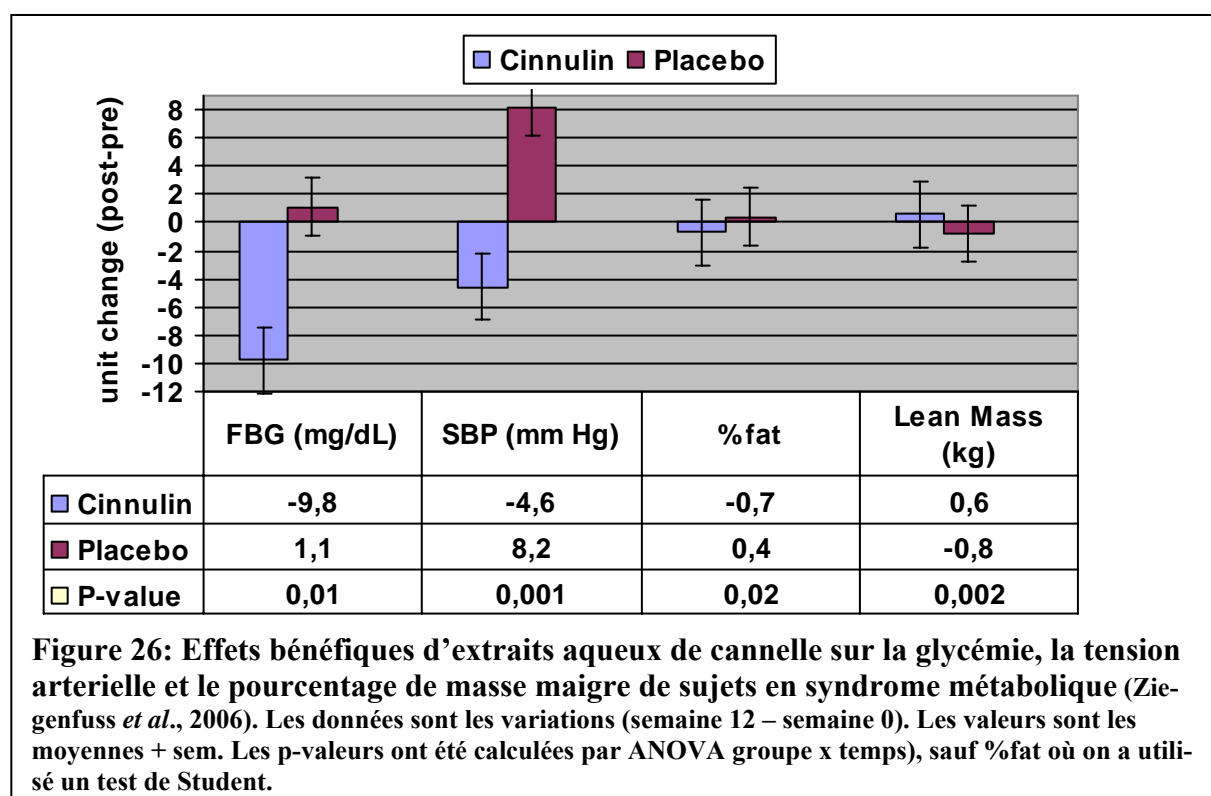
Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article :

Antioxidant effects of a cinnamon extract on overweight subjects with impaired fasting glucose

Anne-Marie Roussel¹, Isabelle Hininger¹, Rachida Benaraba¹, Tim N. Ziegenfuss² and Richard A. Anderson³

Après avoir observé les effets antioxydants des régimes comportant des extraits de cannelle chez le rat en syndrome métabolique, nous avons eu la possibilité de participer à un protocole clinique réalisé aux USA sur des sujets en surpoids développant un syndrome métabolique. Dans ce protocole, l'équipe américaine a étudié l'impact des régimes sur la sensibilité à l'insuline (Human Nutrition Research Center, Beltsville, USA, Dr Anderson), la pression artérielle et la composition corporelle (Ohio Research Group, Wadsworth, OH, Dr Ziegenfuss) (Ziegenfuss *et al.*, 2006). Notre rôle a été de contribuer à l'élaboration du protocole clinique et à mesurer dans le plasma et les érythrocytes, les marqueurs de stress oxydant et les défenses antioxydantes (Publication D).

L'étude en double aveugle *versus* placebo a duré 12 semaines. Les sujets, adultes jeunes ($46,0 \pm 2.1$ ans) développaient un syndrome métabolique. Ils étaient obèses (IMC $33,2 \pm 2$), leur glycémie à jeun était élevée ($113,1 \pm 2.2$ mg/dL) ainsi que leur triglycéridémie (> 160 mg/dL).



Les sujets randomisés en deux groupes ont reçu, en double aveugle, deux fois par jour 250 mg d'extrait aqueux de cannelle (Cinnulin PF) *versus* placebo.

Dans la partie américaine de l'étude, la supplémentation en extraits de cannelle s'est traduite par un effet bénéfique sur la glycémie, la pression artérielle et le pourcentage de masse grasse (figure 26).

En parallèle à la baisse de la glycémie, comme le montre le tableau XI, après 12 semaines de régime comportant les extraits de cannelle, nous avons mesuré une augmentation significative du pouvoir antioxydant du plasma (FRAP) et des groupements thiols, alors que la peroxydation lipidique était diminuée. Les activités des enzymes antioxydantes des erythrocytes ne sont pas modifiées.

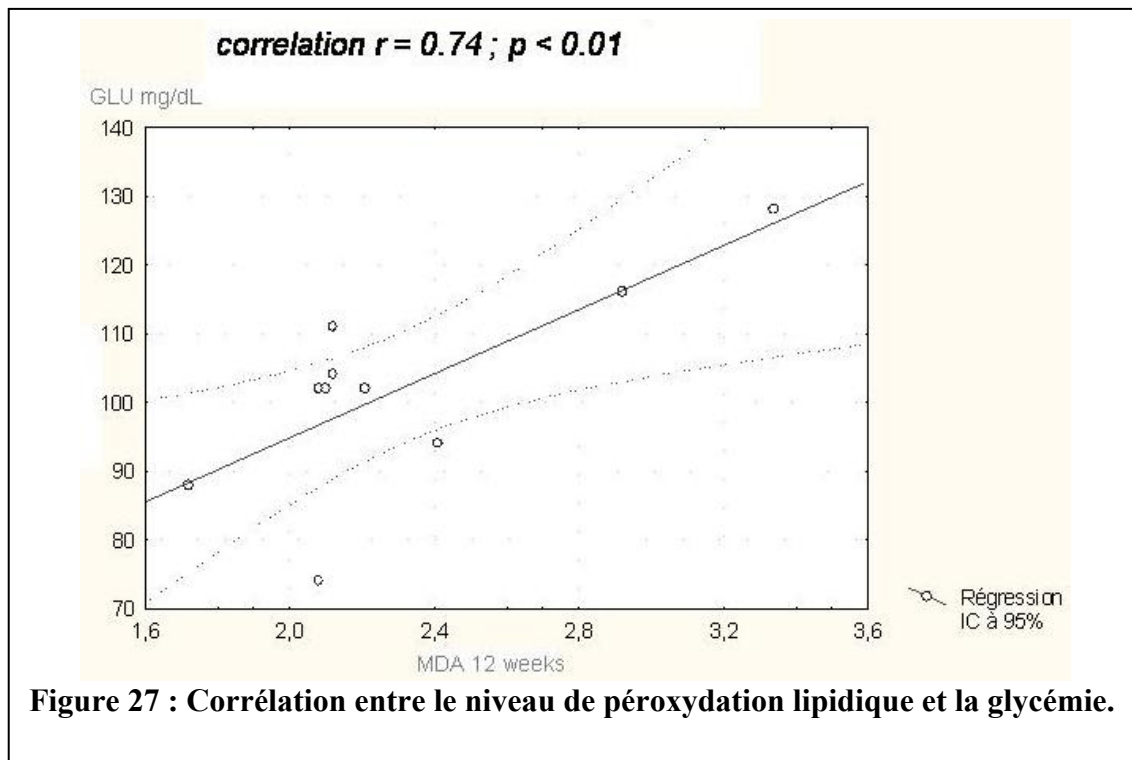
Tableau XI : Peroxydation lipidique, oxydation des protéines, pouvoir antioxydant du plasma, activité antioxydante des enzymes dans le groupe cannelle versus placebo

Parameters	Cinnamon Group	Cinnamon group	Cinnamon-group	Placebo group	Placebo group	Placebo group
Time of supplementation	0 week	6 weeks	12 weeks	0 week	6 weeks	12 weeks
FRAP μMol/L	811.7 ± 38.0	874.2 ± 52.4	917.8* ± 33.4	707.6 ± 58.2	708.9 ± 60.1	660.0 ± 54.0
Plasma TBAR's μMol/L	2.7 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.2* ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.40 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Plasma SH groups μMol/g prot	4.89 ± 0.20	5.26 ± 0.20	5.56* ± 0.20	5.26 ± 0.20	5.14 ± 0.10	4.97 ± 0.20
RBC Se-GPx U/gHb	41.25±2.80	41.47 ± 2.60	41.76± .70	45.58 ± 3.10	46.57 ± 3.40	46.17 ± 3.40
RBC Cu ZnSOD U/mg Hb	1.17 ± 0.05	1.15± 0.1	1.20 ± 0.1	1.30 ± 0.05	1.27 ±0.03	1.37 ± 0.05
Fasting Glucose mg/dL	114.1± 2.2	114.8 ± 6.8	102.2*± 4.3	112.0 ± 3.2	109.0 ± 5.7	113 ± 4.6
Fasting Insulin pmol/ml	11.34 ± 1.70	11.95 ± 5.94	14.15 ±11.19	10.30 ± 1.76	9.47 ± 1.59	9.56 ± 1.88

*p<0.05

De façon intéressante et venant confirmer les résultats obtenus chez l'animal, nous avons trouvé une corrélation ($r = 0,74$, $p < 0.01$) entre le niveau de peroxydation lipidique et la glycémie (figure 27 ci-après). Ce résultat s'accorde avec les observations de Hayden et Tyagi

(2004) qui montrent que le taux plasmatique de glucose joue un rôle prédominant dans le sta-



tut antioxydant.

L'oxydation des lipides comme celles des groupes SH participe à l'athérogénèse et aux complications oxydatives chez l'obèse (Davi *et Falco* 2005) (Couillard *et al.*, 2005) et nos résultats suggèrent une protection par la cannelle de ces modifications oxydatives. L'effet antioxydant que nous mesurons pourrait également expliquer l'effet sur la diminution de masse grasse rapportée par Ziegenfuss *et al.*, (2006), via un effet de régulation de la production des adipokines.

En conclusion, pour la première fois dans le syndrome métabolique, les bénéfices d'une supplémentation chez l'homme par les extraits aqueux de cannelle sont démontrés à la fois sur la régulation de la glycémie et sur le contrôle du stress oxydant. L'application de ces résultats à la prévention du syndrome métabolique place les extraits de cannelle parmi les facteurs de prévention nutritionnelle du diabète et de ses complications oxydatives à prendre en considération.

IX-2-5 - Publication D

Antioxidant effects of a cinnamon extract on overweight subjects with impaired fasting glucose

Anne-Marie Roussel¹, Isabelle Hininger¹, **Rachida Benaraba**¹, Tim N. Ziegenfuss² and Richard A. Anderson³

¹Laboratoire Nutrition, Vieillesse, Maladies Cardiovasculaires, Université Joseph Fourier, Grenoble, France

²Ohio Research Group, Wadsworth, OH

³Beltsville Human Nutrition Research Center, USDA, Beltsville, MD, USA

Address all correspondence to: Dr. Richard A. Anderson; USDA, ARS, BHNRC, NRFL;

Bldg. 307C, Rm. 222, BARC-East; Beltsville, MD 20705-2350; telephone: 301/504-8091; fax: 301/504-9062; E-

mail: Richard.Anderson@ars.usda.gov

This work is part of the Scientific Cooperative Convention Agreement (# 58-1235-4N-F033) between the Human Nutrition Research Center (Beltsville, MD, USA) and the Joseph Fourier University (Grenoble, France).

Roussel AM et al. 2006. J Am Coll Nutr, abstract, 25:443.

Journal of American College of Nutrition, Mai 2007, submitted

ABSTRACT

Objective: To determine the effects of an aqueous extract of cinnamon on antioxidant status of obese subjects.

Methods: Twenty-two obese subjects with elevated blood glucose were enrolled in a double-blind placebo-controlled trial. Subjects were given either a placebo or 250 mg of an aqueous extract of cinnamon (Cinnulin PF) two times per day for 12 weeks. Plasma TBAR's concentrations, SH groups and plasma antioxidant status (ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay) were evaluated. Erythrocyte Cu-Zn SOD activity was measured after hemoglobin precipitation by monitoring the auto-oxidation of pyrogallol and erythrocyte glutathione peroxidase activity was evaluated by established methods.

Results: FRAP and plasma SH groups increased, while plasma TBAR's levels decreased in subjects receiving the cinnamon extract. Effects were larger after 12 than 6 weeks. There was also a positive correlation ($r = 0.74$; $p = 0.014$) between MDA and plasma glucose.

Conclusion: This study supports the hypothesis that the inclusion of cinnamon extracts in the diet of overweight people would reduce oxidative stress and impaired fasting glucose which are risk factors associated with diabetes and cardiovascular disease.

Key words : cinnamon, antioxidants, glucose, diabetes, insulin

INTRODUCTION:

Rates of free radical formation are increased in obesity (1). In obese people, the leading causes of oxidative stress have been identified as hyperglycemia, insulin resistance, increased tissue lipid levels, inadequate antioxidant defenses, enzymatic sources within the endothelium and chronic inflammation (2). Conversely, oxidative stress is presently accepted as a likely causative factor in the development of insulin resistance which is present in obesity (3). The

mechanisms leading to the insulin cascade down-regulation in oxidized cells involve increased serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS1), impaired insulin-stimulated redistribution of IRS1 and phosphatidylinositol-kinase between cytosol and low-density microsomal fraction followed by a reduced protein kinase-B phosphorylation and GLUT4 translocation to the plasma membrane. In addition, prolonged exposure to ROS affects transcription of glucose transporters, whereas the level of GLUT1 is increased, GLUT4 level is reduced (4). Oxidative stress has been described as a key factor in obesity-related diseases such as diabetes (5), atherosclerosis (6) (7) and inflammation (8). In obese people, reducing oxidative stress by increasing antioxidant dietary intakes could be a possible method to reduce the incidence of these pathologies. Among dietary antioxidants, polyphenols have been linked with the hypothesis that their redox activities may confer specific health benefits (9) (10). In the dietary antioxidant group, polyphenols from cinnamon could be of special interest in obese people with impaired fasting glucose since they might act both as insulin sensitizers and antioxidants. Aqueous extracts from cinnamon have been shown to increase *in vitro* glucose uptake and glycogen synthesis, increase phosphorylation of the insulin receptor and likely help trigger the insulin cascade system (11) (12). We have reported that aqueous extracts from cinnamon enhance the *in vitro* activity of insulin (13). In animal studies, cinnamon extracts potentiate insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling (14) and prevent the insulin resistance induced by a high fructose diet in part by enhancing the insulin signaling pathway (15). Cinnamon essential oil enhanced insulin sensitivity in Zucker fatty rats (16) and, recently, in db/db mice, anti-diabetic effects of cinnamon extracts on blood glucose were observed in relation with an improved insulin sensitivity (17). In diabetic patients with poor glycemic control, cinnamon extracts have been reported to have beneficial effects in reducing fasting plasma glucose (18) (19).

Given these findings, we hypothesized that polyphenolic polymers with insulin-like biological activity that we have isolated and identified in cinnamon (14) could improve plasma fasting glucose and oxidative stress markers by acting as antioxidants in obese people at high risk of oxidative stress. Therefore, this work was designed to investigate in overweight people with impaired fasting glycemia the effects of a twelve week supplementation of the dried aqueous extract of cinnamon on oxidative stress markers including plasma TBAR's levels, plasma SH group oxidation, FRAP (Ferric Reducing Activity Plasma), antioxidant erythrocyte enzyme activities (Cu-Zn SOD and Se-GPx), and the possible correlation with fasting glucose and plasma insulin levels.

METHODS

Subjects:

Twenty-two subjects (10 men and 12 women) were enrolled in a double-blind placebo-controlled trial. Subjects provided written and dated informed consent to participate in the study. They were in good health, as determined by physical and medical history. They were 46.0 ± 2.1 years with a mean BMI of 33.2 ± 2.0 , and a mean fasting blood glucose of 113.1 ± 2.2 mg/dL. Subjects were excluded who were pregnant or lactating, or with any serious metabolic disorder including diabetes, thyroid diseases, or with a history of hepatorenal, musculoskeletal, autoimmune or neurologic disease. Subjects taking thyroid, hyperlipidemic, hypoglycemic, anti-hypertensive, anti-coagulant medications or OTC products containing pseudoephedrine or other stimulants were excluded. In addition, subjects taking weight loss supplements or drugs within 30 days prior to the start of the study, who have gained or lost more than 20 lbs within the past 30 days, who drank more than three cups of percolated coffee (or an equivalent amount of cola) per day, and who smoked or had quit smoking within the past six months were also excluded.

Groups:

Subjects were divided randomly into two groups and given either a placebo or 250 mg of an aqueous extract of cinnamon (Cinnulin PF) two times per day for 12 weeks. Cinnamon capsules were provided by Integrity Nutraceuticals, Inc. (Sarasota, FL). Integrity Nutraceuticals has a Cooperative Research and Development Agreement with USDA and RAA.

Biological parameters:

Blood was collected after an overnight fast at the beginning of the study, after 6 weeks, and after 12 weeks in heparinized tubes protected from light and centrifuged at room temperature for 10 min at 3000 g. Plasma and erythrocyte pellets were immediately isolated, aliquoted and stored at -80°C until measurements were completed within 6 months.

Plasma thiol groups were assayed as described by Faure and Lafond (20). The calibration was obtained from a stock solution of 100 mM N-acetyl cysteine (NAC) in the range of 0.125 to 1 mM. Standards and plasma samples were placed in 0.05 M phosphate buffer, EDTA 1 mM, pH 8, and bis-5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 2.5 mM, and absorbance measured at 412 nm.

Plasma TBAR's concentrations were assessed as previously described by Richard *et al.* (21). Plasma antioxidant status was evaluated using ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. The FRAP assay uses antioxidants as reductants in a redox-linked colorimetric method. In this assay, at low pH, a ferric-tripyridyltriazine (Fe^{III} -TPTZ) complex is reduced to the ferrous form, which is blue and monitored by measuring the change in absorption at 593 nm. The change in absorbance is directly proportional to the reducing power of the electron-donating antioxidants present in plasma. The absorbance change is translated into a FRAP value (in $\mu\text{mol/l}$) by relating the change of absorbance at 593 nm of test sample to that of a standard solution of known FRAP value (22).

Erythrocyte Cu-Zn SOD activity was measured after hemoglobin precipitation by monitoring the auto-oxidation of pyrogallol by the method of Marklund and Marklund (23). Erythrocyte GSH-Px activity was evaluated by the modified method of Gunzler (24) using tertbutyl hydroperoxide (Sigma Chemical Co, Via Coger, Paris, France) as a substrate instead of hydrogen peroxide. Results are expressed as μmoles of NADPH (Boehringer-Mannheim).

Statistical analyses

Data are expressed as mean \pm SEM. Wilcoxon signed ranks tests were used to compare all variables between baseline and at 6 and 12 weeks of treatment in the placebo and in the cinnamon groups. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Data analyses were performed using the statistical software package (Statistica Program, Statistical Software, Paris, France)

RESULTS

No significant changes were observed in the placebo group between the beginning and the end of the study (Table 1). In the cinnamon group, fasting glucose decreased significantly from 114.1 ± 2.2 to 102.2 ± 4.3 mg/dl ($p < 0.05$) and fasting insulin was not altered by the cinnamon supplementation (25). Plasma oxidative stress markers were all significantly improved ($p < 0.05$). Ferric Reducing Activity of Plasma (FRAP) and plasma SH groups increased, while plasma TBAR's levels decreased. Moreover, there was a positive correlation ($r = 0.74$; $p = 0.014$) between TBAR's and plasma glucose (Figure 1). In contrast, RBC antioxidant enzymes, SOD and GPx, were not altered by the supplementation. In parallel with the hypoglycemic effects, the antioxidant effects of the treatment became significant after 12 weeks, but not after 6 weeks (Figure 2).

DISCUSSION

Oxidative stress, which is increased in obesity, plays an important role in the development of diabetes and cardiovascular diseases in obese people (26). The objective of this study was to determine whether oral administration of a cinnamon extract would improve oxidative stress in overweight people with impaired glycemia, and consequently be a possible nutritional approach in reducing the risk of diabetes, cardiovascular diseases and oxidative stress-related complications in these subjects. Cinnamon, a natural product with a long history of safety, is rich in phenolic components that have been shown to improve the action of insulin in vitro (13), in animal studies (14) (15) and to possess in vitro antioxidant activity (27). In the present study, cinnamon extracts at 500 mg/d for twelve weeks decreased oxidative stress, improved impaired fasting glycemia and also decreased fat body mass (25).

In the cinnamon group, impaired fasting glucose levels returned to normal physiological levels after twelve weeks of supplementation. This positive effect is comparable to a separate human study in which daily administration of 1000 mg of oral cinnamon extract reduced fasting glucose levels by 16 % over a 60 day study period in a prospective, randomized, placebo-controlled trial involving 60 subjects with type 2 diabetes mellitus (19). A recent study also reported that cinnamon powder (3 g per day for 3 months) reduced by 10.3 % the fasting plasma glucose in patients with diabetes mellitus type 2 (Mang *et al.*, 2006). We observed the hypoglycemic effects after twelve weeks of supplementation, but not after 6 weeks. The duration of the supplementation seems important to consider, since, in agreement with our data, a 6 week intervention with cinnamon supplementation (1.5 g/d) did not improve glycemic control in postmenopausal type 2 diabetes patients (28).

The polyphenol type-A polymers extracted from cinnamon have been reported to stimulate autophosphorylation of the insulin receptor and inhibit protein tyrosine phosphatase (PTP-1). Both these mechanisms may lead to increased glucose uptake and glycogen synthesis (13) (12). Rats without insulin resistance, treated with oral cinnamon extract, also exhibited increased insulin sensitivity (14). Cinnamon extract may potentiate insulin action via enhancing the insulin signaling pathways leading to increased PI 3-kinase activity, which regulates insulin-stimulated glucose uptake and glycogen synthesis. Cinnamon extract has also been found to mitigate insulin resistance as measured by the euglycemic clamp when induced by a high fructose diet in normal Wistar rats (15).

In this study, we found a positive significant correlation between plasma glucose levels and plasma TBAR's, estimation of lipid peroxidation. This observation confirms a previous study showing that plasma glucose levels play a role in determining oxidative status (29). Impaired

fasting glucose is a leading cause of oxidative stress and oxidative vascular complications in obesity and the improvement of impaired fasting glycemia in cinnamon group is predictive of health benefits of cinnamon. Hyperglycemia causes the auto-oxidation of glucose, glycation of proteins, and the activation of polyol metabolism (30). These changes accelerate the generation of reactive oxygen species (ROS) and increase oxidative modifications of lipids and proteins (31). The improvement of impaired fasting glycemia is associated with the antioxidant effects of cinnamon supplementation assessed by plasmaTBAR's, SH groups and FRAP.

Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation in humans (32) and poor glycemic control is an important factor in generation of protein oxidation (33). Plasma TBAR's levels were reduced, indicating decreased lipid peroxidation, while plasma SH groups were increased, indicating a protection of SH groups against oxidation. The oxidation of lipids is thought to play a crucial role in the generation of atherosclerotic lesions in obese patients (34). For patients suffering from obesity, cardiovascular diseases and diabetes, it is well-known that decreasing lipid peroxidation is an important health challenge to avoid oxidative damage of the arterial walls and oxidative complications (35). Functional consequences of SH group losses include protein misfolding, catalytic inactivation and decreased antioxidative capacity (36). In the group receiving cinnamon, plasma SH groups were increased after twelve weeks of supplementation, suggesting that cinnamon acts in protecting both lipids and proteins against oxidation. In parallel, the FRAP, which is a measure of the total antioxidant capacity of plasma, was increased thereby providing a contributory factor to the protective effects of cinnamon supplementation.

In contrast, cinnamon intake did not alter the activity of the antioxidant enzymes in erythrocytes. Consistent with our findings, another study on polyphenols reported that in humans the polyphenols of red wine do not alter the activities of renal antioxidant enzymes, while plasma antioxidant capacity is enhanced following red wine consumption (37). However, in rats fed high fat diet with spices rich in cinnamon, antioxidant enzymes activities were found to be enhanced (38). These discrepancies could be due to the different designs and duration of the studies. .

The insulin like effects of cinnamon extracts lead to the improvement of impaired glycemia and, given the hyperglycemia-induced free radical production, may be involved in the biochemical mechanisms underlying the antioxidant effects of the cinnamon supplementation. It is also well documented that polyphenols act as reactive oxygen and nitrogen species scavengers, redox-active transition metal chelators and enzyme modulators (39) and complementary

effects of cinnamon extracts as direct scavengers of free radicals as suggested by the increased FRAP in cinnamon group is possible.

CONCLUSIONS

This study supports the hypothesis that the inclusion of cinnamon extracts in the diet of overweight people would reduce oxidative stress and impaired fasting glycemia which are risk factors associated with diabetes and cardiovascular disease. The mechanisms underlying the beneficial effects may be related to the insulin potentiating and antioxidant effects of the cinnamon polyphenols resulting in decreased free radical production.

REFERENCES

1. Fujita K, Nishizawa H, Funahashi T, Shimomura I, Shimabukuro M: Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. *Circ J* 70: 1437-1442, 2006.
2. Vincent HK, Taylor AG: Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 30: 400-418, 2006.
3. Fridlyand LE, Philipson LH: Oxidative reactive species in cell injury: Mechanisms in diabetes mellitus and therapeutic approaches. *Ann N Y Acad Sci* 1066:136-51.: 136-151, 2005.
4. Bloch-Damti A, Bashan N: Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 7: 1553-1567, 2005.
5. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R: Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 111: 1448-1454, 2005.
6. 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* 114: 1752-1761, 2004.
7. Govindarajan G, Whaley-Connell A, Mugo M, Stump C, Sowers JR: The cardiometabolic syndrome as a cardiovascular risk factor. *Am J Med Sci* 330: 311-318, 2005.
8. Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G: Inflammation, insulin resistance, and obesity. *Curr Atheroscler Rep* 6: 424-431, 2004.
9. Dragsted LO: Antioxidant actions of polyphenols in humans. *Int J Vitam Nutr Res* 73: 112-119, 2003.

10. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L: Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 287-306, 2005.
11. Imparl-Radosevich J, Deas S, Polansky MM, Baedke DA, Ingebritsen TS, Anderson RA, Graves DJ: Regulation of PTP-1 and insulin receptor kinase by fractions from cinnamon: implications for cinnamon regulation of insulin signalling. *Horm Res* 50: 177-182, 1998.
12. Jarvill-Taylor KJ, Anderson RA, Graves DJ: A hydroxychalcone derived from cinnamon functions as a mimetic in 3T3-L1 adipocytes. *J Am Coll Nutr* 20: 327-336, 2001.
13. Anderson RA, Broadhurst CL, Polansky MM, Schmidt WF, Khan A, Flanagan VP, Schoene NW, Graves DJ: Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity. *J Agric Food Chem* 52: 65-70, 2004.
14. Qin B, Nagasaki M, Ren M, Bajotto G, Oshida Y, Sato Y: Cinnamon extract (traditional herb) potentiates in vivo insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes Res Clin Pract* 62: 139-148, 2003.
15. Qin B, Nagasaki M, Ren M, Bajotto G, Oshida Y, Sato Y: Cinnamon extract prevents the insulin resistance induced by a high-fructose diet. *Horm Metab Res* 36: 119-125, 2004.
16. Talpur N, Echard B, Ingram C, Bagchi D, Preuss H: Effects of a novel formulation of essential oils on glucose-insulin metabolism in diabetic and hypertensive rats: a pilot study. *Diabetes Obes Metab* 7: 193-199, 2005.
17. Kim SH, Hyun SH, Choung SY: Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *J Ethnopharmacol* 104: 119-123, 2006.
18. Mang B, Wolters M, Schmitt B, Kelb K, Lichtinghagen R, Stichtenoth DO, Hahn A: Effects of a cinnamon extract on plasma glucose, HbA_{1c}, and serum lipids in diabetes mellitus type 2. *Eur J Clin Invest* 36: 340-344, 2006.
19. Khan A, Safdar M, Ali Khan MM, Khattak KN, Anderson RA: Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26: 3215-3218, 2003.
20. Faure P, Lafond J: Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation., in Favier A, Cadet J, Kalnyanaraman M, Fontecave M, Pierre J (eds), Basel, Switzerland, Birkhauser, 1995, pp. 237-248.

21. Richard, M. J., Portal, B., Meo, J., Coudray, C., Hadjian, A. and Favier, A. Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem* **38**, 704-9, 1992.
22. Benzie IF, Strain JJ: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76, 1996.
23. Marklund S, Marklund G: Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474, 1974.
24. Gunzler W, Kremers H, Flohe L: An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem* 12: 444-448, 1974.
25. Ziegenfuss TN, Hofheins JE, Mendel RW, Landis J, Anderson R: Effects of a Water-Soluble Cinnamon Extract on Body Composition and Features of the Metabolic Syndrome in Pre-Diabetic Men and Women. *Journal of Sport Nutrition* 2007.
26. Yu Y, Lyons TJ: A lethal tetrad in diabetes: hyperglycemia, dyslipidemia, oxidative stress, and endothelial dysfunction. *Am J Med Sci* 330: 227-232, 2005.
27. Shobana S, Naidu KA: Antioxidant activity of selected Indian spices. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 62: 107-110, 2000.
28. Vanschoonbeek K, Thomassen BJ, Senden JM, Wodzig WK, van Loon LJ: Cinnamon supplementation does not improve glycemic control in postmenopausal type 2 diabetes patients. *J Nutr* 136: 977-980, 2006.
29. Hayden MR, Tyagi SC: Neural redox stress and remodeling in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and diabetic neuropathy. *Med Sci Monit* 10: RA291-RA307, 2004.
30. Robertson RP: Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 279: 42351-42354, 2004.
31. Osawa T, Kato Y: Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Ann N Y Acad Sci* 1043:440-51.: 440-451, 2005.
32. Olusi SO: Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 1159-1164, 2002.

33. Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Howell SK, Thornalley PJ, Beisswenger PJ: Glycated and oxidized protein degradation products are indicators of fasting and postprandial hyperglycemia in diabetes. *Diabetes Care* 28: 2465-2471, 2005.
34. Davi G, Falco A: Oxidant stress, inflammation and atherogenesis. *Lupus* 14: 760-764, 2005.
35. Couillard C, Ruel G, Archer WR, Pomerleau S, Bergeron J, Couture P, Lamarche B, Bergeron N: Circulating levels of oxidative stress markers and endothelial adhesion molecules in men with abdominal obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 6454-6459, 2005.
36. Balcerczyk A, Bartosz G: Thiols are main determinants of total antioxidant capacity of cellular homogenates. *Free Radic Res* 37: 537-541, 2003.
37. Rodrigo R, Bosco C: Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 142: 317-327, 2006.
38. Dhuley JN: Anti-oxidant effects of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark and greater cardamom (*Amomum subulatum*) seeds in rats fed high fat diet. *Indian J Exp Biol* 37: 238-242, 1999.
39. Rice-Evans CA, Miller NJ: Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 24: 790-795, 1996.

Table 1: Lipid peroxidation, protein oxidation, antioxidant plasma total activity and antioxidant RBC enzymes in cinnamon group vs placebo

Parameters	Cinnamon Group	Cinnamon group	Cinnamon-group	Placebo group	Placebo group	Placebo group
Time of supplementation	0 week	6 weeks	12 weeks	0 week	6 weeks	12 weeks
FRAP μMol/L	811.7 ± 38.0	874.2 ± 52.4	917.8* ± 33.4	707.6 ± 58.2	708.9 ± 60.1	660.0 ± 54.0
Plasma TBAR's μMol/L	2.7 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.2* ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.40 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Plasma SH groups μMol/g prot	4.89 ± 0.20	5.26 ± 0.20	5.56* ± 0.20	5.26 ± 0.20	5.14 ± 0.10	4.97 ± 0.20
RBC Se-GPx U/gHb	41.25±2.80	41.47 ± 2.60	41.76± .70	45.58 ± 3.10	46.57 ± 3.40	46.17 ± 3.40
RBC Cu ZnSOD U/mg Hb	1.17 ± 0.05	1.15± 0.1	1.20 ± 0.1	1.30 ± 0.05	1.27 ±0.03	1.37 ± 0.05
Fasting Glucose mg/dL	114.1± 2.2	114.8 ± 6.8	102.2*± 4.3	112.0 ± 3.2	109.0 ± 5.7	113 ± 4.6
Fasting Insulin pmol/ml	11.34 ± 1.70	11.95 ± 5.94	14.15 ±11.19	10.30 ± 1.76	9.47 ± 1.59	9.56 ± 1.88

*p<0.05

Figure 1: Correlation between plasma lipoperoxidation and glycemia after 12 weeks of supplementation

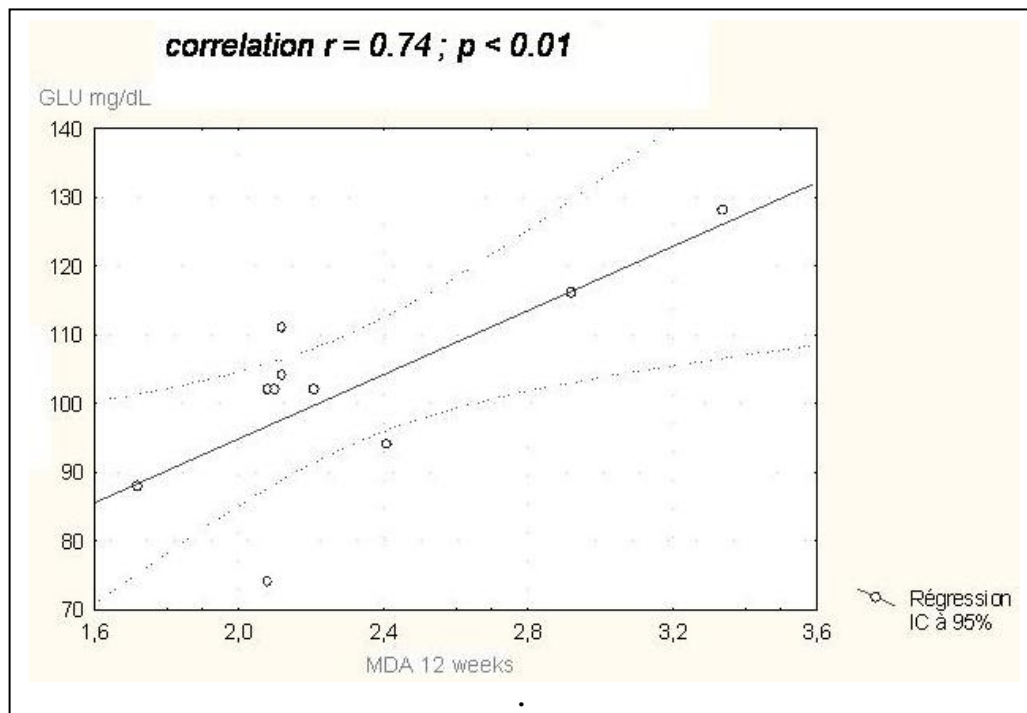
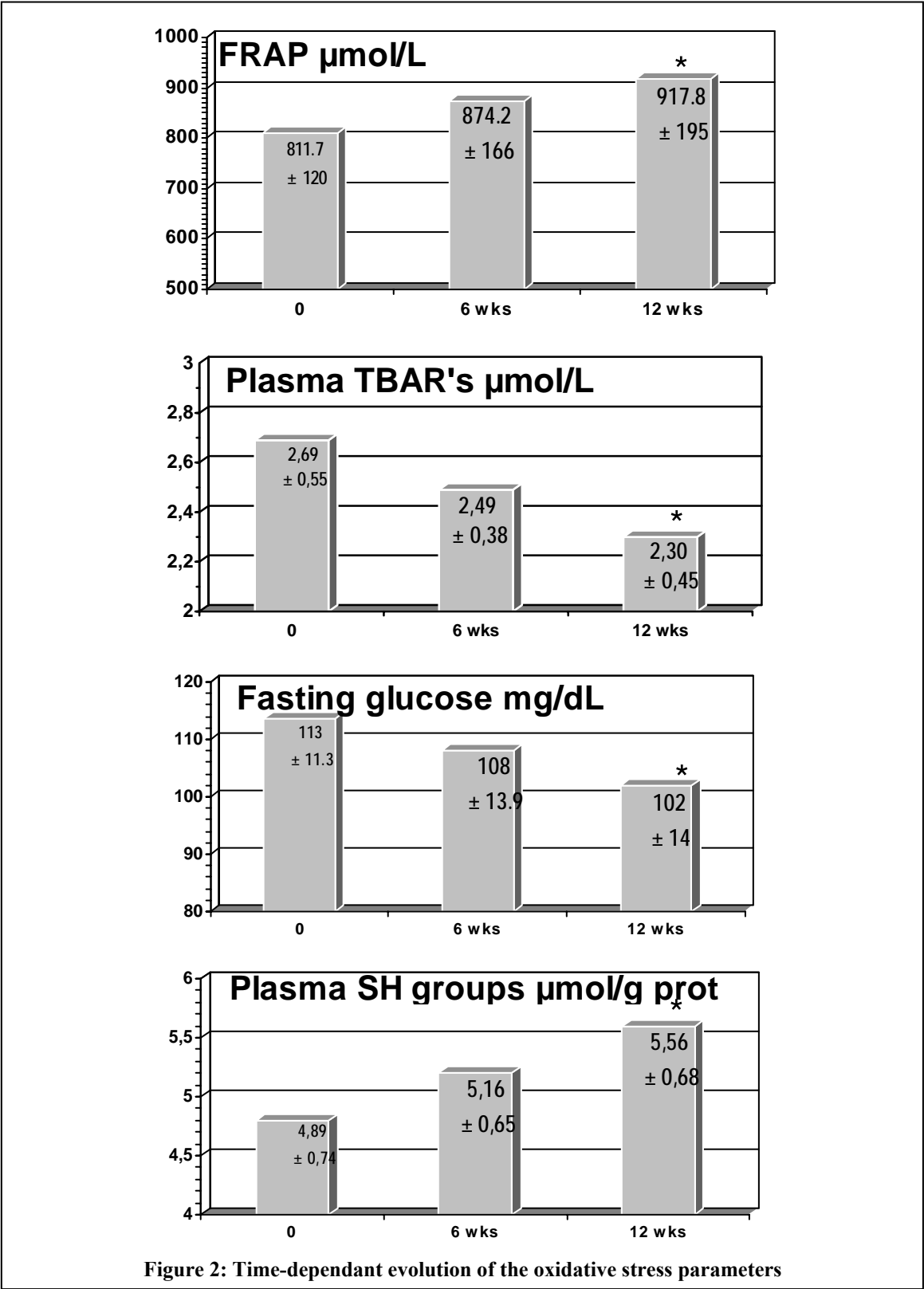


Figure 2: Time-dependant evolution of the oxidative stress parameters



IX-3 - Histidinate de chrome : absence de toxicité et propriétés antioxydantes potentielles

Cette partie du travail de thèse s'est intéressée au chrome III (Cr^{3+}), oligoélément essentiel dont l'effet insulino sensibilisateur et antioxydant est largement décrit dans la littérature, en particulier chez le diabétique de type 2, l'obèse et, de façon plus générale, les sujets insulino-résistants (voir 1^{ère} Partie, page 45 à 54).

Malgré ces propriétés qui permettent d'envisager le bénéfice d'apports en chrome III (Cr^{3+}) dans la prévention du syndrome métabolique, une controverse s'est développée quand à la toxicité potentielle de la supplémentation en chrome III (Cr^{3+}). Dans ce travail, nous nous sommes attachés à démontrer non seulement l'absence de toxicité (publication E), mais aussi les propriétés antioxydantes potentielles d'une nouvelle forme de supplémentation récemment mise sur le marché des compléments alimentaires nord-américains et européens, l'histidinate de chrome ($\text{Cr}(\text{His})_3$) (publication F).

IX-3-1 - Contexte de la recherche

Contrairement au chrome VI (Cr^{6+}), très toxique, le chrome III (Cr^{3+}) est un oligoélément essentiel qui régule le métabolisme glucidique et lipidique et augmente la sensibilité à l'insuline. Ces propriétés ont été confirmées dans de nombreuses études, mais l'ampleur de ses effets dépend essentiellement du statut en chrome des sujets (Anderson, 2003; Cefalu *et* Hu, 2004). Les supplémentations en chrome III (Cr^{3+}) comme traitement adjuvant ou préventif sont déjà proposées pour corriger les déficits chez les sujets atteints de pathologies associées à une diminution à sensibilité de l'insuline, tel que le syndrome métabolique, l'obésité et le diabète. En raison de la forte prévalence de ces pathologies, et du fait que cet élément puisse participer à l'amélioration du rapport masse grasse/masse maigre au niveau abdominal (Anderson, 1998 b ; Martin *et al.*, 2006; Pittler *et al.*, 2003), et diminuer l'appétence pour le goût sucré, il n'est pas surprenant que cet élément ait suscité ces dernières années un véritable engouement du marché des compléments alimentaires.

Cependant, alors que l'innocuité du chrome III (Cr^{3+}) semblait acquise (Anderson *et al.*, 1997a ; Anderson *et al.*, 1997b), elle a été récemment remise en cause par certains travaux (Bencheikh-Latmani *et al.*, 2007 ; Kirpnick-Sobol *et al.*, 2006) qui montrent que le chrome III (Cr^{3+}) pourrait interagir directement avec l'ADN, et que son potentiel redox serait impliqué dans la production d'espèces réactives d'oxygène et dans des dommages oxydatifs induisant

des mutations délétères de l'ADN (Balamurugan *et al.*, 2004 ; Vincent, 2003). Cet effet génotoxique pourrait être lié à sa capacité du chrome III (Cr^{3+}) à participer à la réaction de Fenton et produire des espèces radicalaires de type $^{\circ}\text{OH}$ (Tsou *et al.*, 1996) selon la réaction:



La toxicité du chrome III (Cr^{3+}) pourrait aussi être provoquée en partie par son ligand. En effet, plusieurs études ont montré l'implication de l'acide picolinique dans des aberrations chromosomiques, ainsi que l'implication des adduits de l'ADN provoqués lors de traitement par le picolinate de chrome (Speetjens *et al.*, 1999; Stearns *et al.*, 1995b). Cependant ces études, toutes réalisées *in vitro*, présentaient de nombreuses limites méthodologiques. Paradoxalement, d'autres travaux chez des patients diabétiques (Anderson *et al.*, 2001 a; Racek *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2006) ont montré que le chrome III (Cr^{3+}) avait des propriétés antioxydantes qui pourraient en partie rendre compte de son effet bénéfique, la prévention du stress oxydant étant étroitement liée à la lutte contre les complications du syndrome métabolique et du diabète de type 2.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail sur le chrome III (Cr^{3+}) a été :

- d'une part, de déterminer si les différentes formes galéniques de chrome III (Cr^{3+}) utilisées comme suppléments ou traitements pharmacologiques dans la prévention ou le traitement de l'obésité, du diabète de type 2, et du syndrome métabolique présentaient une toxicité. Nous avons dans ce but évalué et comparé le risque de toxicité et de génotoxicité des formes de chrome III les plus utilisées (histidinate, picolinate, chlorure), ce qui nous permis de proposer un classement de ces formes en fonction de leur innocuité (Publication E).
- L'histidinate de chrome ($\text{Cr}(\text{His})_3$) se révélant la forme la plus intéressante, capable de protéger les cellules d'un stress oxydant, nous avons cherché à déterminer par quel mécanisme l'histidinate de chrome ($\text{Cr}(\text{His})_3$) pouvait agir comme antioxydant. Nous avons étudié l'effet du chrome ($\text{Cr}(\text{His})_3$) sur l'expression des gènes antioxydants et de la réparation, à partir d'un modèle de biopuce réalisée au laboratoire en collaboration avec le Département de biologie intégrée du CHU de Grenoble (Publication F).

IX-3-2 - Présentation des résultats de la publication E :

Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article :

"Safety of trivalent chromium complexes: No evidence for DNA damage in human Ha-CaT keratinocytes".

Isabelle Hininger-Favier , **Rachida Benaraba**, Mireille Osman, Henri Faure, Anne Marie Roussel, and Richard A. Anderson

Free Radical Biology & Medicine, 2007, 42 1759-1765.

Nous avons évalué la cytotoxicité des formes galéniques du chrome III les plus utilisées sur le marché (picolinate, histidinate, chlorure) en la comparant à celle du chrome VI qui a été notre témoin positif tout au long de ce travail. Pour cela, nous avons d'abord cherché à déterminer la concentration en chrome III (Cr^{3+}) nécessaire pour induire 50 % de cytotoxicité (DL50) sur un modèle cellulaire de type kératinocytes humains non transformés. La cytotoxicité du chrome III (Cr^{3+}) évaluée par le test de survie (MTT) a été obtenue pour des doses très largement supérieures à celle du chrome VI (120 fois et 200 fois plus pour le chlorure et l'histidinate de chrome ($\text{Cr}(\text{His})_3$) respectivement). Ce premier travail nous a permis de proposer un classement de toxicité (DL50) des différentes formes de Cr :

Cr VI (CrO_4Na_2) : 50 μM > chlorure de chrome ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) : 6mM > histidinate de ($\text{Cr}(\text{His})_3$) : 10mM

En raison du seuil de solubilité du picolinate, nous n'avons pas pu atteindre sa DL50. Toutefois, nous avons pu vérifier qu'à sa dose maximale de solubilité (120 μM), le picolinate n'était pas cytotoxique.

Parallèlement au test de MTT, nous avons réalisé les dosages de lactate déshydrogénase, un marqueur enzymatique de nécrose. Quelle que soit la forme testée, nous ne montrons aucun effet délétère du chrome sur ce test, ce qui suggère que la diminution de la viabilité cellulaire observée avec le test MTT n'est pas due à une mort cellulaire, mais plutôt à un arrêt de croissance cellulaire. Cet effet sur la croissance cellulaire pourrait être relié soit à un arrêt du cycle cellulaire pour permettre aux systèmes de réparation d'entrer en action, soit à un effet spécifique du chrome sur les facteurs de croissance.

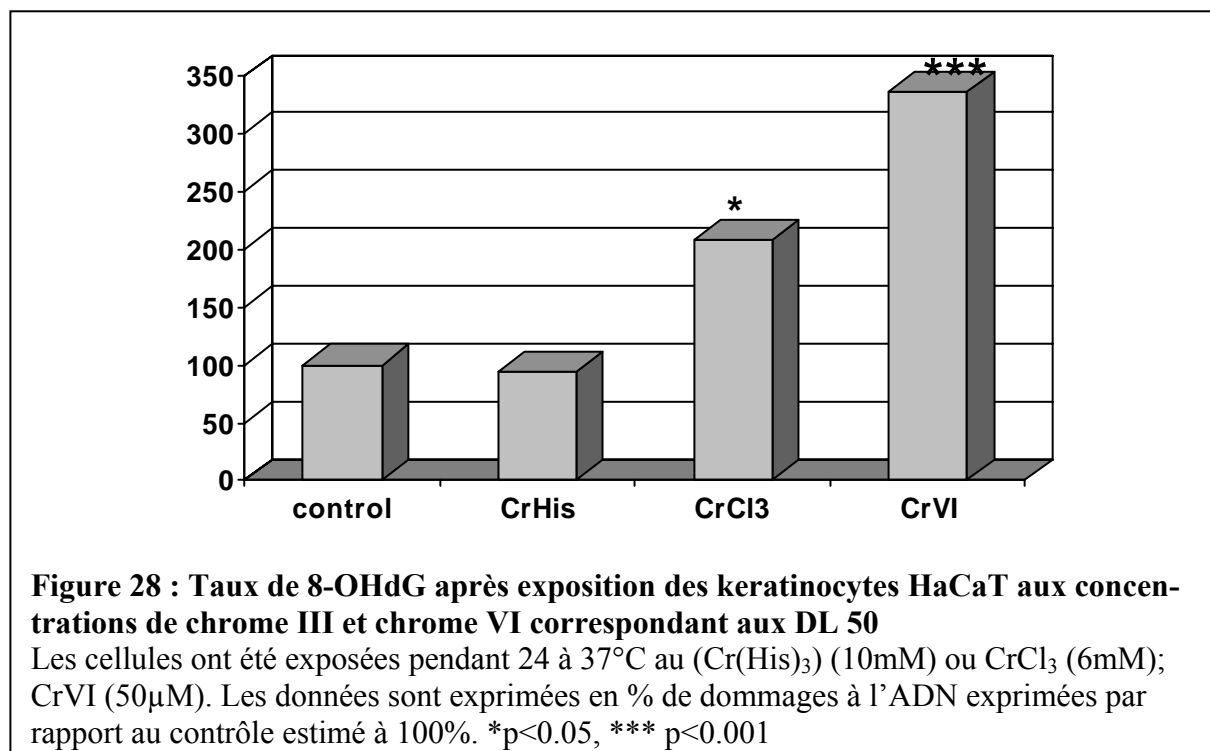
Nous avons alors cherché à définir le mécanisme pouvant être impliqué dans la cytotoxicité du chrome III (Cr^{3+}), en évaluant le risque génotoxique (Tableau XII et Figure 28). Après exposition aux différentes DL50, nous confirmons la forte génotoxicité du Cr VI (O'Brien *et al.*, 2005) évaluée par une augmentation significative des dommages à l'ADN à la fois par le test des comètes et le dosage des 8-OHdG (Blasiak *et Kowalik*, 2000; Lee *et al.*, 2004). Le chlorure de chrome à la DL50 (6 mM) comme le chrome VI, bien qu'à un niveau d'intensité plus faible, entraînent une augmentation significative des lésions de l'ADN par cassures simple brin (Tableau XII) et une augmentation des bases oxydées (Figure 28), suggérant un effet

proxydant du CrCl_3 . Cet effet pro-oxydant semble confirmer les travaux de Balamurugan *et al.* (2004) montrant une activation de la caspase 3, donc une mort par apoptose. En revanche, nous n'observons aucune augmentation des dommages à l'ADN avec le $(\text{Cr}(\text{His})_3)$ comparativement aux cellules témoins n'ayant pas été exposées au chrome. Le mécanisme d'action pourrait être une inhibition de la croissance cellulaire ou une intervention du ligand dans la toxicité potentielle attribuée au chrome III, ce qui avait été déjà proposé pour le picolinate de chrome dans un travail antérieur (Stearns *et al.*, 1995a).

Tableau XII : Taux de dommages à l'ADN en présence de chrome VI et des différentes formes de chrome III aux doses DL50

	%Tail
Contrôle	2.12 ± 0.58
Histidinate de chrome (10mM)	2.13 ± 0.34
Chlorure de chrome (6mM)	5.68 ± 1.68*
Dichromate de sodium (50µM)	>12***

Chaque traitement a été répété dans trois essais séparés. Le nombre de cellules analysées par essai était de 150. Les données sont exprimées en % Tail ± SD mesurés par la technique Comète. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

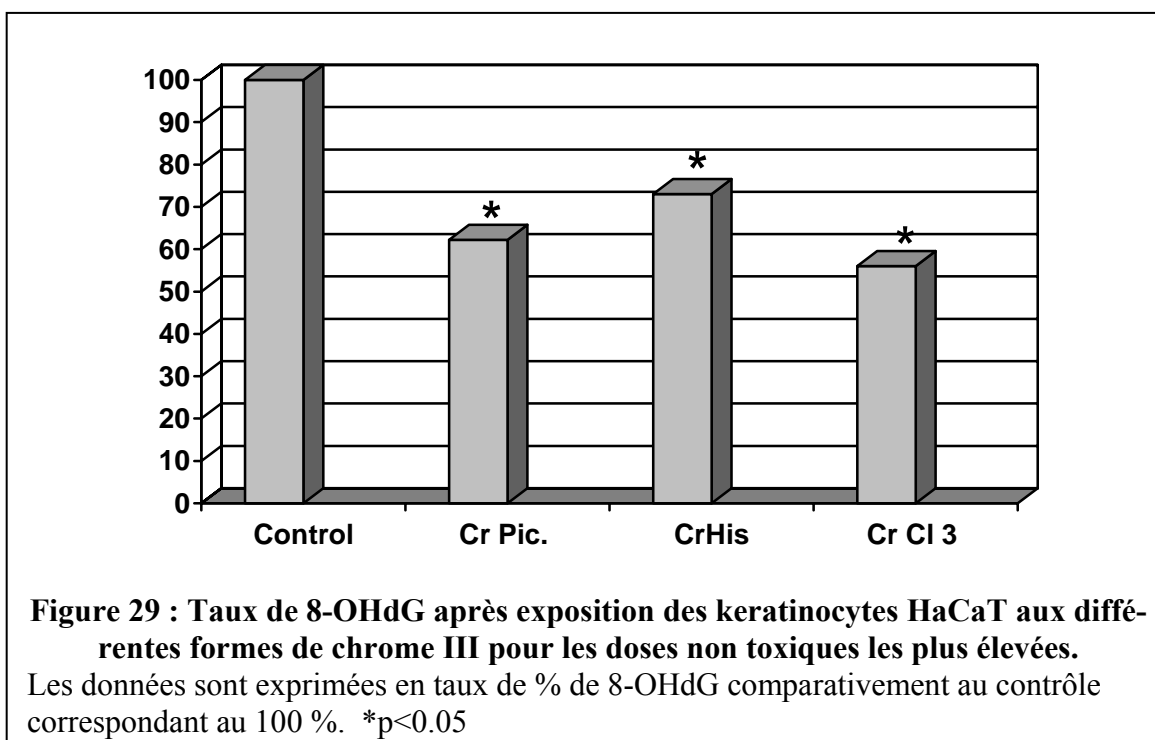


La première partie de l'étude ayant été réalisée sur les cellules ayant résisté aux effets toxiques, il était important de déterminer quel pouvait être l'effet du chrome à des doses inférieures aux DL50, afin de s'amender de l'effet "cellules-résistantes". Dans la suite de ce travail, nous avons donc cherché à définir si le chrome, à des doses non cytotoxiques, pouvait cependant présenter un risque génotoxique. Nous avons alors choisi de travailler aux doses maximales pour chacune des formes pour lesquelles le risque cytotoxique était nul (100 % de survie). Nous avons expérimentalement défini ces doses comme 250 μM pour $\text{Cr}(\text{His})_3$ et CrCl_3 , et 120 μM pour le picolinate de chrome. A ces doses, nous avons mis en évidence une diminution significative des bases oxydées, évaluée par le taux de 8-OHdG, illustrant un effet protecteur des formes de chrome vis à vis de l'oxydation des bases oxydées (Figure 29). Nous avons observé également une baisse non significative des cassures simple brin (Tableau XIII). Le manque de sensibilité de la technique pour déterminer une diminution d'un taux basal peut rendre compte du manque de significativité (cette technique est en effet surtout utilisée pour déterminer une augmentation des dommages suite à une exposition à un agent génotoxique). Toutefois, cette baisse n'est pas surprenante, puisque le taux de cassures par la technique comète peut être dû soit à une augmentation des dommages par cassures directes, soit également à une augmentation de l'activité des systèmes de réparation des bases oxydées. Ainsi la diminution du taux de bases oxydées par le chrome peut être expliquée par une moindre sollicitation des systèmes de réparation, puisque le taux de bases oxydées est diminué.

Tableau XIII : Taux de dommages à l'ADN en présence des différentes formes de chrome III pour les doses non toxiques les plus élevées.

	%Tail
Contrôle	2.05 ± 0.55
Histidinate de chrome (250 μM)	1.97 ± 0.31
Chlorure de chrome (250 μM)	1.93 ± 0.32
Picolinate de chrome (120 μM) (saturating solution)	1.50 ± 0.18 (p<0.07)

Chaque traitement a été répété dans trois essais séparés. Le nombre de cellules analysées par essai était de 150. Les données sont exprimées en % Tail \pm SD mesurés par la technique Comète.



Chaque traitement a été répété dans 3 essais séparés. Les concentrations étaient : picolinate de chrome 120 μ M, histidinate de chrome 250 μ M, chlorure de chrome 250 μ M.

Enfin, certains travaux ayant fait état d'un risque réactionnel du chrome III (Cr^{3+}) à participer à la réaction de Fenton et produire des espèces radicalaires de type $^{\circ}\text{OH}$ en présence de H_2O_2 , (Tsou *et al.*, 1996), nous avons évalué ce risque en exposant nos cellules préalablement incubées avec les différentes formes de chrome à une concentration en H_2O_2 de 50 μ M durant 30 minutes. Cette concentration a été expérimentalement définie pour entraîner une augmentation de 50 % des dommages à l'ADN mesurés par le test des comètes. En présence d' H_2O_2 , l'exposition des cellules aux différentes formes de chrome III aux doses maximales dépourvues d'effets néfastes (histidinate de chrome 250 μ M, chlorure de chrome 250 μ M et picolinate de chrome 120 μ M) n'a provoqué aucune augmentation des dommages à l'ADN.

Ainsi, contrairement à d'autres auteurs qui avaient évoqué un effet "Fenton-like" du Cr III et avaient rapporté un effet génotoxique (Bencheikh-Latmani *et al.*, 2007 ; Qi *et al.*, 2000 ; Tsou *et al.*, 1996), nous n'avons pas observé de toxicité. Les différents modèles utilisés dans les études et la nature du composé (chrome VI métabolisé en chrome III) expliquent les résultats contradictoires. En effet, dans la majorité des études ayant relaté une toxicité du Cr^{3+} , les au-

teurs ont travaillé sur de l'ADN isolé de type plasmide, alors que nous avons travaillé sur des modèles cellulaires pour respecter au mieux les conditions physiologiques, car il est largement admis que le chrome III (Cr³⁺) est très peu absorbé par la cellule (Anderson *et al.*, 2004 b).

Tableau XIV : Dommages à l'ADN de cellules préalablement incubées avec différentes formes de chrome et exposées à un stress oxydant

	% Tail
Contrôle stress oxydatif induit par H ₂ O ₂	3,60 ± 0,10
+ histidinate de chrome (250 µM)	3,59 ± 0,04
+ histidinate de chrome (50 µM)	2,70 ± 0,25 *
+ histidinate de chrome (5 µM)	2,90 ± 0,35 *
+ chlorure de chrome (250 µM)	3,04 ± 0,19
+ chlorure de chrome (50 µM)	2,60 ± 0,14 *
+ chlorure de chrome (5 µM)	2,75 ± 0,15 *
+ picolinate de chrome (120 µM)	3,59 ± 0,10
+ picolinate de chrome (50 µM)	2,90 ± 0,25 *
+ picolinate de chrome (5 µM)	2,90 ± 0,15 *

Chaque traitement a été répété dans 3 essais séparés. Le nombre de cellules analysées par essai était de 150. Les données sont exprimées en % Tail ± SD mesurés par la technique Comète. * $p < 0.05$.

De plus, à des doses comparables à celles supposées être absorbées après une supplémentation apportant 200 µg de chrome, de l'ordre de 50 et 5 µM, nous avons observé un effet bénéfique contre les dommages oxydatifs induits par le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Tableau XIV), illustrant un effet protecteur du Cr(III) contre les effets génotoxiques de H₂O₂. Nos résultats sont en accord avec ceux de Jain *et Kannan*, (2001) qui ont montré, sur des monocytes en cultures (U937 monocytes), une inhibition par le CrCl₃ du stress oxydant associée à une diminution de la lipoperoxydation et de la sécrétion de TNF-α. Dans des hépatocytes, Tezuka *et al.*, (1991), ont, eux aussi, observé que le CrCl₃ diminuait le taux de peroxydation lipidique. Ces résultats sont en accord avec des études chez des diabétiques de type 2 (Anderson *et al.*, 2001 a) (Racek *et al.*, 2006) (Yang *et al.*, 2006) qui rapportent une diminution de la peroxydation lipidique chez les sujets supplémentés.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats met en évidence **l'absence de risque génotoxique du chrome III (Cr 3+) évalué par le taux de cassures à l'ADN et le taux de 8-OHdG pour**

les différentes formes de chrome III utilisées comme compléments alimentaires et testées dans cette étude. De plus, la forme histidinate de chrome présente même, dans les conditions de notre étude, des propriétés antioxydantes.

Dans la suite du travail de thèse, nous avons poursuivi l'étude de l'histidinate de chrome et cherché à établir quel était le mécanisme potentiellement impliqué dans cet effet antioxydant.

IX-3-3 - Publication E

Free Radical in Biology and Medicine, 2007, 42, 1759-1765

Safety of trivalent chromium complexes: no evidence for DNA damage in human HaCaT keratinocytes

Isabelle Hininger^a, **Rachida Benaraba^a**, Mireille Osman^a, Henri Faure^a, Anne Marie Rousse-
l^a, and Richard A. Anderson^b

^aLaboratoire NVMC (Nutrition, Vieillesse, Maladies Cardiovasculaires), EA 3746, J. Fourier University, Domaine de la Merci, 38700 La Tronche, France and ^bNutrient Requirements and Functions Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, USDA, ARS, Beltsville, MD

Address all correspondence to: Dr. Richard A. Anderson; USDA, ARS, BHNRC, NRFL; Bldg. 307C, Rm. 222, BARC-East; Beltsville, MD 20705-2350; telephone: 301/504-8091; fax: 301/504-9062; E-mail:

andersonr@ba.ars.usda.gov

This work is part of the Scientific Cooperative Convention Agreement (# 58-1235-4N-F033) between the Human Nutrition Research Center (Beltsville, MD, USA) and the Joseph Fourier University (Grenoble, France).

Running title: Safety of chromium III

ABSTRACT

While the toxicity of hexavalent chromium, which is used for industrial purposes, is well established, trivalent Cr is an essential nutrient with very low toxicity. Several studies have demonstrated beneficial effects of supplemental trivalent Cr in subjects with reduced insulin sensitivity with no documented signs of toxicity. However, recent studies have questioned the safety of supplemental trivalent Cr complexes. The objective of this study was to evaluate the cytotoxic and genotoxic potential of the Cr(III) complexes (histidinate, picolinate and chloride) used as nutrient supplements compared with Cr(VI) dichromate. The cytotoxic and genotoxic effects of the Cr complexes were assessed in human HaCaT keratinocytes by determining the concentrations of Cr required to decrease cell viability assessed by determining the ability of a keratinocyte cell line (HaCaT) to reduce tetrazolium dye, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide]. DNA damage using Comet assay and the production of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) were also determined with and without hydrogen peroxide-induced stress. The LC50 for human cultured HaCaT keratinocytes was 50µM for hexavalent sodium dichromate and more than 120-fold higher for Cr

chloride (6mM) and Cr histidinate (10mM). For Cr picolinate, at saturating solution (120 μ M), the LC50 was not attained. High Cr(III) concentrations, 250 μ M Cr as Cr chloride and Cr histidinate and 120 μ M Cr picolinate (highest amount soluble in the system), not only did not result in oxidative DNA damage but exhibited protective antioxidant effects when cells were exposed to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. These data further support the low toxicity of trivalent Cr complexes used in nutrient supplements.

Key words : trivalent chromium, Cr(III) genotoxicity, DNA damage, oxidative stress

INTRODUCTION

Naturally occurring trivalent Cr (CrIII) can be converted to the hexavalent form (CrVI) at high pH and temperature. Hexavalent Cr is a well documented toxin, mutagen and carcinogen [17]. Cr (VI) induces oxidative stress, DNA damage, apoptotic cell death and altered gene expression [28]. In contrast, trivalent Cr is an essential trace element that potentiates insulin action and is required for normal lipid and carbohydrate metabolism [3] [4] [15]. Western diets are often low in Cr(III) and numerous studies have shown beneficial effects of supplemental Cr on glucose, insulin, lipids and related variables of subjects with glucose values ranging from slightly elevated to diabetic [3] [4] [15] [1]. Chromium is an essential nutrient and not a drug; therefore only subjects whose impaired glucose, insulin, lipid and related abnormalities are related to insufficient dietary Cr will be improved by additional Cr [3]. Several dietary Cr(III) supplements are currently available to alleviate this deficiency and they are widely used since interventional trials have demonstrated the beneficial effects of Cr(III) supplementation on insulin sensitivity, blood lipids, related abnormalities and potential effects in reducing weight [2] [29]. Effects on weight reduction are controversial [43] but most studies that do not report effects on weight or lean body mass are short-term (less than 12 weeks), involve healthy, young normal subjects with good insulin sensitivity and also involve 200 μ g or less of supplemental Cr [2]. A recent well-controlled study involving subjects with type 2 DM on sulfonylurea therapy documented an effect of supplemental Cr(III) on attenuated body weight gain and visceral fat accumulation in addition to improvements in insulin sensitivity and glucose control [27].

When Cr(VI) enters the cells it is reduced to Cr(III) and the resulting trivalent Cr can attack cellular components including DNA. However, naturally occurring Cr(III) has a weak ability to enter the cell and only very low levels of Cr(III) enter the nucleus. Despite this, there are reports of DNA-damaging effects of Cr(III) both in the cellular and cell-free systems. The redox potential of Cr has been implicated in the generation of oxidative damage causing dele-

terious DNA mutations [38] [43] [40]. The deleterious interaction of Cr(III) with DNA is supported by direct Cr-DNA binding [25] [45]. The possible carcinogenic mechanisms of Cr(III) might also be related to its ability to generate hydroxyl radicals ($^{\circ}\text{OH}$) via a Fenton reaction [42]. It has been reported that Cr(III) picolinate causes chromosomal damage and DNA damage and some of these papers demonstrated that the picolinate moiety may be responsible for this toxicity [36] [38].

The objective of this study was to elucidate the safety of trivalent Cr complexes used as supplements by evaluating the cytotoxic and genotoxic potential of the Cr(III) complexes (histidinate, picolinate and chloride) as compared with Cr(VI) dichromate. DNA damage in human HaCaT keratinocytes with and without H_2O_2 -induced oxidative stress was evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Cell medium RPMI 1640 was obtained from Invitrogen Corporation, (95613 Cergy Pontoise Cedex, France), Fetal Calf Serum from ATGC Biotechnologie (Noisy-le-grand, France), penicillin and streptomycin from Roche Diagnostic, (France) and sodium dichromate from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). All chemical compounds were of analytical grade or higher.

Cell culture and chromium complexes

HaCaT keratinocytes (2×10^5 cells/ 35 mm Petri dish) were incubated for 24 h at 37°C in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum containing penicillin (1.25 U/ml) and streptomycin (0.00125 U/ml) with varying concentrations of the forms of Cr evaluated in this study (histidinate, picolinate and chloride). Synthesis and absorption of the Cr(III) complexes have been described [6]. The chromium histidine complex contained 3 moles of histidine per mole of chromium and the binding of the Cr to the imidazole nitrogen was confirmed using proton and ^{13}C NMR.

Cell viability (MTT assay)

The concentrations of Cr(III) required to induce a decrease of cell viability were assessed by determining the ability of the HaCaT cells to reduce tetrazolium dye, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. The assay is based on cleavage of the tetrazolium salt, MTT, by mitochondrial succinate dehydrogenase to form a colored soluble formazan complex which is quantified spectrophotometrically at 570 nm. The keratinocytes suspension with 100 μl of medium (20,000 cells/well) was seeded in 96-well culture

plates. The next day, varying amounts of the Cr complexes were added to the wells and the culture plates were incubated for 24h at 37°C. For the MTT assay, 10 µl MTT (5 mg/ml stock in PBS) were added to each well and cells were incubated at 37 °C for 2h. Viable cells convert the soluble yellow MTT to insoluble purple formazan by the action of mitochondrial succinate dehydrogenase. 100 µl of dimethylsulfoxide (DMSO) were added to dissolve the formazan crystals. The optical density was measured at 570 nm with a microplate reader (Multiskan, Labsystem) and the amount of formazan produced was calculated by using molar extinction coefficient of 51,000. The absorbance is proportional to viable cell number and survival was calculated as the percentage of the staining values of untreated cultures.

LDH release

The release of lactate dehydrogenase (LDH) is a marker of cell necrosis, and the activity of LDH is correlated with cell death. LDH activity was measured using Sigma Diagnostics LDH kit # 500 (St. Louis, MO).

DNA damage by the Comet assay

The Comet assay was performed according to the procedure of Sing et al., [34] modified by Hininger et al. [20]. Ten microliters containing roughly 20,000 cells were mixed with 110 µl of 0.6 % low melting point agarose in RPMI 1640 at 37 °C. 110 µl of the mixture were layered onto a slide pre-coated with thin layers of 1% agarose, and immediately covered with a cover glass. Slides were left for 10 min on ice to allow the agarose to solidify. After gently removing the cover glass, the slides were immediately immersed into an ice-cold freshly prepared lysis solution (2.5 M NaCl, 10 mM Na₂-EDTA, 10 mM TRIS hydroxymethylaminomethane, 1% sodium sarcosinate, 1% Triton 100 X and 10 % DMSO, pH 10) to lyse the cells and to allow DNA unfolding. After 1h in the dark at 4°C, the slides were immersed for 25 min in a fresh alkaline electrophoretic buffer (300 mM NaOH, 200 mM Na₂-EDTA, pH 13) for unwinding and then separated by electrophoresis (25 V / 300 mA, 25 min). All the steps were carried out under minimal illumination. The electrophoresis tank was covered with black paper to avoid any additional light-induced DNA damage. Once electrophoresis was completed, slides were neutralized (3 x 5 min; 0.4 M TRIS pH 7.5). The dried microscope slides were stained with ethidium bromide (20 µg/ml in distilled H₂O; 50 µl/slide), covered with a cover slip prior to be analyzed using a Zeiss fluorescence microscope under green light. Results were expressed as percentage of DNA in the tail (% Tail). Fifty images were randomly selected from each sample, and the size of the tail, which corresponds to the in-

creased DNA damage, was measured. Three parallel tests with aliquots of the same sample of cells were performed for a total of 150 cells, and the % mean tail was calculated.

Measurement of oxidized bases (8-OHdG)

After cell membrane disruption, DNA was extracted at pH 8 in presence of 100 μ M desferoxamine solution with NaI, 4 mM, and isopropanol, washed once with 2 ml isopropanol and once with 2 ml 70% ethanol, and dissolved in 175 μ l of desferoxamine solution.

DNA was hydrolysed for 1 hour with 10 U of nuclease P1 at 37°C. Nucleotides were dephosphorylated using 8 U of alkaline phosphatase for 1 hour at 37°C. Proteins were removed by ultrafiltration with the MPS-1 kits. The nucleoside solution was then analyzed by HPLC and coulometric detection using the general methods described by the ESCODD group [19].

8-Oxo-deoxyguanosine (8OHdG) production was measured in the column eluent by coulometry with a 190 mV potential applied on the first electrode and a 310 MV potential on the second electrode and detected by spectrophotometry at 280 nm. Mobile phase consisted of 2 liters of a 50 mM pH 5.5 phosphate buffer containing 12% methanol and HPLC separation was run at 26°C. Under these conditions, 8-oxo-deoxyguanosine (8-OHdG) was eluted at 12 min and desoxyguanosine (dG) eluted at 9 min. The data are expressed as % of 8-OHdG/10⁵dG compared with control.

H₂O₂- induced oxidative stress

The cells were submitted to hydrogen peroxide (50 μ M) for 30 min at 37°C after a 24h preincubation period with concentrations of Cr(III) at 5, 50 and 250 μ M. Each experiment included a control group of cells exposed to H₂O₂ at 50 μ M without Cr preincubation.

Statistical methods

The data were expressed as mean \pm SD. The differences between means were evaluated by applying Student's t and ANOVA test. The level of statistical significance was set at p<0.05. The data were analyzed using Statistica Package (StatSoft Software, Paris, France).

RESULTS

Evaluation of DNA damage at LC50

- Cell viability

Cell viability, expressed by % of cell survival in presence of Cr(III) compounds and sodium dichromate, is presented in Figure 1. The LC50, evaluated by MTT test, was 50 μ M for hexavalent sodium dichromate and more than 120-fold higher for Cr chloride (6mM) and Cr

histidinate (10mM). For Cr picolinate, at saturating solution (120 μ M), LC50 was not attained.

- Cell necrosis

There was no significant cell necrosis assessed by LDH release when keratinocytes were incubated with Cr chloride (6mM) and Cr histidine (10mM) at LC50.

- DNA damage-

Cell exposure to sodium dichromate and Cr chloride at LC50 led to a significant increase, 500 and 250% increase of tail extent, respectively, in DNA damage assessed by Comet assay in comparison with control cells (Figure 2) whereas there were no oxidative DNA alterations in cells exposed to Cr histidinate (Figure 2, Table 1) assessed using both the Comet assay and 8-OHdG production. A significant increase of oxidized bases as 8-OHdG was observed with sodium dichromate and Cr chloride and no detected changes with Cr histidinate (Figure 3).

Evaluation of DNA damage at the highest noncytotoxic concentrations of Cr(III)

Using the MTT test, we determined the highest doses that did not result in cytotoxic effects: 250 μ M for Cr chloride; 250 μ M for Cr histidinate and 120 μ M for Cr picolinate. As shown in Table 2, after 24h incubation with Cr chloride (250 μ M), Cr histidinate (250 μ M) and Cr picolinate (120 μ M), these high metal concentrations did not cause DNA damage assessed by the Comet assay (Table 2) and, in parallel, we observed a decrease in 8-OHdG of 30% or more ($p < 0.01$) (Fig 4).

Evaluation of DNA damage in cells submitted to H₂O₂ induced stress

In cells preincubated for 24h with Cr(III) forms and then submitted to H₂O₂ - induced oxidative stress, there was no evidence for pro-oxidant effects of the forms of Cr tested. In contrast, we observed significant protective effects on DNA oxidative damage monitored by a decrease in % tail moment when cells were preincubated with Cr histidinate, Cr picolinate and Cr chloride at 50 and 5 μ M (Table 3).

DISCUSSION

Skin cells, HaCaT human keratinocytes, were used as a model for Cr toxicity since Cr salts have been shown to induce skin cancer and contact allergic dermatitis [21]. These cells have been used as a suitable model for chromium, nickel and cobalt toxicity studies [18]. Lymphocytes [10] [11], bacterial cells [30] and dermal fibroblasts [33] have also been used to study

the genotoxicity and cytotoxicity of chromium. However, cells in culture do not mimic the environment of the GI system, and are a limitation for interpreting the data.

Reduction of Cr(VI) is associated with free radical reactions and plays an important role in Cr(VI)-induced carcinogenesis [13]. In human HaCaT keratinocytes, we confirmed that sodium dichromate was highly genotoxic with increased DNA damage evaluated by Comet assay, a sensitive method to assess DNA damage [26] and an increased 8-OHdG production, a good marker of oxidative stress [32]. In comparison, Cr(III) compounds as chloride and histidinate, were 120 and 200-fold less toxic, respectively. The range for LC50 toxicity was NaCr(VI) (50 μ M) > Cr chloride (6mM) > Cr histidinate (10mM). These concentrations are in the same range as those studied in human HaCat keratinocytes [18] with EC50 (24h) values of 30 μ M for Cr(VI) and Cr chloride not toxic up to 1mM. In our study, the toxicity at LC50 is not associated with an increase in LDH release, a marker of necrosis. Despite the toxicity of Cr (III) as chloride is very low, this toxicity was already reported higher than those of picolinate in human fibroblast studies [33]. In cell free systems, caspase 3 activation has also been described as possibly involved in Cr chloride - induced apoptosis [10].

Even though the toxicity of Cr picolinate has never been demonstrated in humans, the safety of this form has been questioned [43] and extensively examined for its toxicity regarding its ability to generate oxidative stress and being mutagenic. In the present work, we observed that Cr picolinate at 125 μ M (saturating solution) exhibited the least toxicity in decreasing the survival rate of the cells (data not shown) compared with Cr chloride and Cr histidinate. Our observation is in agreement with those of Shrivastava et al. [33] in fibroblasts that showed a lower decrease of cell viability with Cr picolinate than with Cr chloride. Most studies of genotoxicity in cellular systems have been negative for chromium. However, other studies suggest that Cr picolinate may cause oxidative DNA damage and therefore could be mutagenic. Cr(III) picolinate has been reported to generate increased hydroxyl radicals [9], cleave DNA [36], induce apoptosis of lymphocytes [11] and alter DNA topology in bacterial cells [30]. It has been suggested that the potential intracellular accumulation of Cr(III) could be a leading factor of the formation of bonds between Cr(III) and DNA, causing genotoxic effects. However, most of these studies were done in cell free systems using DNA purified as biological materials whereas it is generally considered that only small amounts of Cr(III) compounds are absorbed and enter cells in animals. The absorption of Cr in animals is very low, usually less than 2% [2] [6], therefore the nucleus of the cell is not exposed to high levels of Cr. Recently, mutagenicity of chromium picolinate and chloride was studied in Salmonella

typhimurium and L5178 lymphoma cells [44]. Neither chromium picolinate nor chromium chloride induced a mutagenic response in *Salmonella typhimurium*. In contrast, in the L5178Y mouse lymphoma mutation assay, chromium picolinate induced mutagenic response at relatively non-toxic dose levels. While lymphocytes exposed to Cr(VI) displayed extensive DNA damage, such an effect was not observed when Cr(III) was tested and the Comet assay did not indicate the involvement of oxidative mechanisms in the DNA damaging activity of trivalent Cr [13].

In J 774A.1 macrophages, Bagchi et al., [8] reported low levels of oxidative stress, low (1.2-1.3-fold) increases in DNA fragmentation and no significant loss in cell viability with 30 to 50 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of Cr picolinate. In parallel, characterization of non-mutagenic Cr(III)-DNA interactions have been published [12]. In animals, data are also controversial. In rats, the lack of toxicity of Cr chloride and Cr picolinate have been established [5]. Similarly, Cr chloride or Cr niacin, used also as nutritional supplements, were unlikely to produce oxidative damage in animals [9]. In contrast in hamster cells in culture, Cr picolinate was reported to be mutagenic and inducing morphological damage [39]. It was suggested that the coordination of Cr(III) with picolinic acid may make the metal more genotoxic than other forms of Cr(III). However, these data are now contested since another recent study did not find a mutagenic effect of Cr picolinate using the same hamster ovary cell model [35].

In obese subjects supplemented with 400 $\mu\text{g/d}$ of Cr as Cr picolinate, Kato et al., [24] did not observe increased oxidative DNA damage as measured by anti-HMdU antibody levels.

Regarding Cr histidinate, which is better absorbed than other available forms of Cr [6], there was no DNA damage at the LC50 as assessed using the Comet assay and 8-OHdG production. At this dose, an arrest to DNA synthesis could be suggested, given that non mutagenic Cr(III)-DNA interactions have been shown to arrest DNA synthesis [14] [12].

The level at which trivalent Cr could become potentially harmful is however still an unanswered question. In this study, using the MTT test of cell viability, we determined the highest noncytotoxic concentrations of Cr chloride, Cr histidinate and Cr picolinate. At these doses, we observed a trend of the Comet tail moment to decrease and, for all the forms, a significant ($p < 0.01$) decrease of 8-OHdG production. These data suggest an antioxidant effect of Cr(III) forms. They are in agreement with the study of Jain et al., [22] showing that Cr(III) chloride inhibited oxidative stress and decreased lipid peroxidation and TNF- α secretion in cultured U937 monocytes. In hepatocytes, Tezuka et al., [41] also demonstrated that Cr(III) chloride inhibited oxidative stress and decreased lipid peroxidation.

In humans, our group also reported antioxidant effects of Cr (III) supplementation in a double-blind clinical study involving people with type 2 diabetes [7]. These antioxidant effects were also confirmed by another study using 600 µg/d of Cr from yeast in people with type 2 diabetes [16].

This study was also designed to investigate the effects of Cr(III) compounds on DNA damage in presence of H₂O₂ (50µM) induced stress resulting in a 50% decrease in cell viability. After 24h preincubation of the cells with the Cr(III) compounds, there was a significant protective effect on DNA damage for all forms of Cr(III) at doses below 100 µM and no deleterious effects at 250 µM. The dose range of Cr(III) showing protective effects was 50 and 5 µM. These doses are comparable to the amounts humans are postulated to absorb in long term daily supplementation with 200 µg of Cr as picolinate [37]. At these doses, we confirmed antioxidant protective effects of Cr(III) complexes against H₂O₂. These effects have been reported on protein oxidation and lipid peroxidation in a human promonocytic cell line [23]. Contrary to our data, another study [31] reported Cr(III)/H₂O₂-induced DNA damage and a Cr(III)-mediated Fenton-like reaction has been evoked. This notion can be refuted since such a mechanism of DNA damage only occurs at supra-physiological doses of H₂O₂ and there is no evidence that this is a viable mechanism at environmental/nutritional concentrations of Cr(III) and physiological amounts of H₂O₂.

CONCLUSION

We did not detect significant increased DNA breakage or increased levels of 8-oxodG in Cr(III) treated cells and our data do not support genotoxicity of dietary Cr(III) complexes used as dietary supplements. We demonstrated that high Cr(III) concentrations (250 µM Cr chloride and Cr histidinate and 120 µM Cr picolinate) not only did not result in oxidative DNA damage but rather antioxidant effects. When cells were exposed to H₂O₂-induced stress, no oxidative damage was observed even at high Cr(III) concentrations (250µM). At lower concentrations, below 100µM, which could be potentially found in nutritional supplementation, we showed beneficial antioxidant effects of all the studied Cr(III) compounds (chloride, histidinate and picolinate) in protecting DNA from oxidative damage.

This study does not support a lack of Cr(III) toxicity but rather low toxicity- lower than that observed for most nutrients.

RÉFÉRENCES

- [1] Althuis, M. D.; Jordan, N. E.; Ludington, E. A.; Wittes, J. T. Glucose and insulin responses to dietary chromium supplements: a meta-analysis. *Am J Clin. Nutr* **76**:148-155; 2002.
- [2] Anderson, R. A. Effects of chromium on body composition and weight loss. *Nutr Rev* **56**:266-270; 1998.
- [3] Anderson, R. A. Chromium, glucose intolerance and diabetes. *J Am Coll Nutr* **17**:548-555; 1998.
- [4] Anderson, R. A. Chromium and insulin sensitivity. *Nutrition Research Reviews* **16**:267-275; 2003.
- [5] Anderson, R. A.; Bryden, N. A.; Polansky, M. M. Lack of toxicity of chromium chloride and chromium picolinate in rats. *J Am Coll Nutr* **16**:273-279; 1997.
- [6] Anderson, R. A.; Polansky, M. M.; Bryden, N. A. Stability and absorption of chromium and absorption of chromium histidinate complexes by humans. *Biol. Trace Elem. Res.* **101**:211-218; 2004.
- [7] Anderson, R. A.; Roussel, A. M.; Zouari, N.; Mahjoub, S.; Matheau, J. M.; Kerkeni, A. Potential antioxidant effects of zinc and chromium supplementation in people with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* **20**:212-218; 2001.
- [8] Bagchi, D.; Bagchi, M.; Balmoori, J.; Ye, X.; Stohs, S. J. Comparative induction of oxidative stress in cultured J774A.1 macrophage cells by chromium picolinate and chromium nicotinate. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **97**:335-346; 1997.
- [9] Bagchi, D.; Stohs, S. J.; Downs, B. W.; Bagchi, M.; Preuss, H. G. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* **180**:5-22; 2002.
- [10] Balamurugan, K.; Rajaram, R.; Ramasami, T. Caspase-3: its potential involvement in Cr(III)-induced apoptosis of lymphocytes. *Mol. Cell Biochem.* **259**:43-51; 2004.
- [11] Balamurugan, K.; Rajaram, R.; Ramasami, T.; Narayanan, S. Chromium(III)-induced apoptosis of lymphocytes: death decision by ROS and Src-family tyrosine kinases. *Free Radic. Biol. Med.* **33**:1622-1640; 2002.
- [12] Blankert, S. A.; Coryell, V. H.; Picard, B. T.; Wolf, K. K.; Lomas, R. E.; Stearns, D. M. Characterization of nonmutagenic Cr(III)-DNA interactions. *Chem. Res. Toxicol.* **16**:847-854; 2003.

- [13] Blasiak, J.; Kowalik, J. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium [In Process Citation]. *Mutat. Res.* **469**:135-145; 2000.
- [14] Bridgewater, L. C.; Manning, F. C.; Woo, E. S.; Patierno, S. R. DNA polymerase arrest by adducted trivalent chromium. *Mol. Carcinog.* **9**:122-133; 1994.
- [15] Cefalu, W. T.; Hu, F. B. Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes Care* **27**:2741-2751; 2004.
- [16] Cheng, H. H.; Lai, M. H.; Hou, W. C.; Huang, C. L. Antioxidant effects of chromium supplementation with type 2 diabetes mellitus and euglycemic subjects. *J. Agric. Food Chem.* **52**:1385-1389; 2004.
- [17] Ding, M.; Shi, X. Molecular mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis. *Mol. Cell Biochem.* **234-235**:293-300; 2002.
- [18] Ermolli, M.; Menne, C.; Pozzi, G.; Serra, M. A.; Clerici, L. A. Nickel, cobalt and chromium-induced cytotoxicity and intracellular accumulation in human hacat keratinocytes. *Toxicology* **159**:23-31; 2001.
- [19] Gedik, C. M.; Collins, A. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J.* **19**:82-84; 2005.
- [20] Hininger, I.; Chollat-Namy, A.; Sauvaigo, S.; Osman, M.; Faure, H.; Cadet, J.; Favier, A.; Roussel, A. M. Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. *Mutat. Res* **558**:75-80; 2004.
- [21] Horowitz, S. B.; Finley, B. L. Setting health-protective soil concentrations for dermal contact allergens: a proposed methodology. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **19**:31-47; 1994.
- [22] Jain, S. K.; Kannan, K. Chromium chloride inhibits oxidative stress and TNF-alpha secretion caused by exposure to high glucose in cultured U937 monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**:687-691; 2001.
- [23] Jain, S. K.; Kannan, K. Chromium chloride inhibits oxidative stress and TNF-alpha secretion caused by exposure to high glucose in cultured U937 monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**:687-691; 2001.
- [24] Kato, I.; Vogelmann, J. H.; Dilman, V.; Karkoszka, J.; Frenkel, K.; Durr, N. P.; Orentreich, N.; Toniolo, P. Effect of supplementation with chromium picolinate on antibody titers to 5-hydroxymethyl uracil. *Eur. J. Epidemiol.* **14**:621-626; 1998.

- [25] Kirpnick-Sobol, Z.; Reliene, R.; Schiestl, R. H. Carcinogenic Cr(VI) and the nutritional supplement Cr(III) induce DNA deletions in yeast and mice. *Cancer Res.* **66**:3480-3484; 2006.
- [26] Lee, A. J.; Hodges, N. J.; Chipman, J. K. Modified comet assay as a biomarker of sodium dichromate-induced oxidative DNA damage: optimization and reproducibility. *Biomarkers* **9**:103-115; 2004.
- [27] Martin, J.; Wang, Z. Q.; Zhang, X. H.; Wachtel, D.; Volaufova, J.; Matthews, D. E.; Cefalu, W. T. Chromium picolinate supplementation attenuates body weight gain and increases insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* **29**:1826-1832; 2006.
- [28] O'Brien, T. J.; Ceryak, S.; Patierno, S. R. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat. Res.* **533**:3-36; 2003.
- [29] Pittler, M. H.; Stevinson, C.; Ernst, E. Chromium picolinate for reducing body weight: meta-analysis of randomized trials. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **27**:522-529; 2003.
- [30] Plaper, A.; Jenko-Brinovec, S.; Premzl, A.; Kos, J.; Raspor, P. Genotoxicity of trivalent chromium in bacterial cells. Possible effects on DNA topology. *Chem. Res. Toxicol.* **15**:943-949; 2002.
- [31] Qi, W.; Reiter, R. J.; Tan, D. X.; Garcia, J. J.; Manchester, L. C.; Karbownik, M.; Calvo, J. R. Chromium(III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. *Environ. Health Perspect.* **108**:399-402; 2000.
- [32] Rodriguez, H.; Akman, S. A. Mapping oxidative DNA damage at nucleotide level. *Free Radic. Res.* **29**:499-510; 1998.
- [33] Shrivastava, H. Y.; Ravikumar, T.; Shanmugasundaram, N.; Babu, M.; Unni, N. B. Cytotoxicity studies of chromium(III) complexes on human dermal fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **38**:58-69; 2005.
- [34] Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**:184-191; 1988.
- [35] Slesinski, R. S.; Clarke, J. J.; RH, C. S.; Gudi, R. Lack of mutagenicity of chromium picolinate in the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene mutation assay in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* **.**: 2005.

- [36] Speetjens, J. K.; Collins, R. A.; Vincent, J. B.; Woski, S. A. The nutritional supplement chromium(III) tris(picollinate) cleaves DNA. *Chem. Res Toxicol* **12**:483-487; 1999.
- [37] Stearns, D. M.; Belbruno, J. J.; Wetterhahn, K. E. A prediction of chromium(III) accumulation in humans from chromium dietary supplements. *FASEB J.* **9**:1650-1657; 1995.
- [38] Stearns, D. M.; Kennedy, L. J.; Courtney, K. D.; Giangrande, P. H.; Phieffer, L. S.; Wetterhahn, K. E. Reduction of chromium(VI) by ascorbate leads to chromium-DNA binding and DNA strand breaks in vitro. *Biochemistry* **34**:910-919; 1995.
- [39] Stearns, D. M.; Silveira, S. M.; Wolf, K. K.; Luke, A. M. Chromium(III) tris(picollinate) is mutagenic at the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase locus in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* **513**:135-142; 2002.
- [40] Stohs, S. J.; Bagchi, D.; Hassoun, E.; Bagchi, M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **20**:77-88; 2001.
- [41] Tezuka, M.; Momiyama, K.; Edano, T.; Okada, S. Protective effect of chromium(III) on acute lethal toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *J Inorg. Biochem* **42**:1-8; 1991.
- [42] Tsou, T. C.; Yang, J. L. Formation of reactive oxygen species and DNA strand breakage during interaction of chromium (III) and hydrogen peroxide in vitro: evidence for a chromium (III)-mediated Fenton-like reaction. *Chem. Biol. Interact.* **102**:133-153; 1996.
- [43] Vincent, J. B. The potential value and toxicity of chromium picollinate as a nutritional supplement, weight loss agent and muscle development agent. *Sports Med.* **33**:213-230; 2003.
- [44] Whittaker, P.; San, R. H.; Clarke, J. J.; Seifried, H. E.; Dunkel, V. C. Mutagenicity of chromium picollinate and its components in *Salmonella typhimurium* and L5178Y mouse lymphoma cells. *Food Chem. Toxicol.* **43**:1619-1625; 2005.
- [45] Zhitkovich, A.; Quievryn, G.; Messer, J.; Motylevich, Z. Reductive activation with cysteine represents a chromium(III)-dependent pathway in the induction of genotoxicity by carcinogenic chromium(VI). *Environ. Health Perspect.* **110 Suppl 5**:729-31.:729-731; 2002.

Figure 1 : Viability of HaCaT keratinocytes in the presence of Cr(III) compounds and sodium dichromate (Cr(VI))

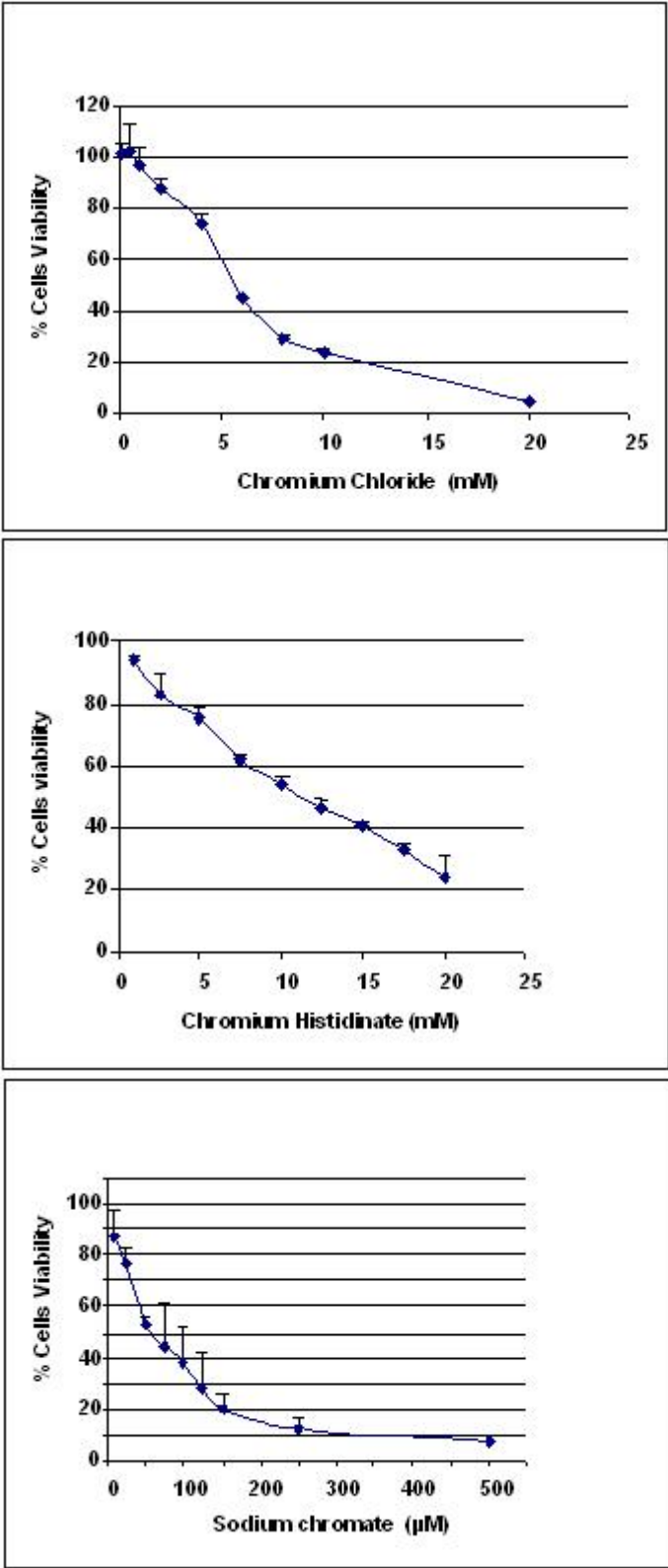


Table I : DNA damage in HaCaT keratinocytes in presence of Cr(VI) and Cr(III) forms at LC50

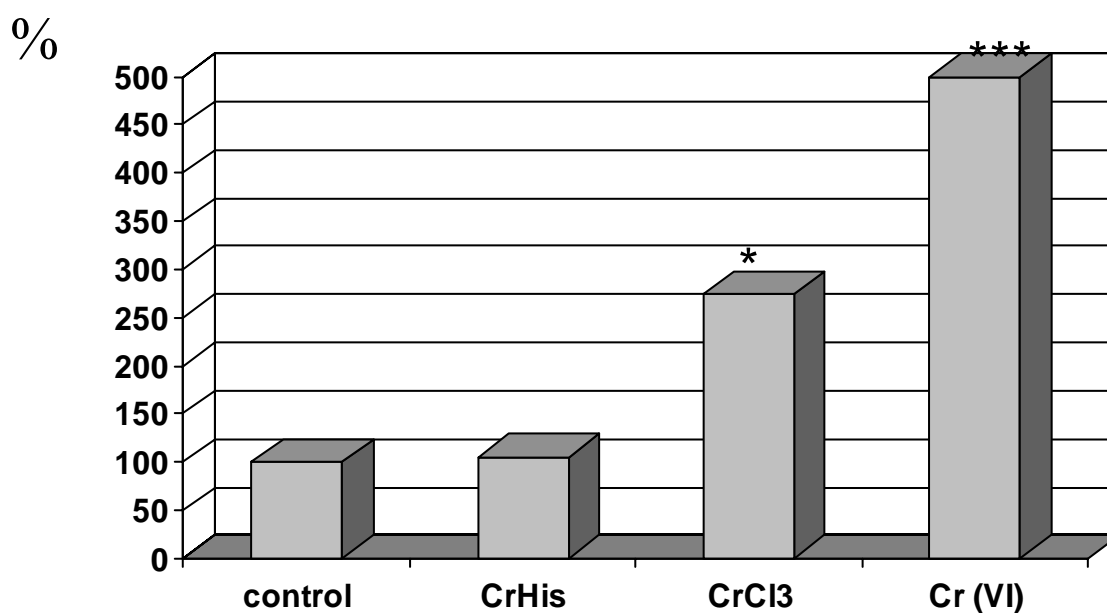
	%Tail
Control	2.12 ± 0.58
Cr histidinate (10mM)	2.13 ± 0.34
Cr chloride (6mM)	5.68 ± 1.68*
Sodium dichromate (50µM)	>12***

Each treatment was repeated in three separate assays. The number of cells in each treatment was 150.

Data are expressed as % tail ± SD assessed by Comet assay.

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

Figure 2 : % DNA damage in HaCaT keratinocytes in presence of Cr(VI) and Cr(III) compounds at LC50

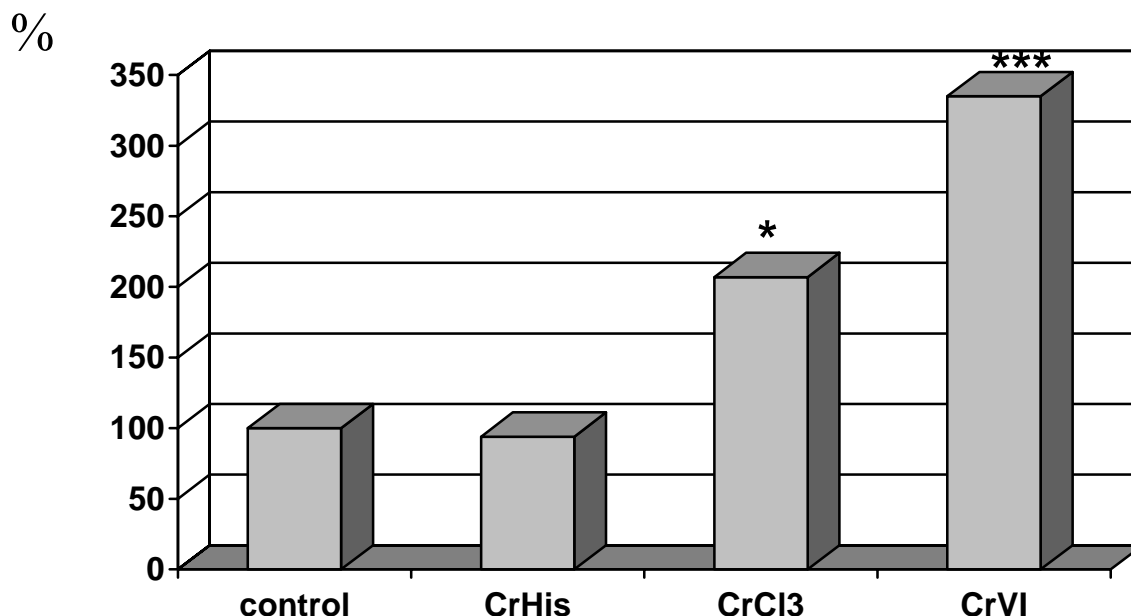


Human HaCaT keratinocytes were exposed for 24 h at 37°C to Cr(III) histidinate (10mM); Cr(III) chloride (6mM); sodium dichromate (50µM). The number of cells in each treatment was 150.

Data are expressed as DNA damage assessed by Comet assay compared with control as 100%.

* : $p < 0.05$ - *** : $p < 0.001$

Figure 3 : 8-OHdG production in HaCaT keratinocytes in presence of Cr(III) and Cr(VI) LC50 concentrations



Human HaCaT keratinocytes were exposed for 24 h at 37°C to Cr(III) histidinate (10mM); Cr(III) chloride (6mM); sodium dichromate (50µM). The number of cells in each treatment was 150. Data are expressed as DNA damage assessed by Comet assay compared with control as 100%.

* : $p < 0.05$ - *** : $p < 0.001$

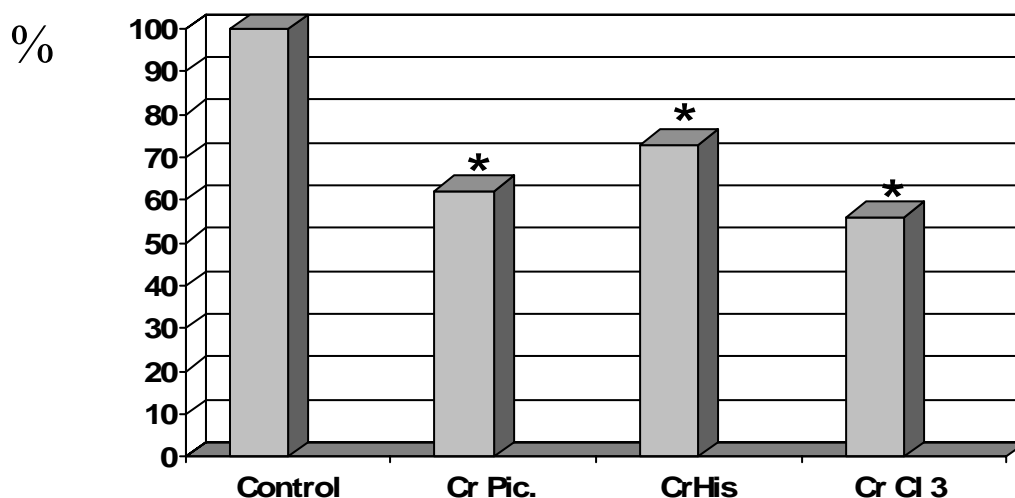
Table 2 : No DNA damage in HaCaT keratinocytes in presence of Cr(III) forms at the highest non cytotoxic doses

	%Tail
Control	2.05 ± 0.55
Cr histidinate (250µM)	1.97 ± 0.31
Cr Chloride (250 µM)	1.93 ± 0.32
Cr Picolinate (120µM) (saturating solution)	1.50 ± 0.18 ($p < 0.07$)

Each treatment was repeated in three separate assays. The number of cells in each treatment was 150.

Data are expressed as % tail ± SD assessed by Comet assay.

Figure 4 : 8-OHdG production in HaCaT keratinocytes in presence of Cr(III) forms at the highest noncytotoxic doses



Each treatment was repeated in three separate assays. In each assay, number of cells was 150 by treatment.

Concentrations: Cr picolinate 120 μ M, Cr histidinate 250 μ M, Cr chloride 250 μ M.

Data are expressed as % of 8-OHdG production compared with control group as 100%.

* : $p < 0.05$

Table 3: DNA damage in cells preincubated with Cr(III) forms at various concentrations and exposed to H₂O₂-induced oxidative stress

	Tail %
Control	
H ₂ O ₂ induced oxidative stress	3.60 \pm 0.10
Plus Cr histidinate (250 μ M)	3.59 \pm 0.04
Plus Cr histidinate (50 μ M)	2.70 \pm 0.25*
Plus Cr histidinate (5 μ M)	2.90 \pm 0.35*
Plus Cr chloride (250 μ M)	3.04 \pm 0.19
Plus Cr chloride (50 μ M)	2.60 \pm 0.14*
Plus Cr chloride (5 μ M)	2.75 \pm 0.15*
Plus Cr picolinate (120 μ M)	3.59 \pm 0.10
Plus Cr picolinate (50 μ M)	2.90 \pm 0.25*
Plus Cr picolinate (5 μ M)	2.90 \pm 0.15*

Each treatment was repeated in three separate assays. The number of cells in each treatment was 150. The data are presented as % tail \pm SD.

*P<0.05.

IX-3-4 - Présentation des résultats de la publication F

Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article "**Chromium III Histidinate Exposure Modulates Antioxidant Gene Expression in HaCaT Human Keratinocytes Exposed to Oxidative Stress**".

Rachida Benaraba, Florence Hazane, Kita Valenti, Mireille Osman, Alain Favier, Anne-Marie Roussel, Richard A. Anderson, Isabelle Hininger-Favier

Soumis à Free Radical in Biology & Medicine, June 2007

Après avoir montré qu'en situation de stress oxydant, le chrome III pouvait prévenir les dommages oxydatifs induits par H₂O₂ à l'ADN, nous avons cherché dans la suite de ce travail à évaluer les mécanismes moléculaires impliqués dans ces effets, en étudiant la modulation de l'expression des gènes de défenses antioxydantes et de la réparation par le (Cr(His)₃), en situation basale et après un stress H₂O₂. Cette étude devait nous permettre de savoir si les propriétés antioxydantes du (Cr(His)₃) étaient dues à un effet piègeur direct, ou s'il agissait en modulant l'expression de gènes de défenses antioxydantes.

Nous avons utilisé une biopuce à ADN contenant une batterie de gènes impliqués dans la défense antioxydante et des gènes de la réparation. Cette biopuce a été mise au point au Département de Biologie Intégrée (CHU de Grenoble - Pr A Favier) en vue de l'étude, sur des fibroblastes, des processus de vieillissement induits par un stress oxydatif.

Dans une première analyse, nous avons défini un profil d'expression propre aux kératinocytes par l'analyse des transcrits qui sont toujours détectés et de ceux qui ne le sont jamais.

Nous avons pu ainsi relever, dans notre modèle cellulaire, que les gènes les plus détectés étaient ceux appartenant au système de défense antioxydant (7 sur 17 déposés) alors que ceux appartenant à la famille des protéines régulatrices extracellulaires (ECM), spécifiques des fibroblastes (Kahari *et* Saarialho-Kere, 1997) (Toy, 2005) ne le sont pas. Ce dernier résultat était intéressant, car il permettait de valider en partie la spécificité de la biopuce.

Parmi les transcrits de gènes toujours détectés, on compte ceux appartenant à la famille des enzymes antioxydantes : GPX1 impliqué dans la détoxification cellulaire de H₂O₂ et celui de thioredoxine (TXN), une oxydoréductase contenant des groupements dithiol-disulfide au sein de son site actif, le gène Xeroderma pigmentosum C (XPC) appartenant au système de réparation (XPC) (1 sur 32). Enfin 3 sur 5 gènes ménagers, BACT, GAPDH et RPL32 sont expri-

més. Nous montrons ainsi que le profil transcriptionnel des kératinocytes inclut les transcripts des gènes GPX1, TXN et XPC, leur permettant de se protéger des dommages oxydatifs.

Effet H₂O₂ :

En réponse à un stress induit par H₂O₂, nous observons une augmentation significative de l'expression de deux gènes appartenant au système de défense antioxydante (AOE372, SCH1) directement après le traitement H₂O₂. Cette augmentation est maintenue 6 heures après le traitement H₂O₂. Six heures après le traitement H₂O₂, on observe également une diminution de l'expression de GSS, alors que l'expression de la SOD1 augmente de façon significative à 6 heures. La SOD 1 dismute le radical O₂^{•-} en H₂O₂. GSS catalyse la synthèse du GSH, et la protéine codant pour le gène AOE372 est une enzyme antioxydante appartenant à la famille des peroxyrédoxines. L'activité peroxydase de l'enzyme réduit le peroxyde d'hydrogène et les alkyl hydroperoxydes en eau et en alcool, en oxydant les équivalents-réducteurs fournis par les groupements thiols de molécules agissant comme "donneurs". Il a été également suggéré que cette protéine jouait un rôle clé dans l'activation de la voie de signalisation en cascade NF-kB en réponse à un stress oxydant. Faisant intervenir H₂O₂ comme second messenger, cette voie est impliquée dans l'apoptose et la régulation de la prolifération cellulaire.

Considérant le rôle clé de ces enzymes pour éliminer H₂O₂ et les ERO, leur surexpression est en accord avec nos conditions expérimentales. De plus, conformément à nos résultats, une surexpression de AOE372 a également été décrite en réponse à un stress oxydant (induit par l'irradiation gamma), dans des cellules HaCaT (Isoir *et al.*, 2006). Enfin, la surexpression de SHC1 en réponse à un stress oxydant, un gène qui se trouve au croisement du stress oxydant et de la génétique du vieillissement, a également été décrite dans d'autres modèles de stress oxydant (Pandolfi *et al.*, 2005). L'expression de ce gène a été impliquée dans l'induction de l'apoptose et le vieillissement cellulaire, ce qui encore une fois en accord avec nos conditions expérimentales (Migliaccio *et al.*, 1999).

Tableau XV : Résumé des principaux résultats obtenus pour l'expression des gènes à 0 heure et 6 heures

i) après un stress H₂O₂,

ii) après traitement des cellules par 50 µM Cr(III)His

iii) après un stress H₂O₂ sur des cellules préalablement traitées par 50 µM Cr(III)His .

i) Effet du traitement H₂O₂ versus contrôle	0 h	6 h
SOD 1		↑↑ (p=0.0217)
AOE372	↑↑ (p=0.05)	↑ (p=0.08)
SCH1	↑↑ (p=0.0302)	↑ (p=0.1)
GSS		↓↓ vs 0h (p=0.024)
FOSB	↑↑ (p=0.03)	↓ vs 0h (p= 0.07)
ii) Effet CrHis versus contrôle		
AOE372	↑↑ (p=0.01)	
GSS	↑↑ (p=0.0201)	
SCH1	↑↑ (p=0.0515)	
POLD2	↑↑ (p=0.6)	
FOSB	↑↑ (p=0.045)	
iii) Différence dans l'expression des gènes entre un traitement H₂O₂ et un traitement H₂O₂ précédé d'une supplémentation CrHis.	0 h H₂O₂ versus 0 h CrHis +H₂O₂	6 h H₂O₂ versus 6 h CrHis + H₂O₂
POLD2		↑↑ (p=0.04)
SOD 2		↓ (p=0.06)
GSS		↑↑ (p=0.006)

Toutefois,, parallèlement à l'induction de l'expression des gènes impliqués dans la défense antioxydante en réponse à H₂O₂, nous observons une augmentation des marqueurs du stress oxydant (tableau XVI), suggérant donc que l'induction des systèmes antioxydants induit par H₂O₂ n'est pas suffisante pour prévenir les dommages oxydatifs.

Tableau XVI : Concentrations en groupements SH ($\mu\text{mol/g prot}$) et TBARS ($\mu\text{mol/g prot}$) de cellules HaCaT en fonction de leur exposition à l'histidinate de chrome ($50 \mu\text{M}$) et à un traitement à $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$

	Contrôle	H ₂ O ₂	Cr(His)III	Cr(His)III +H ₂ O ₂
SH $\mu\text{mol/g prot}$	77.99 \pm 5.88 ^a	53.48 \pm 5,34 ^b	71.06 \pm 8.96 ^{a,c}	62.57 \pm 7,93 ^c
TBARS $\mu\text{mol/g prot}$	0.11 \pm 0.03 ^a	0.17 \pm 0.02 ^b	0.10 \pm 0.05 ^a	0.11 \pm 0.01 ^a

*Les valeurs qui ne partagent pas la même lettre^{a,b} sont significativement différentes à $p < 0.04$.
Les valeurs qui ne partagent pas la même lettre^{a,c} sont significativement différentes à $p < 0.02$.*

Effet de l'histidinate de chrome

L'exposition des cellules au Cr(III)his induit une augmentation significative des gènes appartenant à la défense antioxydante (AOE372, GSS, SCH1) (Figure 30) et au système de réparation de l'ADN (POLD2), ainsi que celle du gène FOSB. La surexpression des gènes de la défense antioxydante et de réparation pourrait expliquer, en partie, la diminution de l'oxydation 8-OHdG en présence du histidinate de chrome que nous avons observée dans la première partie de cette étude. Cependant, ces effets ne sont pas associés à des modifications du statut rédox évalué par le taux d'oxydation protéique et lipidique (Tableau XVI). Les études sur les risques génotoxiques du chrome III sont contradictoires. Certaines rapportent une augmentation de mutations de type cross-link en raison d'une inhibition de l'activité DNA polymérase (Snow *et Xu*, 1991) en présence de fortes concentrations de chrome III, alors qu'à faibles concentrations le chrome III pourrait se substituer au Mg²⁺ et activer la DNA polymérase (Snow, 1994). Nos résultats sont en accord avec ces derniers auteurs, car nous n'avons pas observé d'effets toxiques évalués par la technique comète dans la première partie de cette étude (Hininger *et al.*, 2007).

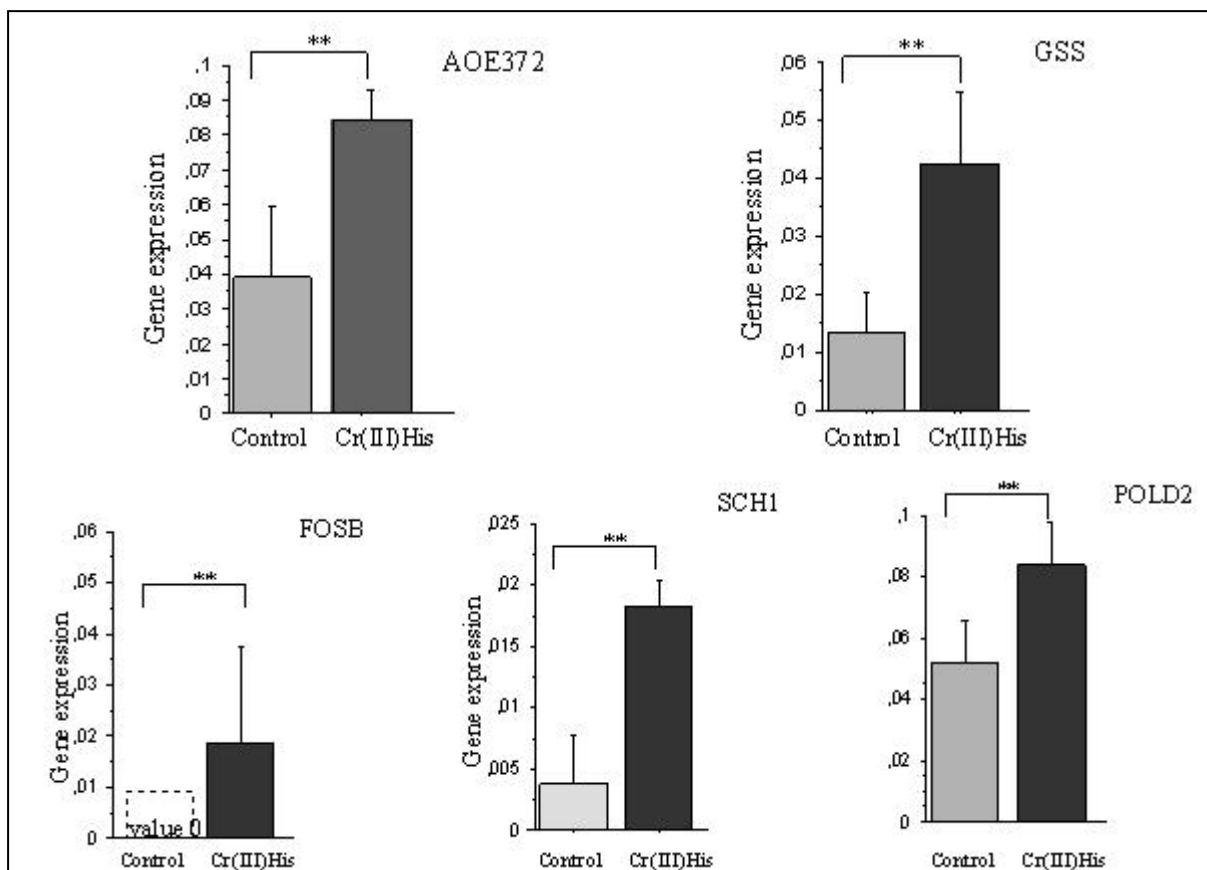


Figure 30 : Effet d'un traitement histidinate de chrome (50 μ M) pendant 24h à 37°C sur l'expression de gènes de cellules HaCaT. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de 8 analyses par biopuce (HaCaT contrôle n=4; HaCaT traitées par de l' histidinate de chrome (n=4) **p<0.05.

Effet de la préexposition des cellules à l'histidinate de chrome suivie d'un stress H_2O_2 :

La préexposition des cellules à l'histidinate de chrome, suivie d'un stress H_2O_2 , augmente l'expression de gènes impliqués dans la défense et la réparation (Tableau XV) : ainsi le taux de transcrite du gène antioxydant GSS, qui était diminué 6 heures après un stress H_2O_2 , est augmenté sous l'action de l' histidinate de chrome, cet effet est maintenu pendant 24 heures ($p<0.05$). L'autre augmentation du taux de transcrits concerne le gène de la réparation POLD2, 6 h après le stress H_2O_2 versus les cellules prétraitées à l'histidinate de chrome ($p<0.05$). En revanche, nous observons une diminution du taux de transcrits du gène de la SOD 2. La diminution de la SOD 2 peut être expliquée par les propriétés antioxydantes de l'histidinate de chrome qui induit parallèlement une surexpression de GSS et POLD2. Cette surexpression conduit à une diminution des besoins de détoxication par SOD 2, surtout que SOD 2 peut induire une augmentation d' H_2O_2 .

Dans ce travail, nous n'observons pas d'effet de l'histidinate de chrome sur l'expression des GST. Cependant il est possible que, selon les formes et les doses utilisées, les effets soient différents, car nous avons décrit une génotoxicité uniquement avec de fortes concentrations de chlorure de chrome (Hininger *et al.*, 2007). Une étude rapporte une diminution de l'expression des GST (Glutathion S-transferase) en présence du chlorure de chrome, diminution qui serait impliquée, selon les auteurs, dans l'hépatotoxicité du chlorure de chrome (Roling *et Baldwin*, 2006). Toutefois ces résultats ne sont pas confirmés par Tezuka *et al.* (1991), qui au contraire observent un effet antioxydant.

Parallèlement, dans nos conditions expérimentales, les biomarqueurs du stress oxydant ne sont pas modifiés (Tableau XVI), suggérant donc un effet protecteur d'une préincubation au histidinate de chrome préalablement à un stress H₂O₂.

En conclusion, nous montrons que, à la fois H₂O₂ et l'histidinate de chrome modulent l'expression des gènes. L'exposition de cellules HaCaT à l'histidinate de chrome préalablement à un stress H₂O₂ a un effet antioxydant, évalué par une diminution de l'oxydation lipidique et protéique induite par H₂O₂, et module l'expression de gènes impliqués dans la défense antioxydante et dans la réparation des ADN.

Ces résultats suggèrent que l'histidinate de chrome, en plus de ses effets bien établis sur le métabolisme du glucose et de l'insuline, a également des effets antioxydants. Considérant le rôle du stress oxydatif induit par une hyperglycémie dans l'établissement de l'insulino-résistance, un traitement à l'histidinate de chrome pourrait contrôler simultanément ces deux facteurs de risque du syndrome métabolique.

IX-3-5 - Publication F

Chromium III Histidinate Exposure Modulates Antioxidant Gene Expression in HaCaT Human Keratinocytes Exposed to Oxidative Stress.

Rachida Benaraba^a, Florence Hazane^a, Kita Valenti^b, Mireille Osman^a, Alain Favier^b, Anne-Marie Roussel^a, Richard A. Anderson^c, Isabelle Hininger-Favier^{a*}

^a INSERM, U884, UJF Grenoble, F-38000, France

^b Département de Biologie Intégrée, Centre Hospitalier Universitaire, BP 217, 38043 Grenoble Cedex 09, France

^c USDA, ARS, BHNRC, DGIL ; Bldg. 307C, Rm. 222, BARC-East, Beltsville, MD 20705-2350

* Corresponding author : Isabelle HININGER-FAVIER

Laboratoire NVMC (Nutrition, Vieillesse, Maladies Cardiovasculaires) EA 3746, J, Fourier University, Domaine de la Merci, 38700 La Tronche, France

Tel : +33 (0) 4 76 63 71 81

Fax : + 33 (0) 4 76 63 71 80

e-mail : isabelle.hininger@ujf-grenoble.fr

ABSTRACT

While the toxicity of hexavalent chromium is well established, trivalent Cr (Cr(III)) is an essential nutrient involved in insulin and glucose homeostasis. Recently, antioxidant effects of Cr(III) histidinate (Cr(III)His) were reported in HaCaT human keratinocytes exposed to oxidative stress. The aim of this work was to assess a possible molecular mechanism of these effects by investigating the modulation of antioxidant gene expression by Cr(III)His in HaCaT human keratinocytes submitted to oxidative stress. We used cDNA microarray to identify common batteries of genes implicated and routine methods were performed to measure oxidative stress parameters in the cells as thiobarbituric acid reactants (TBARS) and thiol groups (SH). HaCaT keratinocytes were preincubated with 50 μ M Cr(III)His before and after H₂O₂ treatment (50 μ M). Total RNA was isolated immediately after stress or after 6h. Gene modulation was studied as a function of H₂O₂ and/or Cr(III)His by multiple analyses (n=4). In Cr(III)His exposed cells, transcripts related to antioxidant family were upregulated (AOE372, GSS, SCH1) as POLD2 and FOSB. When cells were preincubated with the Cr(III)His before H₂O₂ an increased expression in genes implicated in oxidative repair (POLD2) and antioxidant defense (GSS) was observed whereas the SOD2 transcript was down-regulated. These results were associated with protective antioxidant effects, assessed by a decrease in TBARS and an increase in SH to combat oxidative stress. In summary, these results show up regulation in antioxidant gene expression in cells exposed to Cr(III)His and help explain the antioxidant effects and the lack of toxicity reported for Cr Histidinate.

Key words: oxidative stress, H₂O₂, Cr(III)His supplementation, gene expression, HaCaT

1. INTRODUCTION

Trivalent chromium (Cr(III)) is an essential trace element that potentiates insulin action and is required for normal lipid and carbohydrate metabolism [1]. Numerous studies have shown beneficial effects of chromium on glucose tolerance and lipid profiles of people with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes [2]. Chromium (III) is widely popular as a dietary supplement and has been reported to increase fat loss and promote lean mass [1]. Cr(III), the most prevalent form in the environment and biological tissues [3], has been regarded as non-toxic and non-genotoxic. The absorption of Cr(III) is low, usually less than 2 percent, and only small amounts enter the nucleus, however, the absorption Cr(VI) is much greater and it readily enters the nucleus and is reduced to the trivalent form [4]. Cr(III) has been shown to produce free radicals in the presence of H₂O₂ or hydroperoxides [5], and has been shown to

induce mutagenicity [6] but contradictory results have been reported. The lack of carcinogenic activity of inorganic Cr(III) complexes is supported by negative results in animal experiments and cellular genotoxicity studies [7]. Furthermore, antioxidant effects of Cr(III) have been described in humans [8]. In addition, in a recent study evaluating the possible toxic effects of Cr(III) on HaCaT cells, we did not observe any deleterious effects of Cr(III) and, moreover, we observed DNA protective effects of Cr(III) histidinate in keratinocytes submitted to H₂O₂-induced oxidative stress [9].

There have been limited studies of the effects of Cr(III) on antioxidant gene expression. To investigate the possible mechanisms through which Cr(III)His could counteract H₂O₂-induced oxidative stress, we used the technology of gene transcripts as potential diagnostic markers for Cr(III)His antioxidant effects. The aim of the present study was to evaluate the effects of Cr(III)His on antioxidant gene expression in basal and oxidative environments using cDNA microarray [10], specific for genes involved in cell defence, oxidative stress, and DNA repair.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Cell culture and H₂O₂ induced stress

HaCaT keratinocytes were incubated in RPMI 1640 medium (Gibco, invitrogen, Grand Island, NY USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco, invitrogen, Grand Island, NY USA) containing penicillin (1.25 U/ml) and streptomycin (0.00125 U/ml) (Roche Diagnostic, France) in 75 cm² flasks (Falcon France) in humidified incubators at 37°C enriched in 5% CO₂. HaCaT were passaged each week (ratio 1:6). 2x10⁶ cells were subcultured in 75 cm² flasks one day before H₂O₂ stress (50 μM hydrogen peroxide (Sigma-Chemicals Co. St Louis MO, USA) in culture medium, 30 min, at room temperature in the dark).

2.2. Cr(III)Histidinate form

Synthesis and absorption of the Cr(III) complexes have been described (Anderson *et al.*, 2004). The chromium histidine complex contained 3 moles of histidine per mole of chromium and the binding of the chromium to the imidazole nitrogen was confirmed using proton and ¹³C NMR. Cr(III)His solution was prepared in RPMI 1640 medium and purified on 0.22 μm filter (Nunc, Brumath, France).

2.3. Cr(III)His plus H₂O₂ induced stress

Cells were subcultured and supplemented as described above. After the stress, cells were washed twice with excess phosphate buffer saline (PBS) (Gibco, invitrogen, Grand Island,

NY USA) and then harvested at 0 h or given fresh growth medium and harvested 6h post-stress. Each experiment included a control group of cells exposed to H₂O₂ at 50 μM without Cr(III)His preincubation. The 50 μM concentration was selected from previous work, showing no toxic effects on cell viability assessed by MTT and because it was associated with a beneficial effect against DNA damage [9].

2.4. H₂O₂ and Cr(III)His evaluation of cytotoxicity

The H₂O₂ and Cr(III)His exposure toxicities were measured by determining the ability of the HaCaT cells to reduce tetrazolium dye, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma-Chemicals Co. St Louis MO, USA). This assay is based on cleavage of the tetrazolium salt, MTT, by mitochondrial succinate dehydrogenase to form a colored soluble formazan complex which is quantified spectrophotometrically at 570 nm. 2 x 10⁵ HaCaT keratinocytes were seeded in 96-well culture plates (Falcon, France). The next day, H₂O₂ solution (50 μM, 100 μM, 150 μM, 200 μM, 5 mM, 1mM, 10 mM) or Cr(III)His solutions (50 nM, 75nM,100nM, 0.4μM,0.64 μM, 1 μM, 25 μM, 50, μM) were added to the wells. For H₂O₂ toxicity, cells were exposed for 30 min, at room temperature in the dark, then wells were washed with excess PBS, cells were fed with fresh culture medium and plates were placed in incubators for 24 h. For Cr(III)His toxicity, cells were supplemented 24 h with Cr(III)His solution. For the MTT test, 10 μl MTT (5 mg/ml stock in PBS) were added to each well and the plates were placed in the incubators for 2 h., 100 μl of dimethylsulfoxide (DMSO) (Merck Hohenbrunn, Germany) were added to dissolve the formazan crystals. The optical density was measured at 570 nm with a multiplate reader (Multiskan, Labsystem, Cergy Pontoise, France). The absorbance is proportional to viable cell number and survival was calculated as the percentage of the staining values of untreated cultures.

2.5. Total RNAs preparation and control quality

After the Cr(III)His supplementation and/or H₂O₂ stress, cells were harvested immediately (0h) or at 6h. The cells were washed twice with excess phosphate buffer saline, and disaggregated with 2.5% trypsin (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY USA), 5 min, 37°C. Cell suspensions were centrifuged, 1200 rpm, 5 min, 4°C, washed with PBS and this operation was repeated twice. Pellets were frozen in liquid nitrogen and placed at -80°C until total extraction was performed. Total RNAs were extracted with RNeasy® MiniKit (Qiagen, Saint Louis, USA) according to the manufacturer's recommended protocol. The amount and purity of each RNA sample were determined by Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Massy,

France). Briefly, total RNA concentrations were measured spectrophotometrically at 260 and then, samples were diluted in Tris-HCl, 0.1 M (Sigma-Chemicals Co. St Louis MO, USA) to obtain a concentration between 25 and 500 ng/μl. Samples and molecular weight markers (RNA 6000 Ladder, Agilent Technologies, Massy, France) were denatured 2 min, 70°C, and then placed in ice. 5 μl buffer and 1 μl sample were deposited in each well. Migration was performed (100 V, 30 min) and samples quantity and quality were determined.

2.6. Preparation of microarray

Choice of genes, bacteria culture, EST amplification, nylon microarray preparation, cDNA synthesis, radioactive labeling, hybridization, washing and image acquisition were as described [Hazane et al, 2004]. Briefly, genes tested were represented by 82 cDNA clones corresponding to the 3' end of the mRNA of antioxidant enzymes (n=21), DNA repair (n=32), tumor suppressive genes or associated family (n=9), protooncogene family or associated (n=7), extracellular matrix related genes (n=5), inflammatory or immune response family (n=3) and house keeping genes n=(5). For ESTs amplification, bacteria were cultured, 37°C, 200 rpm, in a shaking incubator for 12h. The bacterial suspension was centrifuged and the pellet was resuspended in 10ml sterile water to lyse bacteria and release the plasmid clones. 10μl of this suspension were used for EST amplification.

The cDNA clones were amplified by PCR and the identity of each clone was checked. Finally, PCR products were purified, quantified and adjusted to a concentration of 200 ng/μl with milliQ water. At this concentration, PCR were spotted onto N+ membranes (Hybon + Amersham Biosciences, Orsay, France) using the solid-pin micro spotting arrayer, GMS 417 (MWG Biotech, Courtaboeuf, France). After spotting, nylon membranes were denatured, neutralized and a UV treatment cross linked the DNA to the membranes.

Labeled cDNAs were prepared from total RNA (5 μg) by reverse transcription with incorporation of [$\alpha^{33}\text{P}$]dCTP and oligo dT25 as primers. Before reverse transcription, total RNAs were treated with DNase. Template RNA was degraded. Labeled cDNA was neutralized and denatured before hybridization. Arrays were pre-hybridized and hybridizations were performed in a volume of 500 μl. Arrays were washed, allowed to air dry and were placed in a Fujifilm BAS Cassette 2025 (Raytest, Courbevoie, France) for 48 h.

Image acquisition was performed using the phosphorimager BAS 5000 (Raytest, Courbevoie, France). Signal was quantified by Image Gauge 4.0 software (Raytest, Courbevoie, France).

2.7. Data normalization, analysis and statistical comparisons

The data were evaluated to analyze gene expression. First, we subtracted the signal background at each spot level and identified visually each spot to exclude artifacts. For each array, spots associated with a signal inferior to the mean background were considered as non-detectable. Signals were normalized by dividing all signals with the mean value of house keeping genes signals. GAPDH, BACT and RPL32 were retained, whereas HPRT and PLA2G5 were excluded, because of too weak expression intensity and non-detected on the array.

2.8. Protein oxidation

Plasma thiol groups (-SH) were assayed as described by Faure and Lafond (1995) [11]. The calibration was obtained from a stock solution of 100 mM N-acetyl cysteine (NAC, Sigma-Chemicals Co. St Louis MO, USA) in the range of 0.125 to 1 mM. Standards and cell samples (200 μ l of cell homogenates) were diluted in phosphate buffer 0.05 M, EDTA 1 mM, pH 8 and DTNB, 2.5 mM, and absorbance measured at 412 nm (Hitachi 704, Roche Diagnostics, France).

2.9. Lipid oxidation

Plasma Thiol Barbituric Acid Reactive Species (TBARS) concentrations were assessed as described by Richard *et al.* (1992) [12]. Briefly, lipid peroxidation was assayed by fluorimetry, by measuring TBARS after butanol extraction (Prolabo, Fontenay Sous Bois, France) using a standard curve (1,1,3,3-tetra ethoxy propane) (Sigma-Chemicals Co. St Louis MO, USA). A 750 μ l mix of thiobarbituric acid/perchloric acid 7 % (Merck Hohenbrunn, Germany) was added to 100 μ l samples. The resultant mix was capped and incubated at 95°C for 1 h and then cooled in ice. Fluorescent compounds were extracted by butanol, 2 min. After centrifugation, fluorescence was determined (Hitachi 540500, Tokyo, Japon) (λ_{ex} = 532 nm, λ_{e} =553 nm).

2.10. Statistical analyses

Statistical analyses of the data were performed by analysis of variance. Comparisons were identified using the ANOVA test (Statistica software). Unifactorial and bifactorial ANOVA were used to evaluate H₂O₂ and Cr(III)His treatments individually and combined, respectively, on each gene expression profile. Values were expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. RESULTS

The results were obtained from a data set of 4 experiments. Each experiment contained control (HaCaT without H₂O₂ treatment or Cr(III)His supplementation), HaCaT stressed with 50 μM H₂O₂, HaCaT supplemented by 50 μM Cr(III)His, and HaCaT pretreated by 50 μM Cr(III)His and exposed to 50 μM H₂O₂. Total RNA was isolated at two different times (0h and 6h) post Cr(III)His supplementation and/or H₂O₂ stress.

3.1. Transcript profile

Before analyzing Cr(III)His and H₂O₂ treatment effects on gene expression changes, we focused our attention on the transcript profile of the HaCaT keratinocytes by the edition of transcripts seldom and normally detected. The results for transcripts seldom detected are illustrated in Table 1. All gene families were represented. Twenty five transcripts were not detected out of 82 spotted. The most represented families were DNA repair (n=6 out of 32 spotted) and antioxidant (n=6 out of 21 spotted). All transcripts (n=3) from extracellular matrix regulator family, specific to cells as fibroblasts [10], were not detected.

Transcript PLA2G5 related to house keeping family (n=5) was also not detected and excluded from the data analyses.

Table 2 shows transcripts normally detected; six transcripts out of 82 spotted were always detected. GPX1 and TXN transcripts related to antioxidant enzyme family (2 out of 21 spotted), house keeping genes BACT, GAPDH and RPL32 (3 out of 5 spotted), DNA repair transcript XPC (1 out of 32 spotted) were among the most expressed transcripts.

3.2. Effects of H₂O₂ stress on gene expression changes in HaCaT

It is apparent that few genes showed marked differences in expression as a consequence of H₂O₂ treatment. Four transcripts belonging to antioxidant family (SOD1, AOE372, SCH1 and GSS) and one related to protooncogene family (FOSB) were modulated by H₂O₂ treatment as shown in Fig.1.

Concerning the transcript of SOD1, known to detoxify cells from superoxide anion, reviewed in [13], there is a tendency to increase at the end of exposure and significantly 6h after the stress (p<0.05). Expression of transcript AOE372, an antioxidant thioredoxin-dependent peroxidase, increased significantly immediately after the H₂O₂ treatment (p<0.05) and the level was maintained 6h after (p<0.1). The transcript of SCH1, known as p66^{Sch}, increased significantly immediately after H₂O₂ stress (p<0.05) and this level was maintained for 6h (p<0.1).

The transcript of GSS, involved in glutathione synthesis [14], increased immediately after the H₂O₂ treatment and a significant depletion of GSS was observed 6h after the stress *versus* 0h .

The FOSB transcript expression was transient. The FOSB transcript was not detected at the basal state, increased at 0h (p<0.05) and decreased 6h after the stress (p=0.07).

3.3. Effects of cells exposure to Cr(III)His on gene expression in HaCaT

Few transcripts were significantly modulated with Cr(III)His in HaCaT cells. Indeed, we noted that five transcripts were significantly modulated by chromium exposure as shown in Fig.2. Among those transcripts, three of them were related to antioxidant family (AOE372, GSS and SHC1), one related to DNA repair family (POLD2) and one belonging to protooncogene family (FOSB). The transcripts of AOE372, GSS, SCH1, FOSB and POLD2 increased significantly with Cr(III)His exposure (p<0.05).

3.4. Effects of cells exposure to Cr(III)His and H₂O₂ stress on gene expression in HaCaT

Only three genes were expressed when cells were previously treated by Cr(III)His and then exposed to H₂O₂ stress (Fig.3). The level transcript of GSS, downregulated 6h after H₂O₂ treatment was upregulated 6h after H₂O₂ treatment in cells supplemented by Cr(III)His for 24h (p<0.05). The transcript of POLD2, was upregulated 6h after H₂O₂ treatment in cells supplemented by Cr(III)His for 24h *versus* cells not pretreated with Cr(III)His (p<0.05) indicating that Cr(III)His enhanced the level of expression of these two transcripts. On the contrary, the SOD2 transcript was down regulated by Cr(III)His followed by H₂O₂ treatments (6h) *versus* 6h H₂O₂-treated cells (p<0.05). The Cr(III)His supplementation also caused a deficit in the SOD2 transcript expression.

3.5. Protective effects of cells exposed to Cr(III)His against H₂O₂ stress on thiol groups and TBARS

To determine the effects of Cr(III)His against H₂O₂-mediated oxidative stress, we compared the concentrations of the thiol groups and TBARS in HaCaT cells supplemented with Cr(III)His and treated with H₂O₂. Cells were pretreated with 50 µM Cr(III)His for 24h, then exposed to 50 µM H₂O₂, and harvested immediately after the stress. When cells were incubated with Cr(III)His alone, we observed no effects on oxidative markers: SH groups concentrations were not modified compared with control (71.06 µmol/g prot *versus* 77.99 µmol/g prot in control) or in TBARS (Table 3). In contrast, H₂O₂ induced an oxidative stress assessed by decreased thiol groups (53.48 µmol/g prot *versus* 77.99 µmol/g prot in control, p=0.04) and increased TBARS (0.17 µmol/g prot *versus* 0.11 µmol/g prot in the control; p=0,04).

When cells were pre-incubated with Cr(III)His in presence of H₂O₂, we observe a protective effect of Cr(III)His and the data were not different from control for thiols and TBARS.

4. DISCUSSION

In a previous study, using the comet assay, we demonstrated that Cr(III)His prevented the peroxide-induced genotoxicity in HaCaT cells [9]. In this study, we evaluated the effects of Cr(III)His and H₂O₂ on gene expression, particularly antioxidant enzymes. We were particularly interested in genes responding rapidly since previous studies demonstrated that several genes were induced in HaCaT cells between 4h and 6h after an oxidative stress, particularly those implicated in reparative, protective or apoptotic functions [15,16]. In the HaCaT transcript profile, 25 transcripts were not detected. The most representative family was related to antioxidant enzymes (7 out of 17 spotted). Transcripts associated with extracellular matrix regulator family (ECM), particularly specific for fibroblasts [17,18], were not detected in HaCaT cells. Only 6 transcripts out of 81 spotted were always detected (Table 2) and 3 families were represented: antioxidant, house keeping genes and DNA repair. Glutathione peroxidase 1 (GPX1) is implicated in the cell detoxification of hydrogen peroxide and thioredoxin (TXN) is an oxidoreductase enzyme containing a dithiol-disulfide active site. The transcript of Xeroderma pigmentosum C (XPC) was highly expressed under all conditions tested. A recent study [19] showed that XPC plays multifaceted roles in cell protection from oxidative DNA damage in cutaneous cells and in absence of XPC, a decrease in the repair rate of 8-OH-dG was observed. All together, these data show that keratinocytes transcriptional profile includes expression of GPX1, TXN and XPC transcripts to protect cells from oxidative damage.

Five transcripts were differentially regulated by H₂O₂ treatment in HaCaT cells (Fig.1). Three of them were related to antioxidant enzymes (SOD1, AOE372 and GSS), suggesting that H₂O₂ induces antioxidant response to prevent oxidative stress. The induced-response may not be sufficient to prevent an oxidative stress since H₂O₂ exposure induced significant increases of lipid oxidation assessed by a higher TBARS and by depletion of SH groups (Table 3). In response to H₂O₂-induced oxidative stress, the cells displayed a protective response by an over expression of the antioxidant enzymes, SOD1, AOE372, and GSS.

SOD1 converts free superoxide radicals in molecular oxygen and hydrogen peroxide. GSSG is a homodimer that catalyzes the second step of glutathione (GSH) biosynthesis. GSH is important for a variety of biological functions including cell protection from oxidative stress. The protein encoded by AOE372 gene is an antioxidant enzyme and belongs to the peroxyre-

doxin family; the protein is localized to the cytoplasm. Peroxidases of the peroxyredoxin family reduce hydrogen peroxide and alkyl hydroperoxides to water and alcohol with the use of reducing equivalents derived from thiol-containing donor molecules. This protein has been found to play a regulatory role in the activation of the transcription factor NF-kappaB cellular protection against oxidative stress, modulation of intracellular signaling cascades that utilize hydrogen peroxide as a second messenger molecule, and regulation of cell proliferation. Considering the key role of these enzymes to eliminate H₂O₂ and ROS, their over expression is in accordance with our experimental conditions. Furthermore, in agreement with our results, AOE372 protein was found upregulated after an oxidative stress in HaCaT cells [20].

FOSB is identified as a mediator of oxidative stress pathway by its ability to activate nuclear genes in response to oxidative stress [21]. We found that the FOS transcript was also increased immediately after the stress, suggesting that H₂O₂ stress induces the redox signaling pathway, associated with an increased risk of cell proliferation. The increased expression of FOSB was transient, and it returned to control values 6 h after the stress, suggesting that our stress conditions induced rapid activation of redox signaling pathway.

SCH1, known as p66sch, is postulated to be at the crossroad of oxidative stress and the genetics of aging [22]. It plays a crucial role in the regulation of oxidative stress responses and Migliaccio *et al.*, [23] showed that the ablation of the p66^{sch} gene boosted cellular resistance to apoptosis induced by hydrogen peroxide. In our study, SCH1 transcript was induced immediately after H₂O₂ stress and was maintained for 6h. This is in accordance with numerous studies showing that p66sch1 expression is increased by oxidative stress [24].

In this study, we showed that antioxidant enzymes were upregulated by H₂O₂-induced oxidative stress, whereas a study of Isoir *et al.* showed that GSR, GST and GPX were decreased after gamma rays-mediated oxidative stress on HaCaT cells [20]. It can be speculated that this discrepancy was related to the concentration of ROS delivered since ROS are higher after gamma ray exposure than in H₂O₂ treatment, at the levels we used.

When cells were incubated with Cr(III)His, there was an up-regulation of many transcripts related to antioxidant enzymes such as AOE372, GSS, SHC1 and to other families such as FOSB and POLD2 (Fig.2.). The up-regulation on antioxidant genes with chromium could explain partly our previous results showing a decrease on 8-OHdG on HaCaT cells after Cr(III)His exposure [9] but this regulation is not related to modifications of oxidative parameters (TBARS and SH groups) suggesting a specific role at the DNA level (Table 3) or differences in sensitivity of analyses.

Cr(III)His induced POLD2 transcript expression. The POLD protein is a heterodimer with subunits of 125 and 50 KDa. The 125-KDa subunit possesses proof reading activity [25] and is involved in replication and repair of DNA [26] while the 50 K-Da subunit (POLD2) is the regulatory subunit. It has been reported that high concentrations of Cr(III) lead to the production of DNA-DNA cross-links and inhibition of polymerase activity [27]. Moreover, a study reported that nucleotide excision repair (NER) was involved in the protection of cells by the removal of Cr(III)-DNA adducts [28], leading to activation of polymerases activities. Nevertheless, low concentrations of Cr(III) (micromolar) can substitute for Mg^{2+} and activate DNA polymerase [29]. The increase of POLD2 activity might be related to this since we did not observe a genotoxic effect of Cr(III)His on HaCaT by the Comet Assay [9].

When cells were submitted to H_2O_2 -induced oxidative stress, the pretreatment of cells with Cr(III)His prevented the damaging effects of H_2O_2 on SH groups and TBARS, suggesting that Cr(III)His acts as an antioxidant under these conditions. An antioxidant effect of Cr(III)His was previously described in people with diabetes supplemented with chromium [8]. This protective effect could be related to the over expression of antioxidant genes (Fig.3), such as GSS, POLD2, whereas SOD2, which participates to an increase in H_2O_2 production, was down-regulated. SOD2 is usually used as a marker for oxidative stress as its expression is increased under oxidative conditions [15]. Decreased SOD2 by Cr(III)His may reflect its antioxidant properties including the over expression of GSS and POLD2. Our results were not in accordance with a recent study [30] reporting a deleterious effect of Cr(III) but this toxic effect was observed during bioremediation of chromium through the reduction of hexavalent Cr and not with only trivalent Cr. Finally another study [31], reported a toxic effect of Cr as $CrCl_3$ evaluated by a down regulation of expression in several glutathione S-transferases in liver, but this result was not in agreement with others studies on hepatocytes which reported antioxidant effects of Cr chloride [32]. We didn't observe an effect of Cr(III)His on glutathione S-transferases but it is possible that the use of different forms and doses of chromium could be partly explain these discrepancies between studies since we reported increased DNA damage only with high dose of $CrCl_3$ [9].

In conclusion, H_2O_2 and Cr(III)His induced gene modulation. Addition of Cr(III)His before H_2O_2 stress had antioxidant effects illustrated by the decreased TBARS and increased thiol groups and modulation of gene expression in favor of antioxidant and DNA repair enzymes. These data suggest that, in addition to its effects on glucose and insulin metabolism, Cr(III)His has protective antioxidant effects.

REFERENCES

- [1] R.A. Anderson, Nutritional factors influencing the glucose/insulin system: chromium, *J Am Coll Nutr.* 5 (1997) 404-410.
- [2] R.A. Anderson, Chromium, glucose intolerance and diabetes, *J Am Coll Nutr.* 6 (1998) 548-555.
- [3] M. Sugiyama, K. Tsuzuki, R. Ogura, Effect of ascorbic acid on DNA damage, cytotoxicity, glutathione reductase, and formation of paramagnetic chromium in Chinese hamster V-79 cells treated with sodium chromate(VI), *J Biol Chem.* 6 (1991) 3383-3386.
- [4] Y.D. Wei, K. Tepperman, M.Y. Huang, M.A. Sartor, A. Puga, Chromium inhibits transcription from polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible promoters by blocking the release of histone deacetylase and preventing the binding of p300 to chromatin, *J Biol Chem.* 6 (2004) 4110-4119. Epub 2003 Nov 4118.
- [5] X. Shi, N.S. Dalal, K.S. Kasprzak, Generation of free radicals from hydrogen peroxide and lipid hydroperoxides in the presence of Cr(III), *Arch Biochem Biophys.* 1 (1993) 294-299.
- [6] V. Voitkun, A. Zhitkovich, M. Costa, Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells, *Nucleic Acids Res.* 8 (1998) 2024-2030.
- [7] S. De Flora, M. Bagnasco, D. Serra, P. Zancchi, Genotoxicity of chromium compounds. A review, *Mutat Res.* 2 (1990) 99-172.
- [8] R.A. Anderson, A.M. Roussel, N. Zouari, S. Mahjoub, J.M. Matheau, A. Kerkeni, Potential antioxidant effects of zinc and chromium supplementation in people with type 2 diabetes mellitus, *J Am Coll Nutr.* 3 (2001) 212-218.
- [9] I.Hininger, R. Benaraba, M. Osman, H. Faure, A.M Roussel A, R.A Anderson. Safety of trivalent chromium complexes: No evidence for DNA damage in human HaCaT keratinocytes, *Free Radic Biol Med.* 42 (2007) 1759-65.
- [10] F. Hazane, K. Valenti, S. Sauvaigo, A. Peinnequin, C. Mouret, A. Favier, J.C. Beani, Ageing effects on the expression of cell defence genes after UVA irradiation in human male cutaneous fibroblasts using cDNA arrays, *J Photochem Photobiol B.* 3 (2005) 171-190.

- [11] P. Faure, J. L. Lafond, Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier, A. E.; Cadet, J.; Kalnyanaraman, M.; Fontecave M. and Pierre J. L., Eds. *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Basel, Boston, Berlin: Birkäuser Press; 1995:237-48
- [12] M.J. Richard, P.Guiraud, J. Meo, A. Favier : High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J Chromatogr* 577 (1992) 9-18.
- [13] F. Johnson, C. Giulivi, Superoxide dismutases and their impact upon human health, *Mol Aspects Med.* 4-5 (2005) 340-352.
- [14] H.J. Forman, D.A. Dickinson D.A. Oxidative signaling and glutathione synthesis biofactors 17 (2003) 1-12.
- [15] A. Sesto, M. Navarro, F. Burslem, J.L. Jorcano, Analysis of the ultraviolet B response in primary human keratinocytes using oligonucleotide microarrays, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 (2002) 2965-2970. Epub 2002 Feb 2926.
- [16] K.M. Lee, J.G. Lee, E.Y. Seo, W.H. Lee, Y.H. Nam, J.M. Yang, S.H. Kee, Y.J. Seo, J.K. Park, C.D. Kim, J.H. Lee, Analysis of genes responding to ultraviolet B irradiation of HaCaT keratinocytes using a cDNA microarray, *Br J Dermatol.* 1 (2005) 52-59.
- [17] V.M. Kahari, U. Saarialho-Kere, Matrix metalloproteinases in skin, *Exp Dermatol.* 5 (1997) 199-213.
- [18] L.W. Toy, Matrix metalloproteinases: their function in tissue repair, *J Wound Care.* 1 (2005) 20-22.
- [19] M. D'Errico, E. Parlanti, M. Teson, B.M. de Jesus, P. Degan, A. Calcagnile, P. Jaruga, M. Bjoras, M. Crescenzi, A.M. Pedrini, J.M. Egly, G. Zambruno, M. Stefanini, M. Dizdarglu, E. Dogliotti, New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage, *Embo J.* 18 (2006) 4305-4315. Epub 2006 Sep 4307.
- [20] M. Isoir, V. Buard, P. Gasser, P. Voisin, E. Lati, M. Benderitter, Human keratinocyte radiosensitivity is linked to redox modulation, *J Dermatol Sci.* 1 (2006) 55-65. Epub 2005 Dec 2019.
- [21] B.P. Yu, H.Y. Chung, Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging, *Mech Ageing Dev.* 5 (2006) 436-443. Epub 2006 Feb 2023.

- [22] S. Purdom, Q.M. Chen, p66(Shc): at the crossroad of oxidative stress and the genetics of aging, *Trends Mol Med.* 5 (2003) 206-210.
- [23] E. Migliaccio, M. Giorgio, S. Mele, G. Pelicci, P. Reboldi, P.P. Pandolfi, L. Lanfrancone, P.G. Pelicci, The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals, *Nature.* 6759 (1999) 309-313.
- [24] S. Pandolfi, M. Bonafe, L. Di Tella, L. Tiberi, S. Salvioli, D. Monti, S. Sorbi, C. Franceschi, p66(shc) is highly expressed in fibroblasts from centenarians, *Mech Ageing Dev.* 8 (2005) 839-844. Epub 2005 Apr 2008.
- [25] L. Zhao, L.S. Chang, The human POLD1 gene. Identification of an upstream activator sequence, activation by Sp1 and Sp3, and cell cycle regulation, *J Biol Chem.* 8 (1997) 4869-4882.
- [26] U. Hubscher, H.P. Nasheuer, J.E. Syvaaja, Eukaryotic DNA polymerases, a growing family, *Trends Biochem Sci.* 3 (2000) 143-147.
- [27] E.T. Snow, L.S. Xu, Chromium(III) bound to DNA templates promotes increased polymerase processivity and decreased fidelity during replication in vitro, *Biochemistry.* 47 (1991) 11238-11245.
- [28] T.J. O'Brien, B.R. Brooks, S.R. Patierno, Nucleotide excision repair functions in the removal of chromium-induced DNA damage in mammalian cells, *Mol Cell Biochem.* 1-2 (2005) 85-95.
- [29] E.T. Snow, Effects of chromium on DNA replication in vitro, *Environ Health Perspect.* 17 (1994) 41-44.
- [30] R. Bencheikh-Latmani R, Obratsova A, Mackey MR, Ellisma, MH, Tebo BM. Toxicity of Cr(III) to *Shewanella* sp. strain MR-4 during Cr(VI) reduction. *Environ Sci Technol.* 41 (2007) 214-20
- [31] J.A. Roling, W.S. Baldwin, Alterations in hepatic Gene expression by trivalent chromium in *fundulus heteroclitus*. *Mar. Environ. Res.* 62 (2006), S122-S127.
- [32] M. Tezuka, K. Momiyama, T. Edano, S. Okada, Protective effect of chromium(III) on acute lethal toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *J Inorg. Biochem.* 42 (1991) 1-8.

FIGURES AND LEGENDS

Fig. 1. Transcripts differentially regulated by H₂O₂ treatment in HaCaT cells. Cells were submitted to 50 μM H₂O₂ treatment, 30 min, 37°C, and were harvested immediately (0h) or 6h after the treatment. Results are represented by the mean ± SD of 12 analyzed microarrays (control, non stressed, n=4; stressed and harvested immediately after H₂O₂ treatment, n=4; stressed and harvested 6h after H₂O₂ treatment, n=4). **p<0.05 and *p<0.01.

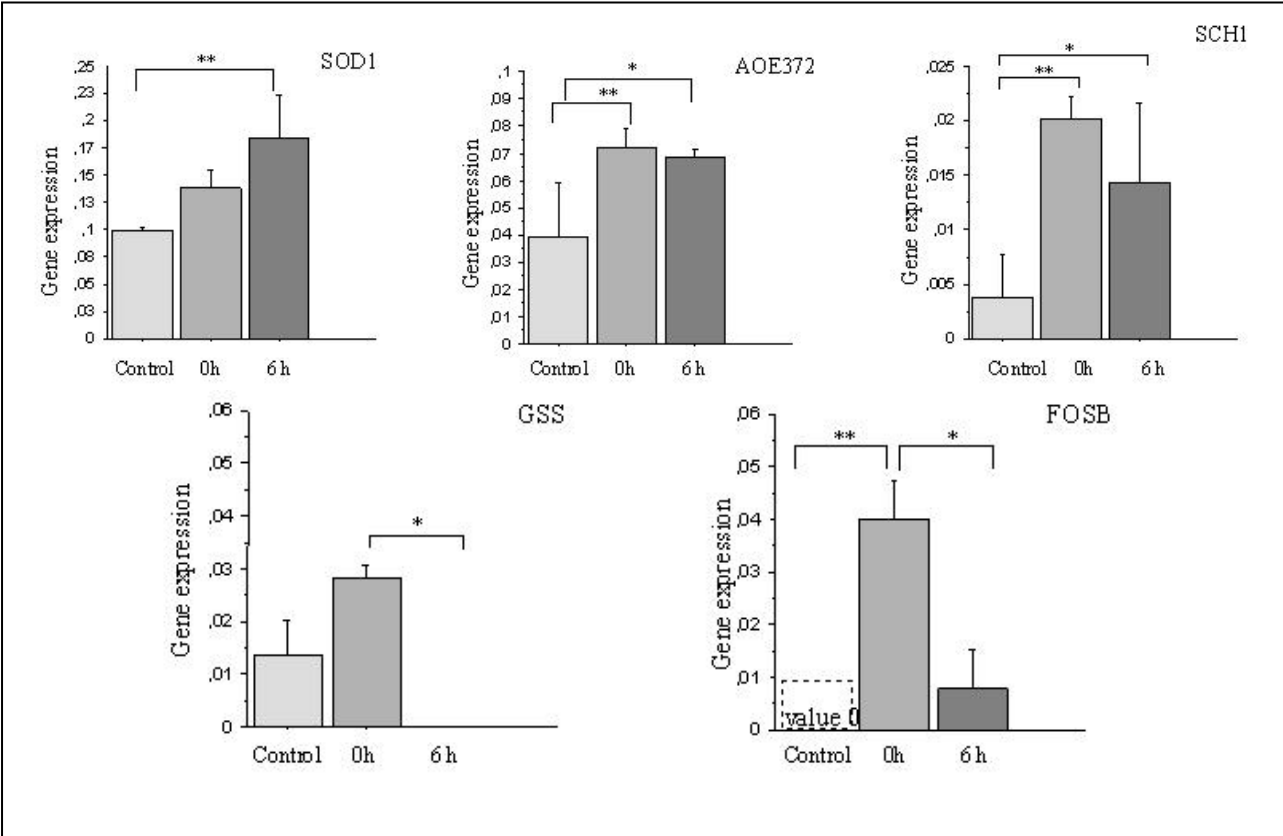


Fig. 2. Transcripts differentially regulated by Cr(III)His treatment in HaCaT cells. Cells were submitted to 50 μ M Cr(III)His treatment, 24h, 37°C. Results are represented by the mean (\pm SD) of 8 analysed microarrays (control, non stressed, n=4; treated with Cr(III)His, n=4). **p<0.05.

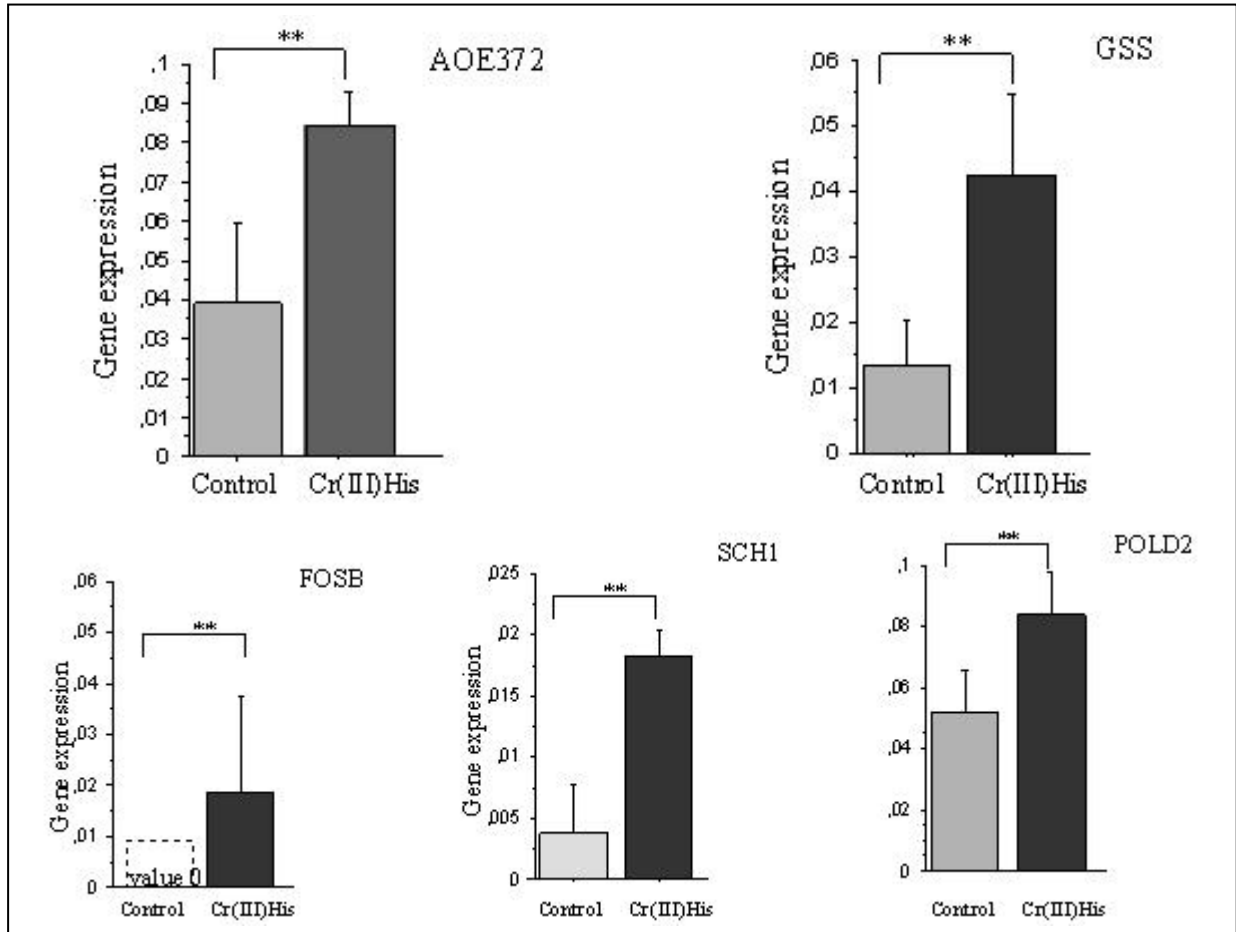


Fig. 3. Transcripts differentially regulated by Cr(III)His plus H₂O₂ treatments in HaCaT cells. Cells were submitted to 50 μM Cr(III)His treatment, 24h, 37°C and were treated with 50 μM H₂O₂, 30 min, 37°C. Results are represented by the mean (± SD) of 16 analysed microarrays (control, non stressed, n=4; treated with Cr(III)His, n=4; stressed and harvested 6h after H₂O₂ treatment, n=4; treated with Cr(III)His *plus* H₂O₂ and harvested 6h after H₂O₂ treatment, n=4). **p<0.05.

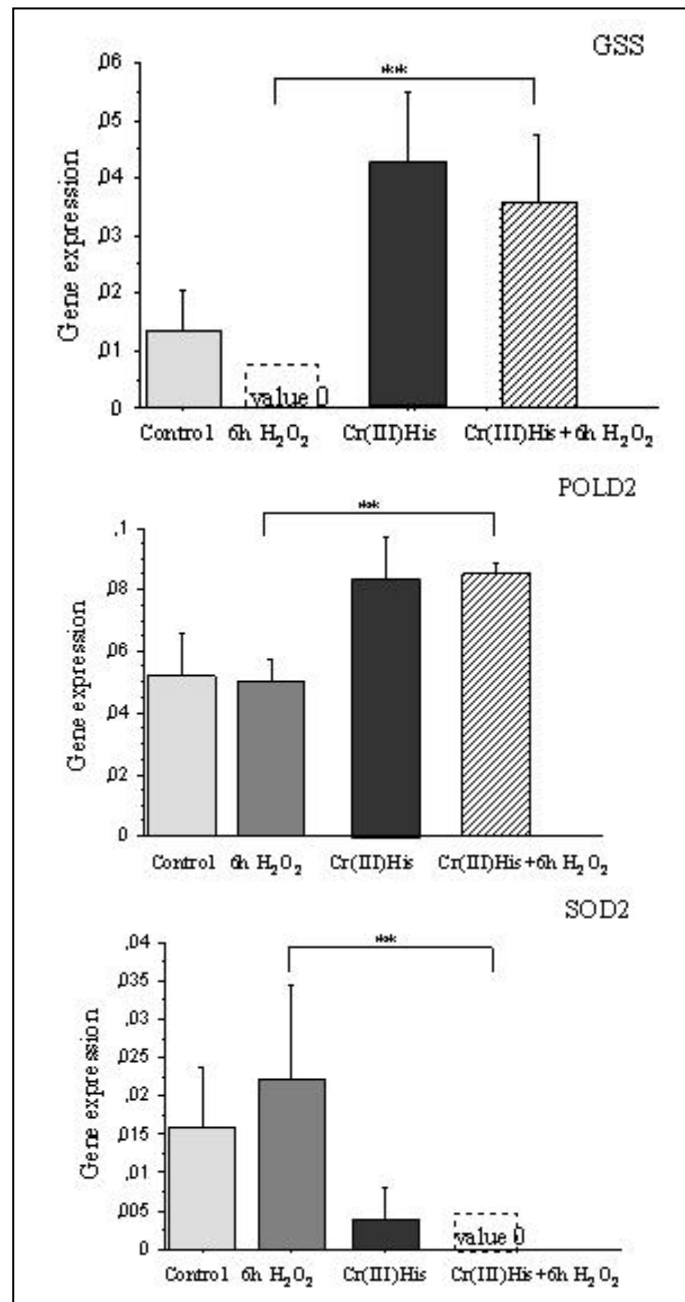


Table 1: Transcripts not detected on the microarray under our experimental conditions (n=16)

Gene name	GenBankID
Antioxydant family	
Catalase CAT	AI076597
Fructose 1-6-biphosphatase FBP1	AI6774572
Glutathione reductase GSR	AA574223
Glutathione S-transferase A4 GSTA4	AI125246
Glutathione S-transferase M5 GSTM5	AI239656
ZnCuSOD extracellular SOD3	AI015650
Inflammatory or immune system family	
Interleukin 15 IL15	AI379606
Melanoma growth stimulating activity alpha GRO1	W46900
Monocyte chemotactic protein SCYA2 MCP1	AA047236
DNA Repair family	
Adenomatous polyposis coli protein APC	AW000963
Cockayne syndrome 1 CKN1	AI078139
Homo sapiens excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 2 ERCC2/XPD	AI918117
Homo sapiens excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 4 ERCC4	AA770518
Radiation sensitive abnormal 52 RAD52	AI056288
Extracellular matrix regulator family	
InterCellular Adhesion Molecule I (CD54) ICAM1	AI656039
Interstitial collagenase MMP1	AI038497
Stromelysin 1 MMP3	AI281285
Matrilysin MMP7	AI095584
Tumor suppressive or associated family	
Caspase 1 CASP1	AI695109
Growth arrest factor 1 GAS1	AI400635
Growth arrest factor 2 GAS2	AI758363
p53	AI660717
Ageing related family	
Telomerase associated protein TEP1	AW025109
House keeping genes	
Phospholipase A2, group V PLA2G5	AI051138

Table 2: Transcripts always detected under our experimental conditions (n=16 experiments).

Gene name	Gene name
<u>Antioxidant family</u>	
Glutathione peroxydase 1 GPX1	AI218741
Thioredoxin TXN	W95350/W95392
<u>House keeping genes</u>	
Beta actine BACT	R97461/R97417
GAPDH	AA021601/AA021106
Ribosomal protein 32 RPL32	AI193187
<u>DNA repair family</u>	
Pigmentosum C Xerodema XPC	AW009176

Table 3: Concentrations of SH groups ($\mu\text{mol/g prot}$) and TBARS ($\mu\text{mol/g protein}$) in Ha-CaT keratinocytes cells as a function of $50 \mu\text{M Cr(III)His}$ plus $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ treatments.

Values that do not share the same superscript^{a,b} are significantly different $p < 0.04$.

Values that do not share the same superscript^c are significantly different at $p < 0.02$.

	Control	H ₂ O ₂	Cr(His)III	Cr(His)III +H ₂ O ₂
SH $\mu\text{mol/g prot}$	77.99 ± 5.88^a	$53.48 \pm 5,34^b$	$71.06 \pm 8.96^{a,c}$	$62.57 \pm 7,93^c$
TBARS $\mu\text{mol/g prot}$	0.11 ± 0.03^a	0.17 ± 0.02^b	0.10 ± 0.05^a	0.11 ± 0.01^a

Table 4 : This table summarizes the main results obtained by the microarray on the effects of i) 50 μ M H₂O₂ treatment ii) treatment by 50 μ M Cr(III)His and iii) Cr(III)His pretreatment followed by H₂O₂ stress.

H₂O₂ treatment effect <i>versus</i> control	0 h	6 h
SOD 1		↑↑ (p=0.0217)
AOE372	↑↑ (p=0.05)	↑ (p=0.08)
SCH1	↑↑ (p=0.0302)	↑ (p=0.1)
GSS		↓↓ vs 0h (p=0.024)
FOSB	↑↑ (p=0.03)	↓ vs 0h (p= 0.07)
CrHis effect <i>versus</i> control		
AOE372	↑↑ (p=0.01)	
GSS	↑↑ (p=0.0201)	
SCH1	↑↑ (p=0.0515)	
POLD2	↑↑ (p=0.6)	
FOSB	↑↑ (p=0.045)	
Differential gene expression between H₂O₂ treatment and H₂O₂ treatment preceded by CrHis supplementation	0 h H₂O₂ <i>versus</i> 0 h CrHis +H₂O₂	6 h H₂O₂ <i>versus</i> 6 h CrHis + H₂O₂
POLD2		↑↑ (p=0.04)
SOD 2		↓ (p=0.06)
GSS		↑↑ (p=0.006)

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

X - Discussion générale et perspectives

L'incidence du syndrome métabolique est une conséquence de l'épidémie mondiale d'obésité et de facteurs environnementaux au premier rang desquels les facteurs nutritionnels (régime "cafétéria"). Elle ne cesse d'augmenter dans les pays industrialisés, entraînant des risques accrus de diabètes et de maladies cardiovasculaires. La prévention nutritionnelle du syndrome métabolique apparaît donc comme un de nos enjeux importants de Santé publique.

La découverte récente des relations étroites entre l'insulino résistance, signe majeur du syndrome métabolique, et le stress oxydant devrait conduire à considérer les nutriments, à la fois antioxydants et potentiellement insulino sensibilisateurs, comme des facteurs nutritionnels de choix dans la stratégie de prévention du syndrome métabolique.

Parmi ces facteurs, trois microconstituants de notre alimentation ont retenu notre attention. Deux appartiennent à la famille des polyphénols (cannelle et thé), le troisième (chrome³⁺) est un oligoélément essentiel au métabolisme glucidique. La cannelle avait été identifiée comme agissant sur la cascade de signalisation de l'insuline en potentialisant son action, le thé montrait des propriétés antioxydantes, et le chrome était décrit comme potentialisateur de l'insuline et antioxydant sans que, cependant, le mécanisme de l'effet antioxydant ait été décrit.

L'objet de cette thèse a été, en apportant les données manquantes, de démontrer la complémentarité d'action de ces trois nutriments quant à leur effet protecteur dans le syndrome métabolique.

X-1 - Principaux résultats

Nous avons montré, sur modèle animal, que les extraits de **thé vert**, riches en épigallocatechine gallate EGCG, non seulement exerçaient une protection antioxydante sur les principales cibles impliquées dans les complications oxydatives du diabète (lipides, protéines et acides nucléiques) comme décrit dans la littérature, mais étaient également de puissants modulateurs des métabolisme glucidiques et lipidiques, effets encore peu décrits à ce jour dans le syndrome métabolique. De plus, nous avons approfondi le mécanisme sous-jacent à cette action, en montrant que les extraits de thé vert activaient la cascade de signalisation de l'insuline et modifiaient l'expression des gènes impliqués dans son métabolisme.

En ce qui concerne la **cannelle**, ses effets potentialisateurs de l'insuline avaient été décrits *in vitro* sur culture cellulaire, mais nous n'avons pas de données sur les propriétés antioxydantes des extraits de cannelle. Chez l'animal comme chez l'homme, des effets significatifs sur les paramètres biologiques du stress oxydant ont été obtenus. Chez l'homme comme chez l'animal, les régimes comportant des extraits aqueux de cannelle exercent une protection antioxydante, et une corrélation avec la régulation de la glycémie a été trouvée.

Pour le thé, comme pour la cannelle, un mécanisme d'action anti inflammatoire pourrait également contribuer aux effets constatés. En effet, dans l'obésité, un processus inflammatoire est observé dans les adipocytes (Canello et Clément, 2006) générant un stress oxydant. Or, les extraits de thé vert (Publication B) comme ceux de cannelle (Cao et al, 2007b) régulent l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation.

La première partie de ce travail, qui focalisait sur l'étude de sources alimentaires de polyphénols, faciles à mettre en œuvre et dépourvues d'effets secondaires, conforte donc notre hypothèse selon laquelle une prévention efficace du syndrome métabolique doit s'appuyer sur des apports en antioxydants qui modulent également l'insulino résistance. Cette constatation s'accorde avec des résultats similaires observés avec la Metformine, puissant régulateur de l'insulinorésistance dont l'effet antioxydant a été également décrit (Faure *et al.*, 1999) ou avec la vitamine E, puissant antioxydant donc l'effet insulinosensibilisateur a également été décrit chez l'animal en syndrome métabolique (Faure *et al.*, 1997).

En ce qui concerne le **chrome III**, nous avons apporté, sur cultures cellulaires, les preuves de son absence de génotoxicité à des doses très supérieures à celles utilisées dans les suppléments chez l'homme, ainsi que des données nouvelles sur son mécanisme d'action antioxydant, impliquant un mécanisme moléculaire d'induction de l'expression de gènes modulant la défense antioxydante et la réparation de l'ADN .

L'ensemble de ces résultats devrait permettre de tester sur modèle animal, puis chez l'homme l'effet d'apports combinés en extraits de thé vert, extraits aqueux de cannelle et d'histidinate de chrome.

Le tableau XVII résume les complémentarités d'action suggérées par nos résultats (en gras dans les cases ombrées) et par les travaux de la littérature (en italique) :

Tableau XVII : Complémentarités d'action suggérées par nos résultats (en gras et ombré) et par les travaux de la littérature (en italique)

	principe actif	Effet antioxydant	Effet sur la glycémie et l'insuline	Modification de l'expression des gènes	Toxicité aux doses nutritionnelles
extraits aqueux de cannelle	Proanthocyanidines A	+	+	+ <i>(Cao et al, 2007b)</i>	NON
extraits de thé vert	EGCG	+	+	+	NON
histidinate de chrome	Cr ³⁺	+	+ <i>(Anderson 2003)</i>	+	NON

X-2 - Limites de nos résultats

- Avantages et limites du modèle animal

Nous avons travaillé sur modèle animal (rat Wistar) développant un syndrome métabolique induit par le fructose. Les études sur modèle animal offrent de nombreux avantages, mais présentent également des limites à prendre en compte dans l'interprétation des résultats.

Alors que les études cliniques sont réalisées chez des patients de différents âges, sexes, poids et habitudes alimentaires, le modèle animal permet d'étudier une population homogène et une consommation alimentaire dont un seul paramètre varie. De plus, le modèle animal permet de multiplier les prélèvements, d'accéder aux paramètres tissulaires, et d'obtenir ainsi des informations non accessibles chez les patients.

Ce modèle présente plusieurs limites.

- Sur le plan métabolique, il est connu que le métabolisme lipidique du rat est très différent de celui de l'homme, ce qui ne permet pas d'étudier l'effet des régimes sur le métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines.
- La part du stress émotionnel dans le développement de l'insulinorésistance chez l'homme est bien décrite (Rosmond, 2005 ; Dallman et Pecoraro, 2003). Chez le rat, il a été rapporté des "répondeurs" et des "non répondeurs" au régime induisant le syndrome métabolique, et la part de la réponse émotionnelle est donc difficilement quantifiable.

- Avantage et limites du modèle cellulaire

Le choix des keratinocytes HaCaT comme modèle cellulaire a été discuté dans les publications correspondantes. Ces cellules, par leur capacité à concentrer les métaux, ont une sensibilité accrue à la toxicité du chrome. En revanche, elles ne sont pas représentatives d'une toxicité hépatique ou lymphocytaire.

Choix des formes d'apports et de leurs doses

Nous nous sommes placés à des doses d'ordre nutritionnelles, ce qui permettait d'exclure tout risque de toxicité.

Nous avons utilisé des extraits de thé vert titrés en EGCG (127 mg/g extrait), à des doses de 1 g et 2 g d'extraits/kg de régime. Compte tenu de la consommation journalière du rat, les doses d'EGCG ingérées par kg de poids corporel se rapprochent de celles ingérées au quotidien par un buveur de trois à six tasses de thé vert. Cependant, ce calcul reste peu précis et ne permet pas de conclure à un effet similaire chez l'homme. Il est donc indispensable d'envisager une étude d'intervention chez l'homme pour confirmer nos résultats.

En ce qui concerne les extraits aqueux de cannelle, la dose de 20 g/kg de régime a été validée chez le rat hypertendu par Preuss *et al*, (2006). Dans l'étude clinique, les effets positifs ont été obtenus avec 500 mg/j d'extraits de cannelle. Cette dose est à rapprocher d'une autre étude, réalisée avec de la poudre de cannelle, qui a montré chez le diabétique de type 2 (Khan *et al*, 2003) l'effet régulateur de 1 g/jour de poudre sur le système insuline/glucose.

Enfin, si nous avons observé des effets significatifs aux doses choisies, des expériences complémentaires sont nécessaires pour préciser la dose minimale d'extraits de thé ou de cannelle suffisante pour obtenir des effets significatifs

- Limites des paramètres mesurés

Pour des raisons logistiques, nous n'avons pas pu mesurer tous les paramètres souhaités au cours de nos expériences. En particulier, étant donné la lourdeur du protocole de recueil des urines, nous n'avons pas dosé les marqueurs urinaires de stress oxydant (Isoprostanes, 8-OH-dG).

En ce qui concerne les relations stress oxydant/ insulino résistance, nous n'avons pas pu inclure dans ce travail de thèse l'étude de l'expression des gènes et de la signalisation de l'insuline dans le foie et le muscle des rats recevant les extraits de cannelle. Cette étude est actuellement en cours et permettra une meilleure compréhension des mécanismes d'action des extraits de cannelle.

X-3 - Perspectives

Ces premiers résultats sont expérimentaux. Ils démontrent la pertinence d'une association de nutriments antioxydants et insulino potentialisateurs dans la prévention du syndrome métabolique. Cependant, les nombreuses limites dues aux conditions expérimentales imposent de poursuivre ce travail par des études d'intervention chez l'homme, associant, dans une supplémentation combinée, extraits de thé vert, extraits aqueux de cannelle et histidinate de chrome. Il est tentant d'envisager une étude du mécanisme d'action moléculaire basée non seulement sur la PCR quantitative en temps réel, mais sur la mise au point d'une biopuce associant à la fois les gènes du signalling, de l'inflammation, et du stress oxydant, ainsi que qu'une étude de la réponse protéomique aux facteurs nutritionnels.

Un autre axe de recherche, celui des effets sur l'inflammation, mériterait d'être développé pour une meilleure compréhension du mécanisme de protection par lequel les polyphénols de la cannelle, du thé et le chrome III, combattent l'insulinorésistance. Il serait, en effet, intéressant d'étudier leur effet sur la production des adipokines et des cytokines produites par le tissu graisseux (dont le facteur de nécrose tumorale α (TNF α), l'interleukine 6 et, plus récemment, la résistine), facteurs qui induisent une insulinorésistance quand ils sont produits en excès. Ces molécules interagissent directement sur les voies de signalisation de l'insuline, modulant de ce fait, l'insulinorésistance.

D'autres nutriments seraient probablement à prendre en compte, comme la vitamine E, le zinc ou le sélénium, mais cette démarche doit s'appuyer sur des études de leur mécanisme d'action à l'échelle moléculaire, et sur la démonstration de leur innocuité.

BIBLIOGRAPHIE

XI – Bibliographie

Abraham, A.S., Brooks, B.A. and Eylath, U. (1992). The effects of chromium supplementation on serum glucose and lipids in patients with and without non-insulin-dependent diabetes. *Metabolism* **41**, 768-71.

Adisakwattana, S., Roengsamran, S., Hsu, W.H. and Yibchok-anun, S. (2005). Mechanisms of antihyperglycemic effect of p-methoxycinnamic acid in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* **78**, 406-12.

Akerboom, T.P. and Sies, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* **77**, 373-82.

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

Althuis, M.D., Jordan, N.E., Ludington, E.A. and Wittes, J.T. (2002). Glucose and insulin responses to dietary chromium supplements: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* **76**, 148-55.

Anderson, R.A. and Kozlovsky, A.S. (1985). Chromium intake, absorption and excretion of subjects consuming self-selected diets. *Am J Clin Nutr* **41**, 1177-83.

Anderson, R.A., Bryden, N.A., and Polansky, M.M. (1992) Dietary chromium intake. Freely chosen diets, institutional diet, and individual foods. *Biol. Trace Elem. Res.*, **32**,117-21.

Anderson, R.A. (1994). Chromium nutrition in the elderly. In: Handbook of Nutrition in the Aged, Watson RR, editor. Boca Raton, FL: CRC Press, pp 385-392.

Anderson, R.A., Bryden, N.A. and Polansky, M.M. (1997a). Lack of toxicity of chromium chloride and chromium picolinate in rats. *J Am Coll Nutr* **16**:273-279.

Anderson, R.A., Cheng, N., Bryden, N.A., Polansky, M.M., Cheng, N., Chi, J. and Feng, J. (1997b). Elevated intakes of supplemental chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* **46**, 1786-91.

Anderson, R.A. (1998 a). Chromium, glucose intolerance and diabetes. *J Am Coll Nutr*, **17**,548-55.

Anderson, R.A. (1998 b). Effects of chromium on body composition and weight loss. *Nutr Rev* **56**, 266-70.

Anderson, R.A., Roussel, A. M., Zouari, N., Mahjoub, S., Matheau, J.M. and Kerkeni, A. (2001a). Potential antioxidant effects of zinc and chromium supplementation in people with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* **20**, 212-8.

Anderson, R.A. (2002). Insulin, glucose intolerance and diabetes: recent data regarding the chromium connection. *Trace Element Nutritional Health and Disease Proceedings* **1**, 79-86.

Anderson, R.A. and Polansky, M.M. (2002). Tea enhances insulin activity. *J Agric Food Chem* **50**, 7182-6.

Anderson, R.A. (2003). Chromium and insulin resistance. *Nutr Res Rev* **16**, 267-275.

Anderson, R.A., Broadhurst, C.L., Polansky, M.M., Schmidt, W.F., Khan, A., Flanagan, V. P., Schoene, N.W. and Graves, D.J. (2004a). Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity. *J Agric Food Chem* **52**, 65-70.

Anderson, R.A., Polansky, M.M., Bryden, N.A. (2004b). Stability and absorption of chromium and absorption of chromium histidinate complexes by humans. *Biol Trace Elem Res*, 101, 211-8.

Anderson, R.F., Fisher, L.J., Hara, Y., Harris, T., Mak, W.B., Melton, L.D. and Packer, J.E. (2001). Green tea catechins partially protect DNA from OH radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals. *Carcinogenesis* **22**:1189-1193.

Anderson, P., Phillips, K., Stoecklin, G. and Kedersha, N. (2004). Post-transcriptional regulation of proinflammatory proteins. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 42-47.

Armutcu, F., Coskun, O., Gurel, A., Kanter, M., Can, M., Ucar, F. and Unalacak, M. (2005). Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clin Biochem* **38**, 540-7.

Avogaro, A. (2006). Insulin resistance: trigger or concomitant factor in the metabolic syndrome. *Panminerva Med.* **48**:3-12.

Bahadori, B., Wallner, S., Schneider, H., Wascher, T. C. and Toplak, H. (1997). [Effect of chromium yeast and chromium picolinate on body composition of obese, non-diabetic patients during and after a formula diet]. *Acta Med Austriaca* **24**, 185-7.

- Balamurugan, K., Rajaram, R., Ramasami, T.** (2004). Caspase-3: its potential involvement in Cr(III)-induced apoptosis of lymphocytes. *Mol. Cell Biochem.* **259**:43-51.
- Balentine, D.A., Wiseman, S.A. and Bouwens, L.C.** (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr* **37**, 693-704.
- Balentine, D.A., Wiseman, S.A., Sheila, A., Bouwens L.C., Liesbeth, C.M. and Malvy, D.** (2000). Chimie des Flavonoïdes du thé. *Cahier. Nutr. Diet.* **35**, 1S13-1S21.
- Balkau, B., Vernay, M., Mhamdi, L., Novak, M., Arondel, D., Vol, S., Tichet, J. and Eschwege, E.** (2003). The incidence and persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome. The French D.E.S.I.R. study. *Diabetes Metab* **29**, 526-32.
- Basciano, H., Federico, L. and Adeli, K.** (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* **2**, 5.
- Batandier, C., Guigas, B., Detaille, D., El-Mir, M.Y., Fontaine, E., Rigoulet, M. and Leverve, X.M.** (2006). The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr* **38**, 33-42.
- Baynes, J.W.** (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40**, 405-12.
- Beaudeau, J.L. and Vasson, M.P.** (2005). Sources cellulaires des especes réactives de l'oxygènes in: Radicaux libres et stress oxydant Aspects biologiques et pathologiques. Coordonnateurs Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D. Editions Lavoisier, Paris, page: 45-86.
- Bencheikh-Latmani, R., Obratzsova, A., Mackey, M.R., Ellisman, M.H. and Tebo, B.M.** (2007). Toxicity of Cr(III) to *Shewanella* sp. strain MR-4 during Cr(VI) reduction. *Environ Sci Technol.* Jan 1. **41(1)**:214-220.
- Benzie, I.F. and Strain, J.J.** (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* **239**, 70-6.
- Berti, L., Mosthaf, L., Kroder, G., Kellerer, M., Tippmer, S., Mushack, J., Seffer, E., Seedorf, K. and Haring, H.** (1994). Glucose-induced translocation of protein kinase C isoforms in rat-1 fibroblasts is paralleled by inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* **269**, 3381-6.

- Biego, G.H., Joyeux, M., Hartemann, P. and Debry, G.** (1998). Daily intake of essential minerals and metallic micropollutants from foods in France. *Sci Total Environ* **217**, 27-36.
- Bizeau, M.E., Short, C., Thresher, J.S., Commerford, S.R., Willis, W.T. and Pagliassotti, M.J.** (2001a). Increased pyruvate flux capacities account for diet-induced increases in gluconeogenesis in vitro. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R427-33.
- Bizeau, M.E., Thresher, J.S. and Pagliassotti, M.J.** (2001b). A high-sucrose diet increases gluconeogenic capacity in isolated periportal and perivenous rat hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E695-702.
- Blackshear, P.J.** (2002). Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 945-952.
- Blasiak, J. and Kowalik, J.** (2000). A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium [In Process Citation]. *Mutat. Res.* **469**:135-145.
- Bloch-Damti, A. and Bashan, N.** (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1553-67.
- Bocio, A., Nadal, M. and Domingo, J.L.** (2005). Human exposure to metals through the diet in Tarragona, Spain: temporal trend. *Biol Trace Elem Res* **104**, 193-201.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N.E.** (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**, 761-71.
- Bratakos, M.S., Lazos, E.S. and Bratakos, S.M.** (2002). Chromium content of selected Greek foods. *Sci Total Environ* **290**, 47-58.
- Bravi, M.C., Pietrangeli, P., Laurenti, O., Basili, S., Cassone-Faldetta, M., Ferri, C. and De Mattia, G.** (1997). Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism* **46**, 1194-8.
- Bray, G.A., Nielsen, S.J. and Popkin, B.M.** (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* **79**, 537-43.
- Broadhurst, C.L., Polansky, M.M. and Anderson, R.A** (2000). Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 849-852.

- Broadhurst, C.L. and Domenico, P.** (2006). Clinical studies on chromium picolinate supplementation in diabetes mellitus--a review. *Diabetes Technol Ther* **8**, 677-87.
- Brown, M.D.** (1999). Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer. *Altern Med Rev* **4**, 360-70.
- Brownlee, M.** (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813-20.
- Bryant, N.J., Govers, R. and James, D.E.** (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 267-77.
- Burg, M.B.** (1995). Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol* **268**, F983-96.
- Busserolles, J., Mazur, A., Gueux, E., Rock, E. and Rayssiguier, Y.** (2002a). Metabolic syndrome in the rat: females are protected against the pro-oxidant effect of a high sucrose diet. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**, 837-42.
- Busserolles, J., Rock, E., Gueux, E., Mazur, A., Grolier, P. and Rayssiguier, Y.** (2002b). Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats. *Br J Nutr* **87**, 337-42.
- Busserolles, J., Gueux, E., Rock, E., Demigne, C., Mazur, A., Rayssiguier, Y.** (2003 a). Oligofructose protects against the hypertriglyceridemic and pro-oxidative effects of a high fructose diet in rats. *J Nutr*.133:1903-1908.
- Busserolles, J., Gueux, E., Rock, E., Mazur, A. and Rayssiguier, Y.** (2003 b). High fructose feeding of magnesium deficient rats is associated with increased plasma triglyceride concentration and increased oxidative stress. *Magnes Res* **16**, 7-12.
- Cabrera, C., Artacho, R. and Gimenez, R.** (2006). Beneficial effects of green tea--a review. *J Am Coll Nutr* **25**, 79-99.
- Cancello, R. and Clement K.** (2006). Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG*. 113(10):1141-7.

Cao, H. (2004). Expression, purification, and biochemical characterization of the antiinflammatory tristetraprolin: a zinc-dependent mRNA binding protein affected by posttranslational modifications. *Biochemistry*. 43, 13724-13738.

Cao, H., Deterding, L.J., Venable, J.D., Kennington, E.A., Yates, J.R. III, Tomer, K.B. and Blackshear, P.J. (2006). Identification of the anti-inflammatory protein tristetraprolin as a hyperphosphorylated protein by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *Biochem. J.*, 394, 285-297.

Cao, H., Kelly, M.A., Kari, F., Dawson, H.D., Urban, J.F., Jr., Coves, S., Roussel, A.M. and Anderson, R.A. (2007a). Green tea increases anti-inflammatory tristetraprolin and decreases pro-inflammatory tumor necrosis factor mRNA levels in rats. *J. Inflamm. (Lond)*. 4, 1.

Cao, H., Polansky, M.M. and Anderson, R.A. (2007b). Cinnamon extract and polyphenols affect the expression of tristetraprolin, insulin receptor, and glucose transporter 4 in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem Biophys* 459, 214-22.

Capeau, J. (2005). Voies de signalisation de l'insuline: mécanismes affectés dans l'insulinorésistance. *Medecine/Sciences* 21, 34-39.

Carballo, E., Lai, W.S. and Blackshear, P.J. (1998). Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science*. 281, 1001-1005.

Carballo, E., Lai, W.S. and Blackshear, P.J. (2000). Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood*. 95, 1891-1899.

Carballo, E., Cao, H., Lai, W. S., Kennington, E.A., Campbell, D. and Blackshear, P.J. (2001). Decreased sensitivity of tristetraprolin-deficient cells to p38 inhibitors suggests the involvement of tristetraprolin in the p38 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 42580-42587.

Cefalu, W.T., Bell-Farrow, A.D., Stegner, J., Wang, Z.Q., King, T., Morgan, T. and Terry, J.G. (1999). Effects of chromium picolinate on insulin sensitivity in vivo. *J Trace Elem. Exp.Med.* 12, 71-84.

Cefalu, W.T. and Hu, F.B. (2004). Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes Care* 27, 2741-51.

Cheng, H.H., Lai, M.H., Hou, W.C. and Huang, C.L. (2004). Antioxidant effects of chromium supplementation with type 2 diabetes mellitus and euglycemic subjects. *J Agric Food Chem* **52**, 1385-9.

Chicco, A., D'Alessandro, M.E., Karabatas, L., Pastorale, C., Basabe, J.C. and Lombardo, Y.B. (2003). Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *J Nutr* **133**, 127-33.

Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B. 3rd, Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I. and Birnbaum, M.J. (2001). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* **292**, 1728-31.

Chrysohoou, C., Panagiotakos, D.B., Pitsavos, C., Skoumas, I., Papademetriou, L., Economou, M. and Stefanadis, C. (2006). The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: The ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **8**, 8.

CNERNA-CNRS. (2001). Les apports nutritionnels conseillés pour la population française. 3^e édition, Coordonnateur Ambroise Martin, Edt Tec: Doc Lavoisier, Paris, 2001, p 168-170 et p 327.

Coimbra, S., Castro, E., Rocha-Pereira, P., Rebelo, I., Rocha, S. and Santos-Silva, A. (2006). The effect of green tea in oxidative stress. *Clin Nutr* **25**, 790-6.

Commerford, S.R., Ferniza, J.B., Bizeau, M.E., Thresher, J.S., Willis, W.T. and Pagliasotti, M.J. (2002). Diets enriched in sucrose or fat increase gluconeogenesis and G-6-Pase but not basal glucose production in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E545-55.

Couillard, C., Ruel, G., Archer, W.R., Pomerleau, S., Bergeron, J., Couture, P., Lamarche, B., and Bergeron, N. (2005): Circulating levels of oxidative stress markers and endothelial adhesion molecules in men with abdominal obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 6454-6459.

Cynober, L. et le Groupe de travail "Nutriton des personnes âgées" de la CEDAP. (2000). Apports nutritionnels conseillés de la personne âgée. *Nutr.Clin.Metab* **14**, suppl. **1**, 3-60.

Dallman, M.F. and Pecoraro N. (2003). "Chronic stress and obesity: A new view of "comfort food"." *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. 100(20): 11696–11701.

- Daly, M.E., Vale, C., Walker, M., Alberti, K.G. and Mathers, J.C.** (1997). Dietary carbohydrates and insulin sensitivity: a review of the evidence and clinical implications. *Am J Clin Nutr* **66**, 1072-85.
- Dandona, P., Aljada, A., Chaudhuri, A., Mohanty, P. and Garg, R.** (2005) : Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* **111**: 1448-1454.
- Davi, G. and Falco, A.** (2005) : Oxidant stress, inflammation and atherogenesis. *Lupus* **14**: 760-764.
- Davis, C.M. and Vincent J.B.** (1997). Isolation and characterization of a biologically active chromium oligopeptide from bovine liver. *Arch Biochem Biophys* **339**, 335-43.
- De Meyts, P. and Whittaker, J.** (2002). Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 769-83.
- Deen, D.** (2004). Metabolic syndrome: time for action. *Am Fam Physician* **69**, 2875-82.
- DeFronzo, R.A.** (1988). Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* **37**, 667-87.
- Del Prato, S.** (1999). Measurement of insulin resistance in vivo. *Drugs* **58 Suppl 1**, 3-6, discussion 75-82.
- Delbosc, S., Paizanis, E., Magous, R., Araiz, C., Dimo, T., Cristol, J.P., Cros, G. and Azay, J.** (2005). Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis* **179**, 43-9.
- Dragsted, L.O.** (2003). Antioxidant actions of polyphenols in humans. *Int J Vitam Nutr Res* **73**, 112-9.
- Dufresne, C.J. and Farnworth, E.R.** (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem* **12**, 404-421.
- Duke, J.** (1992). Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants. Boca Raton, FL Press, Inc.

El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Averet, N., Rigoulet, M. and Leverve, X. (2000). Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* **275**, 223-8.

Erba, D., Riso, P., Bordoni, A., Foti, P., Biagi, P. L. and Testolin, G. (2005). Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *J Nutr Biochem* **16**, 144-9.

Escarpa, A., and Gonzalez, M.C. (2001). An overview of analytical Chemistry Of Phenolic Compounds in Foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31**, 57-139.

Estrada, D.E., Ewart, H.S., Tsakiridis, T., Volchuk, A., Ramlal, T., Tritschler, H. and Klip, A. (1996). Stimulation of glucose uptake by the natural coenzyme alpha-lipoic acid/thioctic acid: participation of elements of the insulin signaling pathway. *Diabetes* **45**, 1798-804.

Evans, G.W., Swenson, G. and Waters, K. (1995). Chromium picolinate decreases calcium excretion and increases dehydroepiandrosterone (DHEA) in postmenopausal women. *Faseb J* **9**, A449.

Evans, J.L. and Goldfine, I.D. (2000). Alpha-lipoic acid : a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther.* **2**:401-13.

Evans, J.L., Maddux, B.A. and Goldfine, I.D. (2005). The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid. Redox Signal* **7**:1040-1052.

Faure, P. and Lafond, J.L. (1995). Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxydation. In: Favier A.E., Cadet, J., Kalnyanaraman, M., Fontecave, M., and Pierre, J.L. (Eds) Analysis of free radicals in biological systems. Birkäuser, Basel, Boston, Berlin, p 237-248.

Faure, P., Rossini, E., Lafond, J.L., Richard, M.J., Favier, A. and Halimi, S. (1997). Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. *J Nutr* **127**, 103-7.

Faure, P., Rossini, E., Wiernsperger, N., Richard, M.J., Favier, A. and Halimi, S. (1999). An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats. *Diabetes* **48**, 353-7.

Ferrannini, E., Haffner, S.M., Mitchell, B.D. and Stern, M.P. (1991). Hyperinsulinaemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia* **34**, 416-22.

Frame, S. and Cohen, P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **359**, 1-16.

Frei, B. and Higdon, J.V. (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr* **133**, 3275S-84S.

Garcia, E., Cabrera, C., Lorenzo, M.L., Sanchez, J. and Lopez, M.C. (2001). Daily dietary intake of chromium in southern Spain measured with duplicate diet sampling. *Br J Nutr* **86**, 391-6.

Garvey, W.T., Maianu, L., Hueckstaedt, T.P., Birnbaum, M.J., Molina, J.M. and Ciaraldi, T.P. (1991). Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J Clin Invest* **87**, 1072-81.

Gedik, C.M. and Collins, A. (2005). Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J.* **19**:82-84.

Geohas, J., Daly, A., Juturu, V., Finch, M. and Komorowski, J.R. (2007). Chromium picolinate and biotin combination reduces atherogenic index of plasma in patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized clinical trial. *Am J Med Sci* **333**, 145-53.

Gibson, R.S., MacDonald, A.C. and Martinez, O.B. (1985). Dietary chromium and manganese intakes of a selected sample of Canadian elderly women. *Hum Nutr Appl Nutr* **39**, 43-52.

Gilchrest, B.A. and Bohr, V.A. (1997). Aging processes, DNA damage, and repair. *Faseb J* **11**, 322-30.

Gillery, P., Monboisse, J.C., Maquart, F.X. and Borel, J.P. (1988). Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabete Metab* **14**, 25-30.

Giugliano, D., Ceriello, A. and Paolisso, G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* **19**:257-267.

- Gonzalez, R.G., Barnett, P., Aguayo, J., Cheng, H.M. and Chylack, L.T. Jr.** (1984). Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes* **33**, 196-9.
- Govindarajan, G., Whaley-Connell, A., Mugo, M., Stump, C. and Sowers, J.R.** (2005): The cardiometabolic syndrome as a cardiovascular risk factor. *Am J Med Sci* **330**: 311-318.
- Gowder, S.J. and Devaraj, H.** (2006). Effect of the food flavour cinnamaldehyde on the antioxidant status of rat kidney. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **99**, 379-82.
- Grant, K.E., Chandler, R.M., Castle, A.L. and Ivy, J.L.** (1997). Chromium and exercise training: effect on obese women. *Med Sci Sports Exerc* **29**, 992-8.
- Gray, A.M. and Flatt, P.R.** (1997). Pancreatic and extra-pancreatic effects of the traditional anti-diabetic plant, *Medicago sativa* (lucerne). *Br J Nutr* **78**, 325-34.
- Guallar, E., Jimenez, F.J., van't Veer, P., Bode, P., Riemersma, R.A., Gomez-Aracena, J., Kark, J.D., Arab, L., Kok, F.J. and Martin-Moreno, J.M.** (2005). Low toenail chromium concentration and increased risk of nonfatal myocardial infarction. *Am J Epidemiol* **162**, 157-64.
- Gunzler, W.A., Kremers, H. and Flohe, L.** (1974). An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem* **12**, 444-8.
- Guo, Q., Zhao, B., Li, M., Shen, S. and Xin, W.** (1996). Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochem Biophys Acta* **1304**, 210-22.
- Haffner, S.M., Valdez, R.A., Hazuda, H.P., Mitchell, B.D., Morales, P.A. and Stern, M.P.** (1992). Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* **41**, 715-22.
- Hakim, I.A., Harris, R.B., Chow, H.H., Dean, M., Brown, S. and Ali, I.U.** (2004). Effect of a 4-month tea intervention on oxidative DNA damage among heavy smokers: role of glutathione S-transferase genotypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**, 242-9.
- Halvorsen, B.L., Carlsen, M.H., Phillips, K.M., Bohn, S.K., Holte, K., Jacobs, D.R. Jr. and Blomhoff, R.** (2006). Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am J Clin Nutr* **84**, 95-135.

- Hansen, M.B., Nielsen, S.E. and Berg, K.** (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* **119**, 203-10.
- Harborne, J.B.** (1989). General procedures and measurement of total phenolics. In: Harborne, J.B. *Plant Phenolics*. Academic press, Londres. 1-28.
- Hasegawa, R., Chujo, T., Sai-Kato, K., Umemura, T., Tanimura, A. and Kurokawa, Y.** (1995). Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane. *Food Chem Toxicol* **33**, 961-70.
- Hayden, M.R. and Tyagi, S.C.** (2004) : Neural redox stress and remodeling in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and diabetic neuropathy. *Med Sci Monit* **10**: RA291-RA307.
- Hazane, F., Valenti, K., Sauvaigo, S., Peinnequin, A., Mouret, C., Favier, A., and Beani, J.C.** (2005). Ageing effects on the expression of cell defence genes after UVA irradiation in human male cutaneous fibroblasts using cDNA arrays. *J Photochem Photobiol B*. Jun,79(3):171-190.
- Heidland, A., Sebekova, K. and Schinzel, R.** (2001). Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *Am J Kidney Dis* **38**, S100-6.
- Heinz, F., Lamprecht, W. and Kirsch, J.** (1968). Enzymes of fructose metabolism in human liver. *J Clin Invest* **47**, 1826-32.
- Hernandez, R., Teruel, T. and Lorenzo, M.** (2003). Insulin and dexamethasone induce GLUT4 gene expression in foetal brown adipocytes: synergistic effect through CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *Biochem. J.* **372**, 617-624.
- Higdon, J.V. and Frei, B.** (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* **43**, 89-143.
- Hininger, I., Chollat-Namy, A., Sauvaigo, S., Osman, M., Faure, H., Cadet, J., Favier, A. and Roussel, A.M.** (2004). Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. *Mut Res* **558**, 75-80.

- Hininger, I., Benaraba, R., Osman, M., Faure, H., Roussel, A.M. and Anderson, R.A.** (2007). Safety of trivalent chromium complexes: No evidence for DNA damage in human HaCaT keratinocytes. *Free Radic Biol Med* **42**, 1759-65.
- Horton, T.J., Gayles, E.C., Prach, P.A., Koppenhafer, T.A. and Pagliassotti, M.J.** (1997). Female rats do not develop sucrose-induced insulin resistance. *Am J Physiol* **272**, R1571-6.
- Hubbard, S.R.** (1997). Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *Embo J* **16**, 5572-81.
- Hunt, J.V., Dean, R.T. and Wolff, S.P.** (1988). Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* **256**, 205-12.
- Imparl-Radosevich, J., Deas, S., Polansky, M.M., Baedke, D.A., Ingebritsen, T.S., Anderson, R.A. and Graves, D.J.** (1998). Regulation of PTP-1 and insulin receptor kinase by fractions from cinnamon: implications for cinnamon regulation of insulin signalling. *Horm Res* **50**, 177-82.
- Iso, H., Date, C., Wakai, K., Fukui, M. and Tamakoshi, A.** (2006). The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Ann Intern Med* **144**, 554-62.
- Isoir, M., Buard, V., Gasser, P., Voisin, P., Lati, E. and Benderitter, M.** (2006). Human keratinocyte radiosensitivity is linked to redox modulation. *J Dermatol Sci* **41**, 55-65.
- Jain, S.K. and Palmer, M.** (1997). The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Radic Biol Med* **22**, 593-6.
- Jain, S.K. and Kannan, K.** (2001). Chromium chloride inhibits oxidative stress and TNF-alpha secretion caused by exposure to high glucose in cultured U937 monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 687-91.
- Jain, S.K., Patel, P., Rogier, K. and Jain, S.K.** (2006). Trivalent chromium inhibits protein glycosylation and lipid peroxidation in high glucose-treated erythrocytes. *Antioxid Redox Signal* **8**, 238-41.

Jarvill-Taylor, K.J., Anderson, R.A. and Graves, D.J. (2001). A hydroxychalcone derived from cinnamon functions as a mimetic for insulin in 3T3-L1 adipocytes. *J Am Coll Nutr* **20**, 327-36.

Jeejeebhoy, K.N., Chu, R.C., Marliss, E.B., Greenberg, G.R. and Bruce-Robertson, A. (1977). Chromium deficiency, glucose intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-term total parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr* **30**, 531-8.

Jovanovic, L., Gutierrez, M., Peterson, C.M. (1999). Chromium supplementation for women with gestational diabetes mellitus. *J Trace Elem Exp Med*, **12**, 92-98.

Kaats, G.R., Blum, K., Fisher, J. and Adelman, J.A. (1996). Effect of chromium picolinate supplementation on body composition: a randomized double-masked placebo controlled study. *Curr. Ther. Res* **57**, 747-756.

Kahari, V.M. and Saarialho-Kere, U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* **6**, 199-213.

Kahn, B.B. (1992). Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J Clin Invest* **89**, 1367-74.

Kaneko, H., Fujii, J., Myint, T., Miyazawa, N., Islam, K.N., Kawasaki, Y., Susuki, K., Nakamura, M., Tatsumi, H., Yamasaki, Y. and Taniguchi, N. (1996). Reducing sugars triggers oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cell provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J* **320**, 855-863.

Kao, Y.H., Chang, H.H., Lee, M.J. and Chen, C.L. (2006). Tea, obesity, and diabetes. *Mol Nutr Food Res* **50**, 188-210.

Karihtala, P. and Soini, Y. (2007). Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Apmis* **115**, 81-103.

Kern, P.A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L. and Ranganathan, G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E745-51.

- Khan, A., Bryden, N.A., Polansky, M.M. and Anderson, R.A.** (1990). Insulin potentiating factor and chromium content of selected foods and spices. *Biol Trace Elem Res* **24**, 183-8.
- Khan, A., Safdar, M., Ali Khan, M.M., Khattak, K.N. and Anderson, R.A.** (2003). Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **26**, 3215-8.
- Kim, S.H., Hyun, S.H. and Choung, S.Y.** (2006). Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *J Ethnopharmacol* **104**, 119-23.
- Kim, W., Khil, L.Y., Clark, R., Bok, S.H., Kim, E.E., Lee, S., Jun, H.S. and Yoon, J.W.** (2006). Naphthalenemethyl ester derivative of dihydroxyhydrocinnamic acid, a component of cinnamon, increases glucose disposal by enhancing translocation of glucose transporter 4. *Diabetologia*. **49**, 2437-2448.
- Kirpnick-Sobol, Z., Reliene, R., Schiestl, R.H.** (2006). Carcinogenic Cr(VI) and the nutritional supplement Cr(III) induce DNA deletions in yeast and mice. *Cancer Res.* **66**:3480-3484.
- Kleefstra, N., Houweling, S.T., Bakker, S.J., Verhoeven, S., Gans, R.O., Meyboom-de Jong, B. and Bilo, H.J.** (2007). Chromium treatment has no effect in patients with type 2 diabetes in a Western population: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Care* **30**, 1092-6.
- Knight J., Pieper R., McClellan, L.** (1988) Specificity of the thiobarbituric acid reaction : its use in studies of lipid peroxidation . *Clin Chem.* **34** :2433-2438.
- Konrad, D., Somwar, R., Sweeney, G., Yaworsky, K., Hayashi, M., Ramlal, T. and Klip, A.** (2001). The antihyperglycemic drug alpha-lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation: potential role of p38 mitogen-activated protein kinase in GLUT4 activation. *Diabetes* **50**, 1464-71.
- Kraegen, E.W., Cooney, G.J., Ye, J. and Thompson, A.L.** (2001). Triglycerides, fatty acids and insulin resistance--hyperinsulinemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **109**, S516-26.
- Kumpulainen, J.T.** (1992). Chromium content of foods and diets. *Biol Trace Elem Res* **32**, 9-18.
- Lai, K.M. and Pawson, T.** (2000). The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo. *Genes Dev* **14**, 1132-45.

Lai, P.K. and Roy, J. (2004). Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Curr Med Chem* **11**, 1451-60.

Lai, W.S., Stumpo, D.J. and Blackshear, P.J. (1990). Rapid insulin-stimulated accumulation of an mRNA encoding a proline-rich protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 16556-16563.

Le Roith, D. and Zick, Y. (2001). Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* **24**, 588-97.

Lee, A.J., Hodges, N.J. and Chipman, J.K. (2004). Modified comet assay as a biomarker of sodium dichromate-induced oxidative DNA damage: optimization and reproducibility. *Biomarkers* **9**:103-115.

Lee, J.S., Choi, M.S., Jeon, S.M., Jeong, T.S., Park, Y.B., Lee, M.K. and Bok, S.H. (2001). Lipid-lowering and antioxidative activities of 3,4-di(OH)-cinnamate and 3,4-di(OH)-hydrocinnamate in cholesterol-fed rats. *Clin Chim Acta* **314**, 221-9.

Lee, K.W., Lee, H.J. and Lee, C.Y. (2002). Antioxidant activity of black tea vs. green tea. *J Nutr* **132**, 785, author reply 786.

Leighton, F., Cuevas, A., Guasch, V., Perez, D.D., Strobel, P., San Martin, A., Urzua, U., Diez, M.S., Fonceca, R., Castillo, O., Mizon, C., Espinoza, M.A., Urquiaga, I., Rozowski, J., Maiz, A. and Germain, A. (1999). Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans. *Drugs Exp. Clin. Res.* **25**:133-141.

Leung, L.K., Su, Y., Chen, R., Zhang, Z., Huang, Y. and Chen, Z.Y. (2001). Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *J Nutr* **131**, 2248-51.

Li, R.W., Douglas, T.D., Maiyoh, G.K., Adeli, K. and Theriault, A.G. (2006). Green tea leaf extract improves lipid and glucose homeostasis in a fructose-fed insulin-resistant hamster model. *J Ethnopharmacol* **104**, 24-31.

Lopez-Candales, A. (2001). Metabolic syndrome X: a comprehensive review of the pathophysiology and recommended therapy. *J Med* **32**, 283-300.

- Lucidi, R.S., Thyer, A.C., Easton, C.A., Holden, A.E., Schenken, R.S. and Brzyski, R.G.** (2005). Effect of chromium supplementation on insulin resistance and ovarian and menstrual cyclicity in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **84**, 1755-7.
- Ludwig, D.S., Peterson, K.E. and Gortmaker, S.L.** (2001). Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. *Lancet* **357**, 505-8.
- Lydic, M.L., McNurlan, M., Bembo, S., Mitchell, L., Komaroff, E. and Gelato, M.** (2006). Chromium picolinate improves insulin sensitivity in obese subjects with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **86**, 243-6.
- Macheix, J.J.** (1996). Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XX eme siècle? *Acta Bot Gallica* **143**.
- Maddux, B.A., See, W., Lawrence, J.C., Jr., Goldfine, A.L., Goldfine, I.D. and Evans, J.L.** (2001). Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes* **50**, 404-10.
- Mang, B., Wolters, M., Schmitt, B., Kelb, K., Lichtinghagen, R., Stichtenoth, D.O. and Hahn, A.** (2006). Effects of a cinnamon extract on plasma glucose, HbA_{1c}, and serum lipids in diabetes mellitus type 2. *Eur J Clin Invest* **36**, 340-4.
- Marklund, S. and Marklund, G.** (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* **47**, 469-74.
- Martin, A.** (1998). Controverse sur le chrome. *Cahier. Nutr. Diet.* **33**, 176-181.
- Martin, J.A., Brooks, D.A., Prieto, L., Gonzalez, R., Torrado, A., Rojo, I., Lopez de Uralde, B., Lamas, C., Ferritto, R., Dolores Martin-Ortega, M. et al.** (2005). 2-Alkoxydihydrocinnamates as PPAR agonists. Activity modulation by the incorporation of phenoxy substituents. *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 51-5.
- Martin, J., Wang, Z.Q., Zhang, X.H., Wachtel, D., Volaufova, J., Matthews, D.E. and Cefalu, W.T.** (2006). Chromium picolinate supplementation attenuates body weight gain and increases insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **29**, 1826-32.

- Marzec, Z.** (2004). Alimentary chromium, nickel, and selenium intake of adults in Poland estimated by analysis and calculations using the duplicate portion technique. *Nahrung* **48**, 47-52.
- Matsumoto, N., Ishigaki, F., Ishigaki, A., Iwashina, H., and Hara, Y.** (1993). Reduction of Blood Glucose Levels by Tea Catechin. *Biosci. Biotech. Biochem* **57**, 525-527.
- Matsuo, M.** (1993). Age-related alteration in antioxidant defense In: Yu BP ed, Free Radical in Aging, Florida CRC Press., 143-182.
- Mayes, P.A.** (1993). Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr* **58**, 754S-765S.
- McKay, D.L. and Blumberg, J.B.** (2002). The role of tea in human health: an update. *J Am Coll Nutr* **21**, 1-13.
- Mendelsohn, M.E. and Karas, R.H.** (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* **340**, 1801-11.
- Mertz, W. and Schwarz, K.** (1955). Impaired intravenous glucose tolerance as an early sign of dietary necrotic liver degeneration. *Arch Biochem Biophys* **58**, 504-6.
- Mertz, W.** (1993). Chromium in human nutrition: a review. *J Nutr* **123**, 626-33.
- Middleton, E. Jr., Kandaswami, C. and Theoharides, T.C.** (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* **52**, 673-751.
- Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P.P., Lanfrancone, L. and Pelicci, P.G.** (1999). The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* **402**, 309-13.
- Miller, N.J., Castelluccio, C., Tijburg, L. and Rice-Evans, C.** (1996). The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters--radical scavengers or metal chelators? *FEBS Lett* **392**, 40-4.
- Morel, I., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O., Padeloup, N., Brissot, P., Cillard, P. and Cillard, J.** (1993). Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol* **45**, 13-9.
- Morel, Y. and Barouki, R.** (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* **342 Pt 3**, 481-96.

Morris, B.W., Gray, T.A. and Macneil, S. (1993). Glucose-dependent uptake of chromium in human and rat insulin-sensitive tissues. *Clin Sci (Lond)* **84**, 477-82.

Morris, B.W., Samaniego, S., Fraser, R., and McNeil, S. (2000). Increased chromium excretion in pregnancy is associated with insulin resistance. *J Trace Elem Ext Med.* 13:389-396.

Mousseau M., Faure H., Hininger I., Bayet-Robert M. and Favier A. Leucocyte 8-oxo 7,8 dihydrodeoxyguanosine and comet assay in epuribicin patients. *Free Radic Research*, 39 : 837-43,2005.

NCEP. (2001). Expert Panel on Detection evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the Third report of the National Cholesterol Evaluation Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adults treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486-2497.

Noel, L., Leblanc, J.C. and Guerin, T. (2003). Determination of several elements in duplicate meals from catering establishments using closed vessel microwave digestion with inductively coupled plasma mass spectrometry detection: estimation of daily dietary intake. *Food Addit Contam* **20**, 44-56.

O'Brien, T.J., Ceryak, S. and Patierno, S.R. (2003). Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat. Res.* **533**:3-36.

O'Brien, T.J., Brooks, B.R. and Patierno, S.R. (2005). Nucleotide excision repair functions in the removal of chromium-induced DNA damage in mammalian cells. *Mol. Cell Bioch.* **279**(1-2):85-95.

Pagliassotti, M.J., Shahrokhi, K.A. and Moscarello, M. (1994). Involvement of liver and skeletal muscle in sucrose-induced insulin resistance: dose-response studies. *Am J Physiol* **266**, R1637-44.

Pandolfi, S., Bonafe, M., Di Tella, L., Tiberi, L., Salvioloi, S., Monti, D., Sorbi, S. and Franceschi, C.(2005) p66(shc) is highly expressed in fibroblast from centenarians. *Mech Ageing Dev* **126**,839-44.

Pittler, M.H., Stevinson, C. and Ernst, E. (2003). Chromium picolinate for reducing body weight: meta-analysis of randomized trials. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **27**:522-529.

Prasad, N.S., Raghavendra, R., Lokesh, B.R. and Naidu, K.A. (2004). Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **70**, 521-8.

Preuss, H.G., Grojec, P.L., Lieberman, S. and Anderson, R.A. (1997). Effects of different chromium compounds on blood pressure and lipid peroxidation in spontaneously hypertensive rats. *Clin Nephrol* **47**, 325-30.

Preuss, H.G., Bagchi, D. and Bagchi, M. (2002). Protective effects of a novel niacin-bound chromium complex and a grape seed proanthocyanidin extract on advancing age and various aspects of syndrome X. *Ann N Y Acad Sci* **957**, 250-9.

Preuss, H.G., Echard, B., Polansky, M.M. and Anderson, R.A. (2006). Whole cinnamon and aqueous extracts ameliorate sucrose-induced blood pressure elevations in spontaneously hypertensive rats. *J Am Coll Nutr* **25**, 144-50.

Qi, W., Reiter, R. J., Tan, D.X., Garcia, J.J., Manchester, L.C., Karbownik, M., Calvo, J.R. (2000). Chromium(III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. *Environ. Health Perspect.* **108**:399-402.

Qin, B., Nagasaki, M., Ren, M., Bajotto, G., Oshida, Y. and Sato, Y. (2003). Cinnamon extract (traditional herb) potentiates in vivo insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes Res Clin Pract* **62**, 139-48.

Qin, B., Nagasaki, M., Ren, M., Bajotto, G., Oshida, Y. and Sato, Y. (2004). Cinnamon extract prevents the insulin resistance induced by a high-fructose diet. *Horm Metab Res* **36**, 119-25.

Rabinovitz, H., Friedensohn, A., Leibovitz, A., Gabay, G., Rocas, C. and Habet, B. (2004). Effect of chromium supplementation on blood glucose and lipid levels in type 2 diabetes mellitus elderly patients. *Int J Vitam Nutr Res* **74**, 178-82.

Racek, J., Trefil, L., Rajdl, D., Mudrova, V., Hunter, D. and Senft, V. (2006). Influence of chromium-enriched yeast on blood glucose and insulin variables, blood lipids, and markers of oxidative stress in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res* **109**, 215-30.

Rahman, I., Biswas, S.K. and Kode, A. (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* **533**, 222-39.

- Ramrath, S., Tritschler, H.J. and Eckel, J.** (1999). Stimulation of cardiac glucose transport by thioctic acid and insulin. *Horm Metab Res* **31**, 632-5.
- Ravina, A., Slezak, L., Mirsky, N., Bryden, N.A. and Anderson, R.A.** (1999). Reversal of corticosteroid-induced diabetes mellitus with supplemental chromium. *Diabet Med* **16**, 164-7.
- Reaven, G.M.** (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**, 1595-607.
- Reaven, G.M.** (2003). The insulin resistance syndrome. *Curr Atheroscler Rep* **5**:364-371.
- Reaven, G.M.** (2006). The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary?. *Am J Clin Nutr*. Jun, **83**(6):1237-47.
- Rice-Evans, C.A.** (1995). Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochem Soc Symp* **61**, 103-16.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, G.P., Bramley, P.M. and Pridham, J.B.** (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* **22**, 375-83.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Bolwell, G.P.** (1997). Antioxydant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* **2**, 152-159.
- Richard, M.J., Portal, B., Meo, J., Coudray, C., Hadjian, A. and Favier, A.** (1992). Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem* **38**, 704-9.
- Rietveld, A. and Wiseman, S.** (2003). Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J Nutr* **133**, 3285S-3292S.
- Rodrigo, R. and Bosco, C.** (2006). Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **142**, 317-27.
- Roling, J.A. and Baldwin, W.S.** (2006). Alterations in hepatic gene expression by trivalent chromium in *Fundulus heteroclitus*. *Mar Environ Res* **62** Suppl, S122-7.
- Rosmond, R.** (2005). Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. **30**: 1-10

Roussel, A.M., Anderson, R.A. (2005). Chrome et sensibilité à l'insuline. *Médecine et Nutrition* **41**, 21-28.

Roussel, A.M., Andriollo-Sanchez, M., Ferry, M., Bryden, N.A. and Anderson, R.A. (2007). Food chromium content, dietary chromium intake and related biological variables in French free-living elderly. *Br J Nutr*, 1-6.

Rudich, A., Tirosh, A., Potashnik, R., Khamaisi, M. and Bashan, N. (1999). Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* **42**, 949-57.

Ryu, O.H., Lee, J., Lee, K.W., Kim, H.Y., Seo, J.A., Kim, S.G., Kim, N.H., Baik, S.H., Choi, D.S. and Choi, K.M (2006). Effects of green tea consumption on inflammation, insulin resistance and pulse wave velocity in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **71**, 356-358.

Sabu, M.C. and Kuttan, R. (2002). Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *J Ethnopharmacol* **81**, 155-60.

Saffari, Y. and Sadrzadeh, S.M. (2004). Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life Sci* **74**, 1513-8.

Sakurai, T. and Tsuchiya, S. (1988). Superoxide production from nonenzymatically glycosylated protein. *FEBS Lett* **236**, 406-10.

Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P. and Rice-Evans, C. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* **322**, 339-46.

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

Saltiel, A R. and Pessin, J.E. (2002). Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* **12**, 65-71.

Sano, M., Takahashi, Y., Yoshino, K., Shimoi, K., Nakamura, Y., Tomita, I., Oguni, I. and Konomoto, H. (1995). Effect of tea (*Camellia sinensis* L.) on lipid peroxidation in rat liver and kidney: a comparison of green and black tea feeding. *Biol. Pharm. Bull.* **18**:1006-1008.

- Sarkar, A. and Bhaduri, A.** (2001). Black tea is a powerful chemopreventor of reactive oxygen and nitrogen species: comparison with its individual catechin constituents and green tea. *Biochem Biophys Res Commun* **284**, 173-8.
- Scalbert, A. and Williamson, G.** (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* **130**, 2073S-85S.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L.** (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* **45**, 287-306.
- Schurer, N., Kohne, A., Schliep, V., Barlag, K. and Goerz, G.** (1993). Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Exp Dermatol* **2**, 179-85.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M. and Corke, H.** (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem* **53**, 7749-59.
- Shenoy, C.** (2000). Hypoglycemic activity of bio-tea in mice. *Indian J Exp Biol* **38**, 278-9.
- Shepherd, P.R. and Kahn, B.B.** (1999). Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* **341**, 248-57.
- Shimizu, M.** (1999). Modulation of intestinal functions by food substances. *Nahrung* **43**, 154-8.
- Shulman, G.I.** (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* **106**, 171-6.
- Sies, H.** (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* **69**, 965-8.
- Singh, N.P., Danner, D.B., Tice, R.R., Brant, L. and Schneider, E.L.** (1990). DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat Res* **237**, 123-30.
- Skrzydowska, E., Ostrowska, J., Farbiszewski, R. and Michalak, K.** (2002). Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. *Phytomedicine* **9**, 232-8.
- Snow, E.T. and Xu, L.S.** (1991). Chromium(III) bound to DNA templates promotes increased polymerase processivity and decreased fidelity during replication in vitro. *Biochemistry* **30**, 11238-45.

Snow, E.T. (1994). Effects of chromium on DNA replication in vitro. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 3, 41-4.

Speetjens, J.K., Collins, R.A., Vincent, J.B. and Woski, S.A. (1999). The nutritional supplement chromium(III) tris(picolinate) cleaves DNA. *Chem. Res Toxicol* 12:483-487.

Srividhya, S. and Anuradha, C.V. (2002). Metformin improves liver antioxidant potential in rats fed a high-fructose diet. *Asia Pac J Clin Nutr* 11, 319-22.

Stearns, D.M., Belbruno, J.J. and Wetterhahn, K.E. (1995a). A prediction of chromium(III) accumulation in humans from chromium dietary supplements. *FASEB J.* 9:1650-1657.

Stearns, D.M., Kennedy, L.J., Courtney, K.D., Giangrande, P.H., Phieffer, L.S. and Wetterhahn, K.E. (1995b). Reduction of chromium(VI) by ascorbate leads to chromium-DNA binding and DNA strand breaks in vitro. *Biochemistry* 34:910-919, 1995.

Storlien, L.H., Oakes, N.D., Pan, D.A., Kusunoki, M. and Jenkins, A.B. (1993). Syndromes of insulin resistance in the rat. Inducement by diet and amelioration with benfluorex. *Diabetes* 42, 457-62.

Striffler, J.S., Polansky, M.M. and Anderson, R.A. (1998). Dietary chromium decreases insulin resistance in rats fed a high-fat, mineral-imbalanced diet. *Metabolism* 47, 396-400.

Stump, C.S., Clark, S.E. and Sowers, J.R. (2005). Oxidative stress in insulin-resistant conditions: cardiovascular implications. *Treat. Endocrinol.* 4:343-351.

Subash, B.P., Prabuseenivasan, S. and Ignacimuthu, S. (2007). Cinnamaldehyde - a potential antidiabetic agent. *Phytomedicine* 14, 15-22.

Sugioka, K., Shimosegawa, Y. and Nakano, M. (1987). Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett* 210, 37-9.

Sung, H., Nah, J., Chun, S., Park, H., Yang, S.E. and Min, W.K. (2000). In vivo antioxidant effect of green tea. *Eur J Clin Nutr* 54, 527-9.

Tezuka, M., Ishii, S. and Okada, S. (1991). Chromium (III) decreases carbon tetrachloride-originated trichloromethyl radical in mice. *J Inorg Biochem* 44, 261-5.

Thirunavukkarasu, V. and Anuradha, C.V. (2004). Influence of alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant defence system in blood of insulin-resistant rats. *Diabetes Obes Metab* **6**, 200-7.

Thorburn, A.W., Storlien, L.H., Jenkins, A.B., Khouri, S. and Kraegen, E.W. (1989). Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clin Nutr* **49**, 1155-63.

Thresher, J.S., Podolin, D.A., Wei, Y., Mazzeo, R.S. and Pagliassotti, M.J. (2000). Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R1334-40.

Toy, L.W. (2005). Matrix metalloproteinases: their function in tissue repair. *J Wound Care* **14**, 20-2.

Trumbo, P.R. and Ellwood, K.C. (2006). Chromium picolinate intake and risk of type 2 diabetes: an evidence-based review by the United States Food and Drug Administration. *Nutr Rev* **64**, 357-63.

Tsou, T.C., Yang, J.L. (1996). Formation of reactive oxygen species and DNA strand breakage during interaction of chromium (III) and hydrogen peroxide in vitro: evidence for a chromium (III)-mediated Fenton-like reaction. *Chem. Biol. Interact.* **102**:133-153.

Uchida, S., Ozaki, M., Suzuki, K. and Shikita, M. (1992). Radioprotective effects of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (green-tea tannin) in mice. *Life Sci* **50**, 147-52.

Ueno, S., Susa, N., Furukawa, Y., Aikawa, K., Itagaki, I., Komiyama, T. and Takashima, Y. (1988). Effect of chromium on lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Nippon Juigaku Zasshi* **50**, 45-52.

Urquiaga, I. and Leighton, F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol Res* **33**, 55-64.

Valverde, A.M., Navarro, P., Teruel, T., Conejo, R., Benito, M. and Lorenzo, M. (1999). Insulin and insulin-like growth factor I up-regulate GLUT4 gene expression in fetal brown adipocytes, in a phosphoinositide 3-kinase-dependent manner. *Biochem. J.* **337**, 397-405.

- Van Cauwenbergh, R., Hendrix, P., Robberecht, H. and Deelstra, H.A.** (1996). Daily dietary chromium intake in Belgium, using duplicate portion sampling. *Z Lebensm Unters Forsch* **203**, 203-6.
- Vega-Lopez, S., Devaraj, S., and Jialal, I.** (2004). Oxidative stress and antioxidant supplementation in the management of diabetic cardiovascular disease. *J. Investig. Med.* 52:24-32.
- Verspohl, E.J., Bauer, K. and Neddermann, E.** (2005). Antidiabetic effect of Cinnamomum cassia and Cinnamomum zeylanicum in vivo and in vitro. *Phytother Res* **19**, 203-6.
- Vincent, H.K. and Taylor, A.G.** (2006). Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int. J. Obes. (Lond)* 30:400-418,.
- Vincent, J.B.** (2000). The biochemistry of chromium. *J Nutr* **130**, 715-8.
- Vincent, J.B.** (2003). The potential value and toxicity of chromium picolinate as a nutritional supplement, weight loss agent and muscle development agent. *Sports Med.* **33**:213-230.
- Virkamaki, A., Ueki, K. and Kahn, C.R.** (1999). Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* **103**, 931-43.
- Volpe, S.L., Huang, H.W., Larpadisorn, K. and Lesser, II.** (2001). Effect of chromium supplementation and exercise on body composition, resting metabolic rate and selected biochemical parameters in moderately obese women following an exercise program. *J Am Coll Nutr* **20**, 293-306.
- Waltner-Law, M.E., Wang, X.L., Law, B.K., Hall, R.K., Nawano, M. and Granner, D.K.** (2002). Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem* **277**, 34933-40.
- Wang, J.G., Anderson, R.A., Graham, G.M. 3rd, Chu, M.C., Sauer, M.V., Guarnaccia, M. M. and Lobo, R.A.** (2007). The effect of cinnamon extract on insulin resistance parameters in polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Fertil Steril* **12**, 12.
- White, M.F.** (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E413-22.
- Wiseman, S.A., Balentine, D.A. and Frei, B.** (1997). Antioxidants in tea. *Crit Rev Food Sci Nutr* **37**, 705-18.

Wiseman, S.A., Balentine, D.A., Frei, B., Malvy, D., and Remesy, C. (2000). Les antioxydants du thé. *Cahier. Nutr. Diet.* **35**, 1S23-1S33.

Wolfram, S., Wang, Y. and Thielecke, F. (2006). Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol Nutr Food Res* **50**, 176-87.

Wright, E. Jr., Scism-Bacon, J.L., and Glass, L.C. (2006). Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int. J. Clin. Pract.* **60**:308-314.

Wu, L.Y., Juan, C.C., Ho, L.T., Hsu, Y.P. and Hwang, L.S. (2004a). Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague-Dawley rats. *J Agric Food Chem* **52**, 643-8.

Wu, L.Y., Juan, C.C., Hwang, L.S., Hsu, Y.P., Ho, P.H. and Ho, L.T. (2004b). Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model. *Eur J Nutr* **43**, 116-24.

Yagi, K. (1976) A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med Metab* **15** :212-6.

Yang, X., Li, S.Y., Dong, F., Ren, J. and Sreejayan, N. (2006). Insulin-sensitizing and cholesterol-lowering effects of chromium (D-Phenylalanine)₃. *J Inorg Biochem* **100**, 1187-93.

Yoshioka, H., Akai, G., Yoshinaga, K., Hasegawa, K. and Yoshioka, H. (1996). Protecting effect of a green tea percolate and its main constituents against gamma ray-induced scission of DNA. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**, 117-9.

Yoshioka, H., Kurosaki, H., Yoshinaga, K., Saito, K. and Yoshioka, H. (1997). Beta ray-induced scission of DNA in tritiated water and protection by a green tea percolate and (-)-epigallocatechin gallate. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**, 1560-3.

Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J. 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**, 50230-6.

Yu, Z.W., Buren, J., Enerback, S., Nilsson, E., Samuelsson, L. and Eriksson, J.W. (2001). Insulin can enhance GLUT4 gene expression in 3T3-F442A cells and this effect is mimicked by

vanadate but counteracted by cAMP and high glucose - potential implications for insulin resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1535, 174-185.

Zavaroni, I., Chen, Y.D. and Reaven, G.M. (1982). Studies of the mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism* **31**, 1077-83.

Zeyuan, D., Bingying, T., Xiaolin, L., Jinming, H. and Yifeng, C. (1998). Effect of green tea and black tea on the metabolisms of mineral elements in old rats. *Biol Trace Elem Res* **65**, 75-86.

Ziegenfuss, T.N., Hofheins, J.E., Mendel, R.W., Landis, J., and Anderson, R.A. (2006). Effects of a Water-Soluble Cinnamon Extract on Body Composition and Features of the Metabolic Syndrome in Pre-Diabetic Men and Women. *Journal of Sport Nutrition* **3**, 45-53.

Publications issues de la thèse

Isabelle Hininger, Rachida Benaraba, Mireille Osman, Henri Faure, Anne Marie Roussel and Richard A. Anderson. (2007). Safety of trivalent chromium complexes: no evidence for DNA damage in human HaCaT keratinocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, 42, 1759-1765

Heping Cao, Isabelle Hininger-Favier, Meghan A Kelly, Rachida Benaraba, Harry D Dawson, Sara Coves, Anne M Roussel, and Richard A Anderson. Green tea polyphenol extract regulates the expression of genes involved in glucose uptake and insulin signaling in rats fed a high fructose diet. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 2007, sous presse

Anne-Marie Roussel, Isabelle Hininger, Rachida Benaraba, Tim N. Ziegenfuss and Richard A. Anderson. (2007). Antioxidant effects of a cinnamon extract on overweight subjects with impaired fasting glucose. *Journal of American College of Nutrition*, Mai 2007, soumis

Isabelle Hininger-Favier, Rachida Benaraba, Sara Coves, Diane Aguay, Richard A Anderson and Anne-Marie Roussel. (2007). Green tea extract decreases oxidative stress and improves insulin sensitivity in an animal model of the metabolic syndrome, the fructose-fed rat. *Journal of American College of Nutrition*, 2007, Tracking number MS3032

Isabelle Hininger-Favier, **Rachida Benaraba**, Mireille Osman, Richard A Anderson and Anne-Marie Roussel. (2007). Cinnamon decreases oxidative stress markers and fasting glycemia in an animal model of the metabolic syndrome, the fructose-fed rat. *J Agric Food Chem.*, 2007, submitted

Rachida Benaraba, Florence Hazane, Kita Valenti, Mireille Osman, Alain Favier, Anne-Marie Roussel, Richard A Anderson, Isabelle Hininger-Favier. (2007). Chromium III Histidinate Exposure Modulates Antioxidant Gene Expression in HaCaT Human Keratinocytes Exposed to Oxidative Stress. *Free Radical Biology & Medicine*, June 2007, soumis

ANNEXES

Tableau XVII : Les principales familles de gène d'intérêt présent sur la biopuce : gènes de réparation de l'ADN gènes des enzymes antioxydantes gènes de la régulation de la matrice extracellulaire, gènes régulant l'apoptose, gènes relative au vieillissement, gènes de l'inflammation cellulaire, et gènes ménagers (Hazane et al 2005).

Alphabetical list of genes per family: antioxidant family ($n = 21$), DNA repair family ($n = 32$), tumor suppressive or associated family ($n = 7$), caspase family ($n = 2$), extracellular matrix regulator family ($n = 5$), inflammatory or immune response family ($n = 3$), protooncogene family or associated and ageing related family ($n = 7$) and house keeping genes ($n = 5$)

Gene	Accession Number RNAm	Accession Number	Clone ID	Description	Function
AOE372/PRDX4	NM_006406	A1911758	2329821	Thioredoxin peroxidase	Antioxidant enzyme involved in redox regulation of the cell
CAT	NM_001752	A1076597	1676912	Catalase	Scavenger of hydrogen peroxyde
FBP1	NM_000507	A16774572	2314081	Fructose-16-biphosphatase 1	Gluconogenesis regulatory enzyme catalyzes the hydrolysis of fructose 1,6 BP to F6P + Pi
GLCLC	NM_001498	A1760976	2398721	Glutamate-cysteine ligase (gamma-glutamylcysteine synthetase), catalytic (72.8kD)	Involved in glutathione synthesis
GLCLR	NM_002061	AA931744	1572218	Glutamate-cysteine ligase (gamma-glutamylcysteine synthetase), regulatory (30.8kD)	Involved in glutathione synthesis
GPX1	NM_00581	H98823/N23548	261716	Glutathione peroxidase 1	Detoxification of hydrogen peroxyde
GPX1	NM_00581	A1218741	1565472	Glutathione peroxidase 1	Detoxification of hydrogen peroxyde
GSR	NM_000637	AA574223	1056796	Glutathion reductase	Reduction of glutathione
GSS	NM_000178	A1800712	2063720	Glutathione synthetase	Involved in glutathione synthesis
GSTA4	NM_001512	A1125246	1736518	Glutathione S-transferase A4	Cellular defence against toxic carcinogenesis and pharmacatolly active
GSTM5	NM_000851	A1239656	1846389	GlutathioneS-transferase M5	Electrophilic compounds Cellular defence against toxic carcinogenesis and pharmacatolly active
HMOX1	NM_002133	AW001610	2521989	Heme oxygenase 1	Electrophilic compounds Involved in heme catabolism. Cleaves heme to form biliverdin. Inductible
HMOX2	NM_002134	A1889030	2428794	Heme oxygenase 2	Constitutive heme oxygenase
MPO	NM_000250	A1056254	1673143	Myeloperoxydase	Heme protein synthesis during myeloid differentiation. Involved in the Microbicidal activity of neutrophyles
SEPW1	NM_003009	AW085571	25553615	Selenoprotein W	Involved in oxidation/reduction reactions
SOD1	NM_000454	AI 040245	1663768	ZnCuSOD	Destroys radicals. Cytoplasmic
SOD2	NM_000636	AA011435	429667	MnSOD mitochondrial	Destroys radicals. Mitochondrial sub cellular location
SOD3	NM_003102	A1015650	1635541	ZnCuSOD extracellular	Destroys radicals. Extracellular location
TXN	NM_003329	W95350/W95392	358157	Thioredoxin	Redox control and defence against oxidative stress
TXNL	NM_004786	A885166	2432194	Thioredoxin-like	Acts as thioredoxin

TXNRD1	NM_00330	R93223	196602	Thioredoxin reductase	Including thioredoxin and NADPH. Catalyses the transfer of electrons from NADPH to TXN, acts as a reductant of disulfide-containing proteins.
ADPRTPARP1	NM_001618	AA421106/AA397988	729238	Poly ADP-ribose polymerase transferase	Involved in the BER pathway following DNA damage. Important step in a detection signaling pathway
APC	NM_000038	AW000963	2495009	Adenomatous polyposis coli protein	Control progression through mitosis and the G1 phase of the cell cycle
APEX	NM_001641	AA877644	1160654	AP endonuclease	Repair oxidative DNA damage. May have a role in protection against cell lethality and suppression of mutations
ATR FRP1	NM_001184	AI127664	1710334	Ataxia telangiectasia and RAD3 related Frap related	Related to ATM, a protein kinase encoded by the gene mutated in ataxia telangiectasia
BRCA1	NM_007297	AI217721	1844798	Breast Cancer 1 early onset	Tumor suppressor in human breast cancer. Mutations to BRCA1 are predicted to be responsible for some breast and ovarian cancer
CKNI/CSA 1	NM_000082	AI078139	1676809	Cockayne syndrome 1	Involved in transcription. Defects in CKNI are the cause of Cockayne's syndrome type A
ERCC1	NM_001983	AI143627	1705819	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1	DNA repair endonuclease responsible for the 5' prime incision during DNA repair
ERCC2/XPD	NM_000400	AI918117	2166805	Homo sapiens excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (xeroderma pigmentosum D)	Corrects defective DNA strands. Break repair and sister Chromatid exchange following treatment with ionizing radiation and alkylating agents.
ERCC3/XPB	NM_000122	AI806901	2357699	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)	ATP-dependent 3'-5' DNA helicase involved in NER of DNA
ERCC4/XPF	NM_005236	AA770518	1321363	Homo sapiens excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4	DNA repair endonuclease responsible for the 5' prime incision during DNA repair. Involves in homologous recombination

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Gene	Accession Number RNAm	Accession Number	Clone ID	Description	Function
ERCC5/XPG	NM_000123	AI417946	2112719	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5 (xeroderma pigmentosum, complementation group G (Cockayne syndrome)	DNA repair endonuclease responsible for the 3' incision in NER
GTF2H1/p62	NM_005316	AI636101	2296094	General transcr. factor IIH pept 1(62 kD)	Component of the core-TFIIH, involved in NER
GTF2H4/p52	NM_001517	AI332776	1931028	General transcr.factor IIH pept 4(52 kD)	
Ku80/XRCC5	NM_021141	W52910/AA037353	321207	X-ray Repair Cross-complementing defectice repair in Chinese hamster cells 5	Works in the 3'-5' direction
LIG1	NM_000234	AW024287	2512719	DNA ligase I	It seals during DNA replication, recombinaison and repair Essential for V(D)J recombinaison and DSB, repair through NHEJ
LIG4	NM_002312	R54358	39274	LIG4 DNA ligase IV	
MPG glycosidase	NM_002434	AI209171	1760130	DNA-3-methyladenine glycosidase	Hydrolysis of the deoxyribose N-glycosidic bond to excise 3-methyl adenine and 7-methylguanine from the damaged DNA polymers formed by alkaline lesions
MSH2/COCA2/FCC2	NM_00025	AI948713	2472255	DNA mismatch repair protein	Involved in DNA mismatch repair
MutYH glycosylase	NM_0122222	AW005872	2566061	MutYH glycosylase	Adenine-DNA glycosylase
OGG1 DNA-glycosylase	NM_002542 (variant 1a)	AA689454	1183918	8-Oxoguanine DNA-glycosylase	DNA repair enzyme that incises DNA at the 8-oxoG residues. Excises 8-oxodGuo and Fapy
POLD1	NM_002691	AI934491	2465996	DNA polymerase delta catalytic subunit 1	2 enzymatic activities: DNA synthesis and exonucleolytic activity that degrades single strand DNA in the 3'-5' direction
POLD2	NM_006230	AI628642	2285116	DNA polymerase delta subunit 2	2 enzymatic activities: DNA synthesis and exonucleolytic activity that degrades single strand DNA in the 3'-5' direction
RAD23B HHR23B/p58	NM_002874	AA628957	1033020	Complementing protein for XPC	Involved in DNA excision repair. May play a part in DNA damage recognition and/or altering chromatin structure to allow access by damage-processing enzymes

RAD51 RAD51ARECA	NM_002875	AA568782	1059434	Radiation sensitive abnormal 51	Reduced double-strand breaks-induced homologous recombination in mammalian cells
RAD52	NM_002879	AI056288	1674200	Radiation sensitive abnormal 52	DNA double-strand breaks repair and homologous recombination
RPA2 32 KD	NM_002946	AI870836	2430890	Replication protein 32 KD	Participates in a very early step in initiation. Single strand binding protein
RPA3 replication protein 14 KD	NM_002947	AI688239	2326236	Replication protein 14 KD	Heterodimer consisting of three subunits involved in DNA damage repair
TDG g/t	NM_003211	AI276095	1878108	Thymine-DNA glycosylase	Hydrolytic deamination of the 5'-methylcytosine to thymine leads to the formation of G/T mismatches. Corrects G/T mispairs to G/C pairs. It can remove thymine also from C/T and T/T mispairs in the order G/T>>C/T>T/T
UNG	NM_003362	AA707482	1291981	Uracil-DNA glycosylase	Excises uracil residues from the DNA which arise as a result of misincorporation of dUMP residues by DNA polymerase or due to deamination of cytosine
XPA	NM_000380	AI184821	1731890	Xeroderma pigmentosum complementation group A	Involved in DNA excision repair in initialising repair by binding to damaged sites with various affinities depending on the photoproduct and the transcriptional state of the region
XPC	NM_004628	W93782/W93783	357309	Xeroderma pigmentosum complementation group C	Initiator of global genomic NER
XRCC1	NM_006297	AW009176	2504069	X-ray Repair Cross-complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	Thought to function as a scaffolding protein in both BER single strand break repair
DDIT3 GADD153	NM_004083	AW027012	2512884	DNA damage inducible transcript 3	Belongs to a subgroup of genes which are not rapidly induced by DNA damaging agents but are coordinately induced in growth-arrested cells
GADD45A	NM_001924	W93387/W94971	415112	Growth arrest-DNA damage inducible gamma	Growth arrest and DNA damage-inducible genes. Induced by p53 dependent or independent pathway.

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Gene	Accession Number RNAm	Accession Number	Clone ID	Description	Function
GAS1	NM_002048	AI400635	2112151	Growth arrest specific 1	Specific growth arrest protein involved in growth suppression. Block entry to S phase
GAS2	NM_005256	AI758363	2284211	Growth arrest specific 2	May play a role in apoptosis by acting as a cell death substrate for caspases. The cleaved form induces dramatic rearrangements of the actin cytoskeleton and potent changes in the shape of the affected cells.
MDM2	NM_002392	HI3638	148052	Mouse Double Minute human homolog of p53 binding protein	It is a target gene of the transcription factor tumor protein p53. It is a nuclear phosphoprotein that binds and inhibits transactivation by tumor protein p53, as part of a autoregulatory negative feedback loop.
TP53	NM_000546	AI660717	2346084	p53	Nuclear protein plays an essential role in the regulation of the cell cycle, specifically in the transition G0 to G1. It is found in very low levels in normal cells, but it is expressed in high amount in a variety of transformed cell lines. Mutants of p53 frequently occur in a number of different human cancers.
PCNA	NM_002592	AI186133	1740919	Proliferative cell nuclear antigen	Cofactor of DNA polymerase delta. Involved in DNA replication and following DNA damage, protein is ubiquitinated
CASP1	NM_001223	AI695109	2344212	Caspase 1	Member of the cysteine-aspartic acid protease family. Sequential activation of caspases plays a central role in the execution phase of cell apoptosis
CASP3	NM_004346	AI378787	2069645	Caspase 3	Was shown to cleave and activate caspases 6,7 and 9 and itself Could be processed by caspases 8, 9 and 10
ICAM-1	NM_000201	AI656039	2243477	InterCellular Adhesion Molecule 1 (CD54)	Typically expressed on endothelial cells and cells of the immune system. Binds integrins of type CD11a, CD18 or CD11B/CD18

MMP1	NM_002421	AI038497	1658571	Interstitial collagenase	Breakdown the interstitial collagens, types I, II, and III
MMP2	NM_004530	AI160943	1704954	72kD type IV collagenase gelatinase	Degrades type IV collagen, the major component of basement state
MMP3	NM_002422	AI281285	1873226	Stromelysin 1	Degrades fibronectin, laminin, collagens III, IV, IX and X. Thought to be involved in wound repair, progression of atherosclerosis and tumor initiation
MMP7	NM_002423	AI095584	1697164	Matrilysin	Degrades proteoglycans, fibronectin, elastin and casein. Wound Repair healing
GRO1	NM_001511	W46900	324437	Melanoma growth stimulating activity alpha	Neutrophil chemokines. Involved in inflammation resolution
IL15	NM_000585	AI379606	2068820	Interleukin 15	Cytokine that regulates T and natural killer cell activation and proliferation
MCP1	NM_002982	AA047236/AA04799	488534	Monocyte chemotactic protein SCYA2	Displays chemotactic activity for monocytes and basophiles. Implicated in the pathogenesis of disease characterized by Monocytes infiltration, like psoriasis.
CCNH/Cyclin CAK	NM_001239	AA902797	1519148		Component of TFIIF as well as RNA polymerase II protein complexes. Involved in cell cycle machinery
CROC4	NM_006365	AI6556811	2244561	c-fos transcription activator 4	Specific transcriptional activator of c-fos promoter
FOSB	NM_006732	AI217506	1845251	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	Gene encodes leucine zipper proteins that can dimerize with proteins of the JUN family, thereby forming the transcription factor complex AP-1. Implicated as regulators of cell proliferation, differentiation and transformation
UVARG	NM_003369	AI964046	2514529	UV radiation resistance associated gene	Gene involved in UV radiation resistance
SHC1 p66 SHCSHCA	NM_003029	AI185833	1740808	Src homology 2 domain containing	Involved in ageing process and signaling pathway. Induces elevation of extracellular oxidants, cytochrome c release and apoptosis

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Gene	Accession Number RNAm	Accession Number	Clone ID	Description	Function
TEP1	NM_007110	AW025109	2525515	Telomerase associated protein	Component of the ribonucleoprotein complex responsible for telomerase activity which catalyses the addition of new telomeres on the chromosome ends
TERT	NM_003219	AA748707	1270592	Telomerase reverse transcriptase	Maintains telomere ends by addition of the telomere repeat TTAGGG
ACTB	NM_001101	R97461/R97417	199520	beta-actin	Is one of the different actins isoforms which have been identified. Involved in cell motility, structure and integrity
GAPD	NM_002046	AA021601/AA021106	364038	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Catalyzes an important energy yielding step in carbohydrate metabolism
HPRT	NM_000194	AA774427	1343887	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	Involved in the purine metabolism. Severe deficiency cause Lesh-Nyhan syndrome
RPL32	NM_000994	AI193187	1741568	Ribosomal protein 32	Protein belonging to ribosomes located in the cytoplasm
PLA2G5	NM_000929	AI051138	1669164	Phospholipase A2, group V	Ubiquitously expressed enzyme with key role in intracellular signaling, by releasing arachidonic acid from membranes phospholipids

Are also reported the names of the genes, the accession number of the mRNA, the accession number of the clone chosen, the UniGene number, the description and the gene function.

RESUME

La prévention nutritionnelle du syndrome métabolique dont l'incidence ne cesse d'augmenter dans les pays industrialisés, entraînant des risques accrus de diabète et de maladies cardiovasculaires, apparaît comme un enjeu important de Santé publique. La découverte récente des relations étroites entre l'insulinorésistance, signe majeur du syndrome métabolique et le stress oxydant, nous a conduit à considérer les nutriments, à la fois antioxydants et potentiellement insulino-sensibilisateurs, comme des facteurs nutritionnels de choix dans la stratégie de prévention du syndrome métabolique. Trois microconstituants de notre alimentation ont été étudiés: les polyphénols de la cannelle et du thé vert, le chrome III, oligoélément essentiel.

Sur modèle animal de syndrome métabolique, le rat fructose, les **extraits de thé vert**, riches en épigallocatechine gallate EGCG, non seulement exercent une protection antioxydante sur les principales cibles impliquées dans les complications oxydatives du diabète (lipides, protéines et acides nucléiques) mais, sont également de puissants modulateurs des métabolisme glucidiques et lipidiques. Les extraits de thé vert activent la cascade de signalisation de l'insuline et modifient l'expression des gènes impliqués dans son métabolisme, et en particulier augmente l'expression des GLUT-4 ce qui pourrait expliquer l'amélioration de la glycémie sur notre modèle de syndrome métabolique. Chez l'homme comme chez l'animal, les régimes comportant **des extraits aqueux de cannelle**, exercent une protection antioxydante, et une corrélation avec la régulation de la glycémie a été trouvée. En ce qui concerne **le chrome III**, nous apportons, sur cultures cellulaires, les preuves de son absence de génotoxicité à des doses très supérieures à celles utilisées dans les suppléments chez l'homme, ainsi que des données nouvelles sur son mécanisme d'action antioxydant, impliquant un mécanisme moléculaire d'induction de l'expression de gènes modulant la défense antioxydante et la réparation de l'ADN. Ces premiers résultats sont expérimentaux. Ils démontrent la pertinence d'une association de nutriments antioxydants et insulino potentialisateurs dans la prévention du syndrome métabolique. Cependant, les nombreuses limites dues aux conditions expérimentales imposent de poursuivre ce travail par des études d'intervention chez l'homme, associant dans une supplémentation combinée, extraits de thé vert, extraits aqueux de cannelle et histidinate de chrome.

SUMMARY

The incidence of the metabolic syndrome is increasing in Western countries, leading to high risks of diabetes and cardiovascular diseases. Considering the relationship between insulin resistance and oxidative stress, which are present in the metabolic syndrome, we hypothesized that microconstituants, potentially antioxidant and insulin sensitizers, could be of interest in nutritional prevention of the metabolic syndrome. We focused on green tea extracts, cinnamon extracts, and Chromium III. In an animal model of the metabolic syndrome, the fructose rat, green tea extracts act as antioxidant in protecting lipids, proteins and DNA from oxidative damages, and modulate glucose and lipid metabolism. They activate insulin signalling pathway and modulate the related gene expression. For cinnamon extracts, we show that, in parallel to the insulin potentiating effect, they were powerful antioxidant in animal and in man. Regarding Chromium 3+, already reported as a strong insulin sensitizer, we have demonstrated the lack of genotoxicity of chromium supplementation using culture cell (HACAT), and the modulation of antioxidant gene expression by chromium histidinate. These experimental data strongly suggest the interest of combined intakes of insulin potentiating and antioxidant nutrients in the prevention of metabolic syndrome. However, with respect to the numerous experimental limits, further interventional trial in man, associating green tea and cinnamon polyphenols and chromium III are needed.

MOTS CLEFS: syndrome métabolique, stress oxydant, sensibilité à l'insuline, cannelle, chrome III, rat fructose

KEY WORDS: metabolic syndrome, oxidative stress, insulin sensitivity, green tea, cinnamon, chrome III, fructose fed rat