

# Inhibition de la glycation avancée par les flavonoïdes. Implication nutritionnelle dans la prévention des complications du diabète ?

par Paul Urios\*, \*\* Anne-Marie Grigороva-Borsos\*, Jacques Peyroux\*, Michel Sternberg\*, \*\*\*

\*Équipe de recherche « Protéines modifiées, protéases et physiopathologie de l'endothélium vasculaire », Département de Biochimie, Faculté de Médecine & Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université René Descartes, Paris, France ; \*\*Laboratoire de Biochimie, Hormonologie et Génétique, Hôpital Bichat, 45, rue Henri Huchard, Paris ; \*\*\*Laboratoire de Biochimie, Hôpital St Vincent-de-Paul, 82, avenue Denfert-Rochereau, Paris. E-mail : michel.sternberg@svp.aphp.fr & paul.uriос@bch.aphp.fr

Reçu le 11 avril 2007

## RÉSUMÉ

La glycation avancée des collagènes contribue au développement des complications micro- et macrovasculaires du diabète. Les flavonoïdes sont des anti-oxydants naturels puissants ; il était donc intéressant de tester leurs effets sur la formation d'un produit de glycation avancée, la pentosidine, dans du collagène incubé avec du glucose. Les flavonoïdes monomériques (25 et 250  $\mu\text{M}$ ) réduisent fortement le rapport pentosidine/hydroxyproline en fonction de leur concentration et de leur structure. Les oligomères procyanidiques de pépin de raisin sont plus actifs que

ceux d'écorce de pin. Les oligomères sont clivés en monomères dans le milieu gastrique, et les flavonoïdes monomériques sont absorbés et retrouvés à la concentration micromolaire (avec une longue durée de vie) dans les liquides extra-cellulaires, en contact avec les collagènes. En conclusion les flavonoïdes sont des inhibiteurs puissants de la formation de pentosidine dans les collagènes, actifs aux concentrations micromolaires ; de telles concentrations pourraient être obtenues dans le plasma chez les patients diabétiques après ingestion de flavonoïdes.

## SUMMARY Inhibition of advanced glycation by flavonoids. A nutritional implication for preventing diabetes complications?

Advanced glycation of collagens contributes to development of micro- and macrovascular complications in diabetes. Since flavonoids are potent natural antioxidants, it was interesting to examine their effect on the formation of a cross-linking advanced glycation endproduct, pentosidine, in collagen incubated with glucose. Monomeric flavonoids (25 and 250  $\mu\text{M}$ ) markedly reduced pentosidine/hydroxyproline values in a concentration- and structure-dependent manner. Procyanidin oligomers from grape seed were more

active than pine bark procyanidin oligomers. Oligomers are known to be cleaved into monomers in the gastric milieu and monomeric flavonoids to be absorbed and recovered at micromolar concentrations (with a long plasmatic half-life) in extracellular fluids, in contact with collagens. In conclusion, flavonoids are very potent inhibitors of pentosidine formation in collagens, active at micromolar concentrations; these concentrations might be achieved in plasma of diabetic patients after oral intake of flavonoids.

## INTRODUCTION

La glycation avancée ou glyco-oxydation des collagènes, qui augmente naturellement avec l'âge, contribue au développement des complications chroniques vasculaires du diabète. La glycation résulte de la fixation de glucose sur les protéines par voie non-enzymatique, comme dans l'hémoglobine glyquée. Le résidu glucidique peut être oxydé ultérieurement pour donner un produit de glycation avancée (AGE, Advanced Glycation Endproduct), susceptible de modifier les propriétés phy-

sico-chimiques des protéines et particulièrement des protéines à longue durée de vie comme les protéines collagéniques, par création de liaisons croisées entre les chaînes peptidiques. Or les collagènes sont particulièrement abondants dans les parois des petits vaisseaux (du rein et de la rétine) et des artères comme l'aorte. La pentosidine résultant de la glyco-oxydation est un marqueur plus spécifique que la fluorescence globale liée aux AGE. La glycation avancée ou glyco-oxydation peut altérer la perméabilité sélective glomérulaire aux protéines au cours du diabète. L'aminoguanidine et la pyridoxamine,

inhibiteurs de la glyco-oxydation, préviennent la protéinurie et la rétinopathie au cours du diabète expérimental chez le rat (Stitt *et al.*, 2002). Une corrélation a été mise en évidence entre les teneurs en pentosidine du collagène, ajustées pour l'âge, et la sévérité des complications chez les diabétiques de type I (Sell *et al.*, 1992). Ces teneurs cutanées en pentosidine sont associées de façon significative avec la néphropathie et la neuropathie après ajustement pour la durée du diabète et l'âge (Monnier *et al.*, 1999a). Il a été montré que des antioxydants variés pouvaient inhiber la formation de pentosidine lors de l'incubation du collagène avec du glucose (Elgawish *et al.*, 1996), particulièrement avec des chélateurs d'ions métalliques (Elgawish *et al.*, 1996; Price *et al.*, 2001). Les flavonoïdes, monomériques ou oligomériques, sont des antioxydants naturels présents dans divers végétaux (De Groot & Rauven, 1998; Kris-Etherton *et al.*, 2004). Les flavonoïdes peuvent corriger l'hypoalbuminémie chez des rats diabétiques normaux ou hypertendus (Urios *et al.*, 2000b). L'étude de l'effet anti-glycation avancée des flavonoïdes a été menée avec différents flavonoïdes monomériques et oligomériques en utilisant un modèle

de glycation avancée du collagène par du glucose à forte concentration *in vitro* (Urios *et al.*, 2004).

### Rappel sur la formation des AGE et leurs effets délétères

La glycation des protéines est initiée par une réaction entre un groupement aminé libre et la fonction carbonyle d'un ose pour former une base de Schiff réversible (Fig. 1). Cette dernière peut subir un réarrangement en cétoamine stable ou produit d'Amadori. L'échelle temps est de quelques heures pour la formation de la base de Schiff et de quelques jours pour la formation du produit d'Amadori. Ce dernier peut se transformer, en quelques semaines, en produits dicarbonylés très réactifs comme les glucosones pour former des AGE (par exemple la 1,4-désoxyglucosone liée à une protéine précurseur du glucosepane représentée dans la figure 2). Le produit d'Amadori peut, également, subir une fragmentation oxydative (glyco-oxydation) et donner des AGE comme la carboxyméthyl-lysine ou la pentosidine; d'autres voies de formation des AGE ont aussi été décrites

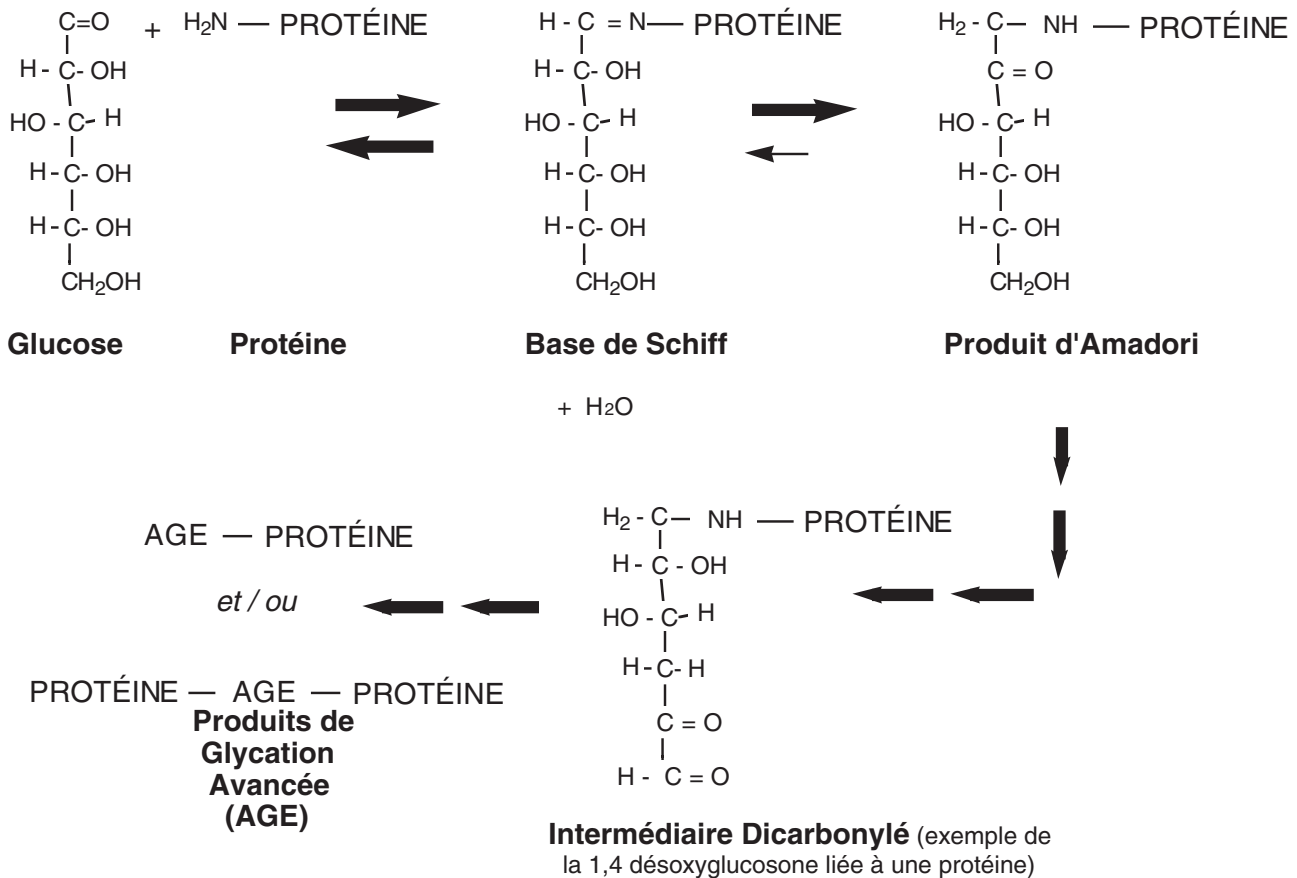
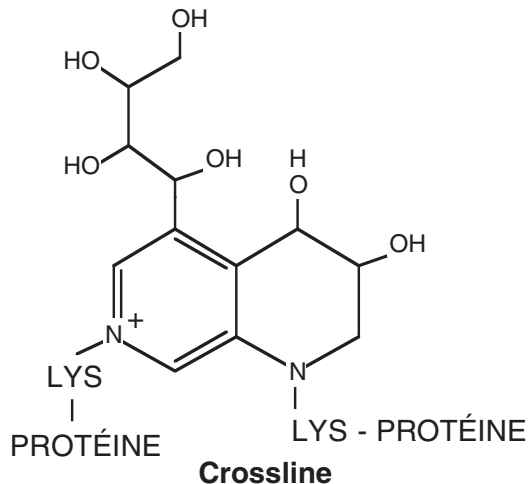
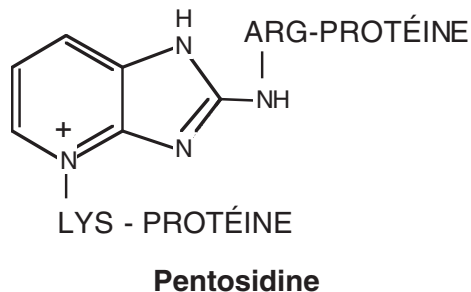


FIG. 1. — Exemple de la voie classique de glycation d'une protéine conduisant aux AGE *via* le produit d'Amadori. La réaction initiale d'un glucose avec le groupement aminé d'une protéine donne une base de Schiff réversible qui peut subir un réarrangement conduisant à une fructosamine ou produit d'Amadori. Avec le temps les produits d'Amadori peuvent évoluer vers un produit de Maillard ou AGE *via* des intermédiaires dicarbonylés comme la 1,4 désoxyglucosone.

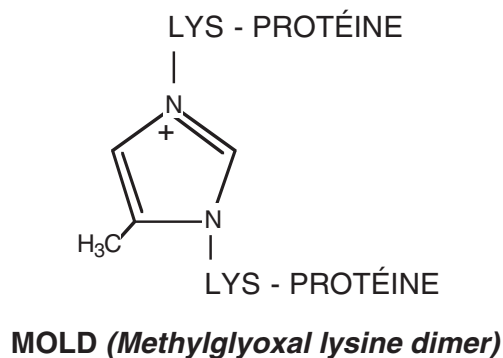
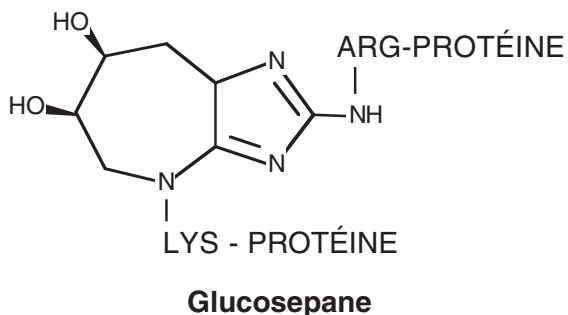
(Monnier, 2003 ; Peyroux & Sternberg, 2006). Le glucose peut être directement oxydé en présence de métaux catalytiques et de O<sub>2</sub> (auto-oxydation). Ce mécanisme, impliqué dans le diabète avec insuffisance rénale et/ou

athérosclérose, mène à la formation de glyoxal (CHO-CHO) et d'arabinose. Ce pentose peut ensuite réagir avec les protéines pour former des AGE tels que la pentosidine (Fig. 3).

**(A) AGE Fluorescents à Liaison Croisée :**



**(B) AGE Non-Fluorescents à Liaison Croisée :**



**(C) AGE Dépourvus de Liaison Croisée :**

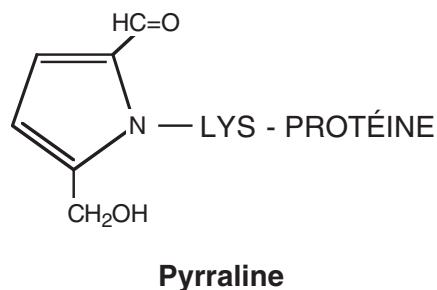
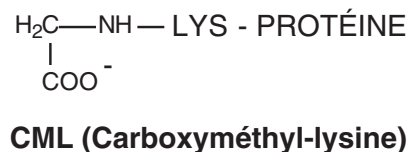


FIG. 2. – Structures chimiques de trois types d'AGE : (A) AGE fluorescents à liaisons croisées comme la pentosidine et la crossline ; (B) AGE non-fluorescents à liaisons croisées comme le glucosepane et le MOLD ; (C) AGE dépourvus de liaisons croisées comme la CML et la pyrraline.

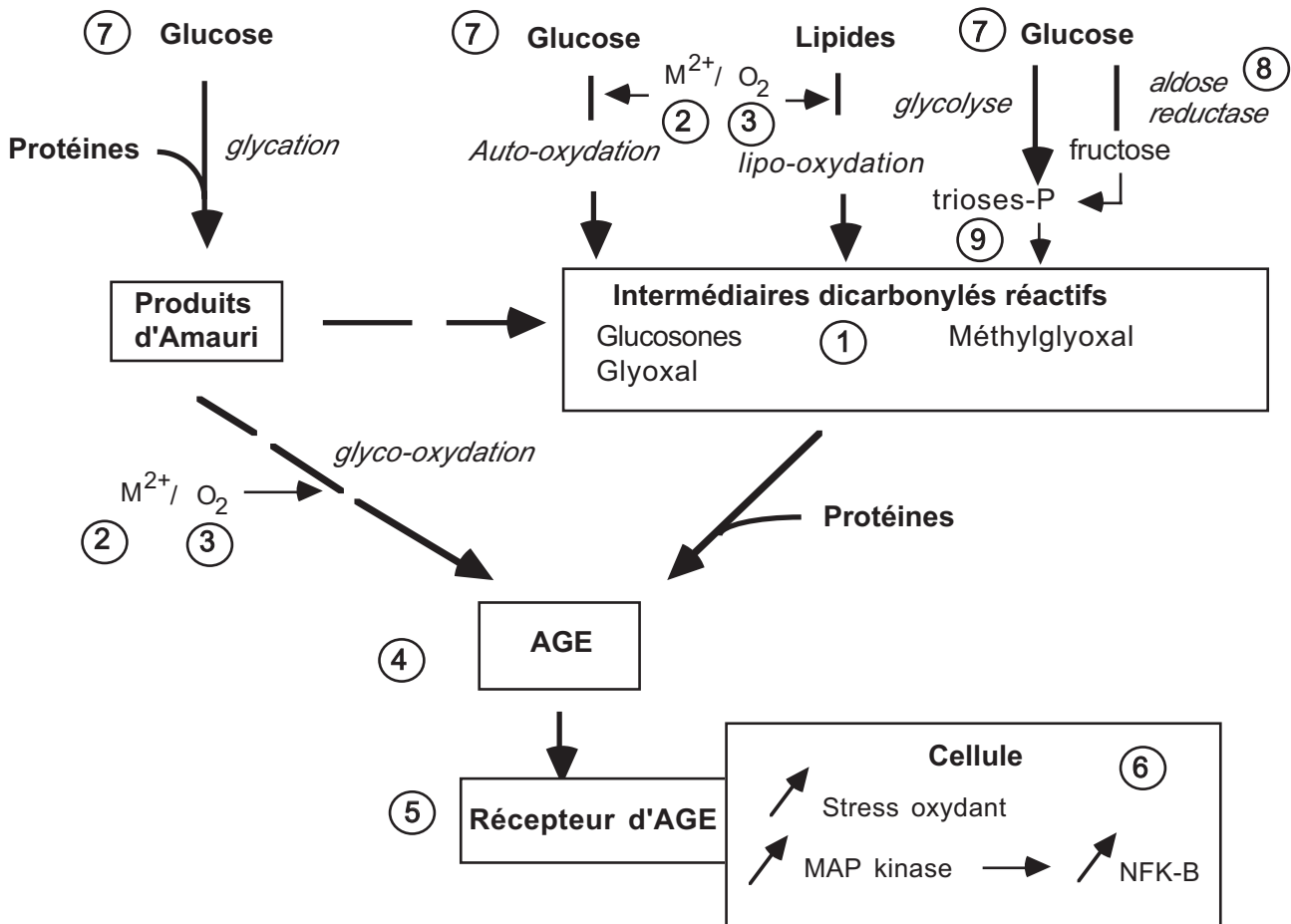


FIG. 3. – Sites potentiels d'inhibition de la formation des AGE et de leur effets biologiques : 1) capture des intermédiaires dicarbonylés réactifs ; (2) activité antioxydante par chélation de métaux de transition ( $M^{2+}$ ) ; (3) autre activité antioxydante, y compris le piégeage des radicaux libres ; (4) clivage des liaisons croisées des AGE ; (5) inhibition des récepteurs des AGE (RAGE) ; (6) blocage des voies de signalisation des récepteurs des AGE (RAGE) ; (7) réduction de la glycémie par les anti-diabétiques ; (8) inhibition de l'aldose reductase ; (9) court-circuitage des trioses-P vers la voie des pentoses-P par activation de la transcétole. Les réactions en excès de groupements aminés des protéines avec des composés dicarbonylés réactifs caractérisent le *stress carbonylé*. La glyco-oxydation, l'auto-oxydation du glucose et la lipo-oxydation contribuent au *stress oxydant*.

Les principaux AGE peuvent être classés en trois groupes selon leurs propriétés structurales (Fig. 2) : (A) Les AGE fluorescents et pouvant établir une liaison croisée entre une arginine et une lysine (pour la pentosidine) ou entre deux lysines (pour la crossline) ; (B) les AGE non fluorescents et pouvant établir une liaison croisée entre une arginine et une lysine (pour le glucosepane) ou entre deux lysines (pour MOLD, *methylglyoxal lysine dimer*), et (C) les AGE non fluorescents, ne réagissant qu'avec une seule chaîne peptidique (comme la carboxyméthyl-lysine, composé répandu provenant non seulement de la glyco-oxydation mais aussi de la lipo-oxydation (représentées dans la figure 3).

*Les effets délétères des AGE* : les réactions de groupements aminés des protéines avec des composés dicarbonylés réactifs contribuent au *stress carbonylé*. La glyco-oxydation, l'auto-oxydation du glucose, la lipo-

oxydation contribuent au *stress oxydant*. Les AGE ainsi formés altèrent les propriétés physicochimiques des protéines à longue durée de vie, notamment celles de la matrice extra-cellulaire, en particulier dans les parois vasculaires.

### Les inhibiteurs de la glycation avancée

*Les sites potentiels d'inhibition* de la formation des AGE sont indiqués dans la figure 3. Les résultats obtenus jusqu'ici, en clinique avec *les agents pharmacologiques inhibiteurs de la glycation avancée*, comme l'aminoguanidine, ont été généralement décevants, en administration chronique, en grande partie à cause d'effets secondaires rédhitoires (Peyroux & Sternberg, 2006). *Les flavonoïdes* sont des antioxydants naturels qui peuvent exercer leur pouvoir inhibiteur sur la formation des AGE (Urios *et al.*, 2007).

## ÉTUDE *IN VITRO* DE L'EFFET INHIBITEUR DE LA GLYCATION AVANCÉE DES FLAVONOÏDES

### Structure des flavonoïdes étudiés

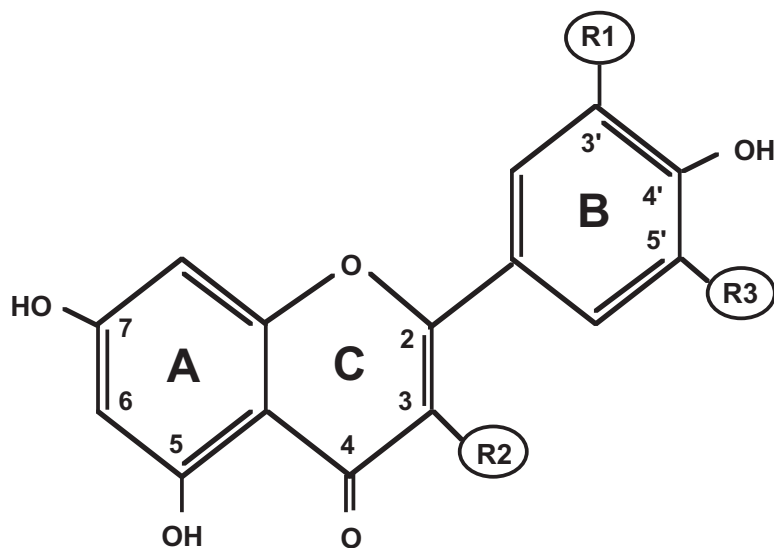
Les flavonoïdes ont en commun un noyau composé de trois cycles A, C et B (Fig. 4). Les flavonoïdes monomériques qui ont fait l'objet de notre étude se distinguent par leurs radicaux R1, R2, R3 (qui peuvent correspondre à un hydroxyle), par l'existence d'une double liaison 2-3 et d'une fonction cétone en position 4 du cycle C (flavonols). Les catéchines sont caractérisées par l'absence de double liaison 2-3 et de fonction cétone du cycle C (flavanols).

Les oligomères procyanidiques ou OPC de pépin contiennent de la (+)catéchine et de l'épicatéchine (épimère en 3 de la catéchine), essentiellement sous forme de dimères ou de tétramères. Ces flavanes-3-ol sont partiellement estérifiées par l'acide gallique pour former des 3-*O*-gallates (Yang & Chien, 2000). Les oligomères procyanidiques ou OPC d'écorce de pin sont constitués de catéchine et d'épicatéchine sans galloylation (Tourino *et al.*, 2005). Tous ces flavonoïdes monomériques ou oligomériques sont présents dans certains aliments et breuvages d'origine végétale (Tableau I).

### Matériel et méthodes

Une suspension de collagène insoluble de tendon d'Achille bovin (9 mg/ml) dans un tampon de phosphate de sodium 200 mM pH 7,4 a été incubée en présence ou en absence de glucose (250 mM), et en présence ou absence de différents flavonoïdes monomériques ou oligomériques pendant 28 jours, sous agitation dans un bain-marie à 37° C, à l'obscurité. Les tubes ont été ré-aérés chaque semaine et du toluène (10 µl) rajouté pour prévenir une contamination bactérienne. Le collagène lyophilisé est soumis à hydrolyse acide en HCl 6 M pendant 20 h, sous vide en présence de pyridoxamine (6 µM) pour prévenir toute néoformation artéfactuelle de pentosidine. La pentosidine et l'hydroxyproline ont été mesurées par HPLC (Monnier *et al.*, 1999b) et par méthode colorimétrique (Woessner, 1961), respectivement. Le standard de pentosidine a été généreusement fourni par V. Monnier. Le rapport pentosidine/hydroxyproline (RPH, pmol/µmol) est calculé. Il est exprimé en % du RPH obtenu avec le témoin (collagène + glucose) en absence de flavonoïde (Urios *et al.*, 2007).

Différentes expériences ont ainsi été menées en utilisant comme inhibiteur de la glycation avancée de réfère-



FLAVONOÏDE	R1	R2	R3	4-oxo	Δ 2-3
MYRICÉTINE	OH	OH	OH	présent	présente
QUERCÉTINE	OH	OH	H	présent	présente
RUTINE	OH	Rha-Glc-	H	présent	présente
KAEMPFÉROL	H	OH	H	présent	présente
(+) CATÉCHINE	OH	OH ( <i>S trans</i> )	H	absent	absente

FIG. 4. – Structure de base commune et fonctions particulières des divers flavonoïdes monomériques étudiés.

TABLEAU I. – Concentration plasmatique maximale et demi-vie de flavonoïdes consommés seuls ou dans des aliments chez l'Homme.

Flavonoïde	Source	Quantité de flavonoïde ingérée (mg)	Concentration plasmatique maximale ( $\mu\text{M}$ )	Demi-vie plasmatique (h)	Référence
<i>Flavonols</i>					
Quercétine	Onion	100	7,6	10,9	Graefe <i>et al.</i> , 2001
Quercétine-4'-O-glucoside	Composé pur	100	7,0	11,9	Graefe <i>et al.</i> , 2001
Quercétine-3-O-rhamnoglucoside (Rutine)	Composé pur	200	1,1	11,8	Graefe <i>et al.</i> , 2001
Quercétine-3-O-glucoside	Composé pur	156	5	18,5	Olthof <i>et al.</i> , 2000
<i>Flavonols ou Catéchines</i>					
Catéchine	Composé pur	500	2,0	1,1	Balant <i>et al.</i> , 1979
Catéchine	Composé pur	2000	7,8	1,1	Balant <i>et al.</i> , 1979
Épicatéchine	Cacao, 26,4 g	323	5,9	NA	Holt <i>et al.</i> , 2002
Épigallocatechine	Thé vert, extrait	115	1,2 (EGC)	1,0	Leenen <i>et al.</i> , 2000
			6,9 (MeEGC)	4,4	Leenen <i>et al.</i> , 2000
Épigallocatechine gallate	Thé vert, infusion, 1,2 g	88	0,33	3,4	Lee <i>et al.</i> , 1995
Épigallocatechine gallate	Thé vert, infusion, 6 g	NA	5,0	NA	Maiani <i>et al.</i> , 1997
Épigallocatechine gallate	Thé vert, extrait	525	4,4	NA	Nakagawa <i>et al.</i> , 1997
<i>Procyanidines</i>					
Procyanidine dimétrique B2	Cacao, 26,4 g	256	0,041	NA	Holt <i>et al.</i> , 2002
Procyanidine dimétrique B1	Dimère	18	0,011	NA	Sano <i>et al.</i> , 2003

NA : non analysé.

rence l'aminoguanidine (10 et 40 mM) et comme flavonoïde standard interne, la quercétine (25 et 250  $\mu\text{M}$ ). En dehors de l'aminoguanidine, piègeur classique d'intermédiaires dicarbonylés, deux chélateurs de cations métalliques, l'EDTA et le DTPA, aux concentrations de 10 et 40 mM ont aussi été testés, dans nos conditions expérimentales, pour étudier les mécanismes possibles d'action inhibitrice. Les flavonoïdes monomériques : quercétine, rutine, kampférol, myricétine, (+)catéchine ont été ajoutés dans le milieu d'incubation dans 20  $\mu\text{l}$  d'éthanol pour des concentrations finales de 250, 25 et aussi de 2,5  $\mu\text{M}$  pour les inhibiteurs les plus actifs.

Les OPC de pépin de raisin et d'écorce de pin sont ajoutés à la suspension collagénique aux concentrations finales de 10 et 100 mg/dl.

*Analyse statistique* : chaque condition expérimentale est représentée 4 fois ; les comparaisons statistiques sont menées par analyse de variance à deux facteurs (le glucose et le traitement) suivie du test de Bonferroni-Student.

## Résultats

La figure 5 montre un exemple de résultats expérimentaux obtenus. L'aminoguanidine aux concentrations de 40 et 89 mM réduit le rapport RPH à  $33,5 \pm 3,3$  % ( $p < 0,001$  versus le témoin : collagène + glucose) et à  $2,7 \pm 1,4$  % ( $p < 0,001$ ), respectivement (Fig. 5). La quercétine aux concentrations finales de 25 et de 250  $\mu\text{M}$  réduit ce rapport RPH à  $47,8 \pm 4$  % ( $p < 0,001$ ) et à  $14,1 \pm 1,4$  % ( $p < 0,001$ ), respectivement. La rutine (25  $\mu\text{M}$ ), composé proche structurellement de la quercétine (conjugaison au niveau de R2 par un rhamnosyl-glucose), exerce un effet inhibiteur 14,2 % fois moindre que la quercétine. La (+)catéchine (25  $\mu\text{M}$ ) a un effet inhibiteur 20,4 % moindre que celui de la quercétine

(25  $\mu\text{M}$ ). Le kampférol ne réduit pas significativement le rapport RPH à 25  $\mu\text{M}$ . A 250  $\mu\text{M}$ , il réduit le rapport RPH à  $49,6 \pm 3,7$  % ( $p < 0,001$ ). La myricétine réduit ce rapport RPH à  $30,1 \pm 7,1$  % ( $p < 0,001$ ) et à  $22 \pm 7,1$  % ( $p < 0,001$ ) aux concentrations de 25 et 250  $\mu\text{M}$ , respectivement (Fig. 6). La myricétine est le flavonoïde qui présente la plus forte activité inhibitrice dans nos conditions expérimentales, bien que la différence avec la quercétine ne soit pas significative.

Tous les flavonoïdes monomériques testés présentent une activité inhibitrice sur l'apparition de pentosidine dans nos conditions expérimentales. Cette activité inhibitrice dépend non seulement de la concentration ( $p < 0,001$  250 vs 25  $\mu\text{M}$  pour chaque flavonoïde monomérique testé, mais aussi de la structure, à la concentration de 25  $\mu\text{M}$  pour chaque flavonoïde). Nous pouvons observer une activité inhibitrice selon l'ordre décroissant suivant (Sternberg *et al.*, 2002) :

*myricétine*  $\geq$  *quercétine*  $>$  *rutine*  $>$  (+) *catéchine*  $>$  *kampférol*

La conjugaison par un rhamnosyl-glucose abaisse l'activité inhibitrice (Urios *et al.*, 2000a) : la rutine présente une activité inhibitrice diminuée de 14,2 % par rapport à la quercétine ( $p < 0,01$ );

La présence d'un 3'-OH augmente cette activité inhibitrice, avec une différence de 36,8 % d'inhibition entre la quercétine et le kampférol ( $p < 0,001$ );

La présence d'un 5'-OH, dans la myricétine, augmente de 18,5 % l'activité inhibitrice par rapport à la quercétine, bien que cette différence ne soit pas significative ( $p = 0,17$ );

La présence d'une fonction cétone en 4 et d'une double liaison 2-3, augmente l'activité inhibitrice, avec une différence de 20,4 % d'inhibition entre la quercétine et la (+)catéchine ( $p < 0,02$ ).

## PENTOSIDINE / HYDROXYPROLINE, % du Témoin

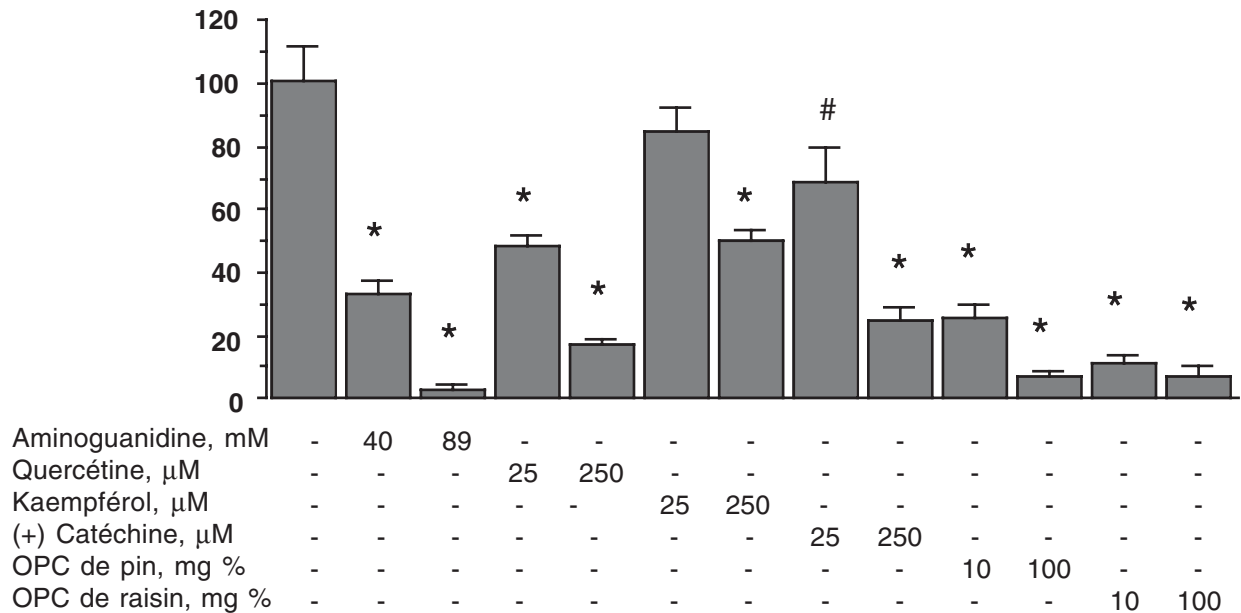


FIG. 5. – Exemple de résultats d'une expérience montrant les effets de l'aminoguanidine, de la quercétine, de la (+)catéchine, du kaempférol et d'oligomères de procyanidines d'écorce de pin ou de pépin de raisin sur le rapport pentosidine/hydroxyproline dans le collagène, après incubation en présence de glucose. Les résultats sont exprimés en % du témoin «collagène + glucose» (après soustraction des témoins sans glucose, voir Urios *et al.*, 2007). \*,  $p < 0,001$ ; #,  $p < 0,01$  en comparaison avec le témoin «collagène + glucose».

*Les oligomères procyanidiques* : les OPC d'écorce de pin réduisent le rapport RPH à  $25,2 \pm 4,1$  % et à  $7,4 \pm 1,5$  % du RPH du témoin, à 10 et 100 mg/dl, respectivement ( $p < 0,001$ ). Les OPC de pépin de raisin réduisent plus efficacement ce rapport RPH à  $10,6 \pm 3$  % et à  $7,1 \pm 3$  % du RPH du témoin, à 10 et 100 mg/dl, respectivement ( $p < 0,001$ ). Les OPC de pépin de raisin présentent une activité inhibitrice plus importante que les OPC d'écorce de pin ( $p < 0,01$  à la concentration de 10 mg/dl).

*L'effet inhibiteur  $CI_{50}$*  : la myricétine et la quercétine étudiées aux doses de 2,5, de 25 et de 250 µM, présentent des courbes dose-réponse permettant la détermination d'une concentration inhibitrice  $CI_{50}$  de 7 et de 24,5 µM, respectivement (Fig. 6).

## DISCUSSION

Dans la littérature (citée dans Urios *et al.*, 2007), une activité inhibitrice de certains flavonoïdes a été également décrite sur la glycation avancée de l'albumine sérique, évaluée essentiellement par mesure globale de fluorescence.

### Mécanisme d'action des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent exercer leur pouvoir inhibiteur sur la formation des AGE en chélatant les métaux de

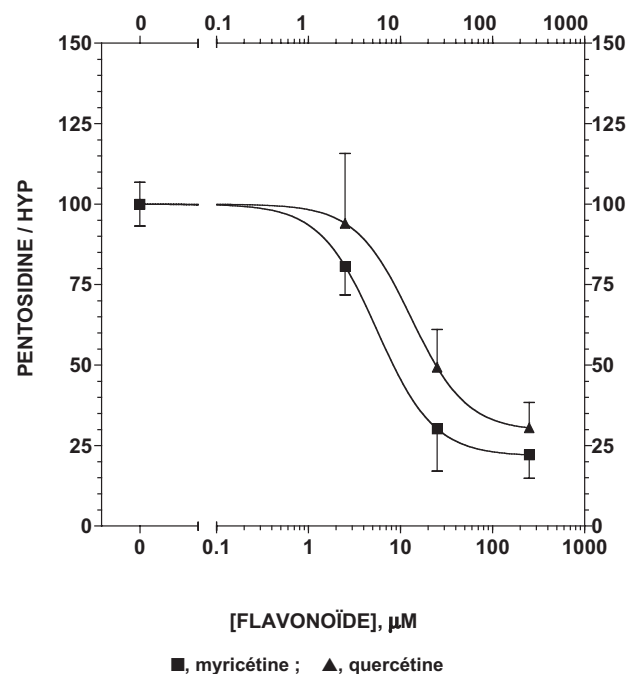


FIG 6. – Effets de la quercétine et de la myricétine sur le rapport pentosidine/hydroxyproline dans le collagène, après incubation en présence de glucose, en fonction de la concentration en flavonoïde.  $CI_{50}$  de la myricétine = 7 µmol/l;  $CI_{50}$  de la quercétine = 24,5 µmol/l.

transition ( $M^{2+}$ ) et/ou en piégeant les radicaux libres ou les espèces oxygénées non-radicalaires.

Lors de la glycation du collagène par le glucose dans nos conditions expérimentales, les chélateurs comme l'EDTA et le DTPA ont un effet important sur la production de pentosidine [à 10 mM, le rapport RPH est ramené à  $34 \pm 11$  % et à  $5 \pm 0,5$  % pour l'EDTA et le DTPA ( $p < 0,001$ ) et à 100 mM, le rapport est ramené à  $35 \pm 3$  % et à  $6 \pm 3$  %, respectivement ( $p < 0,001$ )]. Par ailleurs, nous avons vu que l'aminoguanidine, piègeur classique de dicarbonyles, était aussi un inhibiteur puissant. Il est donc difficile de privilégier l'un de ces deux mécanismes possibles d'inhibition pour les flavonoïdes dans notre modèle expérimental.

### Biodisponibilité des flavonoïdes

*In vivo*, les oligomères procyanidiques peuvent être clivés en monomères dans le milieu gastrique. Les fla-

vonoides monomériques sont absorbés et retrouvés à la concentration micromolaire dans le plasma. Les concentrations plasmatiques maximales de la quercétine, de la rutine, de la catéchine, de l'épicatéchine et des OPC, retrouvées après consommation de ces composés sont comprises entre 1 et 8  $\mu$ M. Leur demie-vie varie de 1 à 8 heures (Tableau II). *In vitro*, les flavonoïdes monomériques testés ont montré un pouvoir inhibiteur dès la concentration de 25  $\mu$ M (excepté le kampférol) avec une  $CI_{50}$  de 7  $\mu$ M pour la myricétine. Par conséquent, les flavonoïdes pourraient être actifs *in vivo*, sur la glycation avancée des collagènes en contact avec le plasma ou les liquides interstitiels.

### Effet inhibiteur des flavonoïdes sur la glycation avancée *in vivo*

*Au cours du diabète expérimental*, l'augmentation de la fluorescence liée au collagène est inhibée non seule-

TABLEAU II. – Exemples de teneurs maximales en divers flavonoïdes dans différents breuvages (mg/l) et aliments (mg/kg d'aliment frais, sauf exception\*). Les teneurs peuvent varier suivant l'espèce végétale, la saison, le climat, la luminosité, le degré de maturation, le mode de préparation (Aherne *et al.*, 2002).

	Flavonols			Catéchines		Références
	Quercétine	Kaempférol	Myricétine	Monomères	Procyanidines	
<b>Légumes</b>						
Oignons	347 <sup>a</sup>	< 2 <sup>a</sup>	< 1 <sup>a</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	<sup>a</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1992; <sup>b</sup> Manach <i>et al.</i> , 2004
Chou frisé	110 <sup>a</sup>	211 <sup>a</sup>	< 1	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	<sup>a</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1992; <sup>c</sup> Gu <i>et al.</i> , 2003
Haricot vert	39 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	< 1 <sup>a</sup>	450 <sup>b</sup>	NM <sup>b</sup>	<sup>a</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1992; <sup>b</sup> Manach <i>et al.</i> , 2004
Fève	20 <sup>a</sup>	< 2 <sup>a</sup>	26 <sup>a</sup>	808 <sup>d</sup>	736 <sup>d</sup>	<sup>a</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1992; <sup>d</sup> de Pascual-Teresa <i>et al.</i> , 2000
Broccoli	30 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>	< 1 <sup>a</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	<sup>a</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1992; <sup>c</sup> Gu <i>et al.</i> , 2003
<b>Fruits</b>						
Fraise	8,6 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	< 1 <sup>a</sup>	102 <sup>d</sup>	103 <sup>d</sup>	<sup>a</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1992; <sup>d</sup> de Pascual-Teresa <i>et al.</i> , 2000
Pomme	36 <sup>a</sup>	< 2 <sup>a</sup>	< 1 <sup>a</sup>	105 <sup>c</sup>	1000 <sup>e</sup>	<sup>a</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1992; <sup>c</sup> Scalbert <i>et al.</i> , 2000
Abricot	25 <sup>a</sup>	< 2 <sup>a</sup>	< 1 <sup>a</sup>	200 <sup>b</sup>	2 <sup>d</sup>	<sup>a</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1992; <sup>b</sup> Manach <i>et al.</i> , 2004; <sup>d</sup> Scalbert <i>et al.</i> , 2000
Cerise	15 <sup>a</sup>	< 2 <sup>a</sup>	< 1 <sup>a</sup>	135 <sup>b</sup>	700 <sup>c</sup>	<sup>a</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1992; <sup>b</sup> Manach <i>et al.</i> , 2004; <sup>c</sup> Scalbert <i>et al.</i> , 2000
Prune	9 <sup>a</sup>	< 2 <sup>a</sup>	< 1 <sup>a</sup>	96 <sup>d</sup>	400 <sup>d</sup>	<sup>a</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1992; <sup>d</sup> de Pascual-Teresa <i>et al.</i> , 2000
Canneberge	121 <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	142 <sup>f</sup>	NM <sup>g</sup>	610 <sup>g</sup>	<sup>f</sup> Hakkinen <i>et al.</i> , 1999; <sup>g</sup> Hammerstone <i>et al.</i> , 2000
Raisin (noir)	15 <sup>a</sup>	< 2 <sup>a</sup>	4,5 <sup>a</sup>	344 <sup>h</sup>	540 <sup>h</sup>	<sup>a</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1992; <sup>h</sup> Waterhouse <i>et al.</i> , 2002
Raisin (blanc)	12 <sup>a</sup>	< 2 <sup>a</sup>	4,5 <sup>a</sup>	ID (24 %) <sup>c</sup>	ID (76 %) <sup>c</sup>	<sup>a</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1992; <sup>c</sup> Gu <i>et al.</i> , 2003
<b>Boissons</b>						
Jus de raisin (rouge)	4,4 <sup>j</sup>	< 0,5 <sup>j</sup>	6,2 <sup>j</sup>	51 <sup>k</sup>	99 <sup>k</sup>	<sup>j</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1993; <sup>k</sup> Fuleki <i>et al.</i> , 2003
Jus de raisin (blanc)	NM <sup>l</sup>	NM <sup>l</sup>	NM <sup>l</sup>	18 <sup>k</sup>	28 <sup>j</sup>	<sup>j</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1993; <sup>k</sup> Fuleki <i>et al.</i> , 2003
Vin rouge	191	2 <sup>l</sup>	9 <sup>l</sup>	272 <sup>c</sup>	360 <sup>c</sup>	<sup>c</sup> Scalbert <i>et al.</i> , 2000; <sup>l</sup> de Vries <i>et al.</i> , 2001
vin blanc	< 0,5 <sup>j</sup>	< 0,5 <sup>j</sup>	1 <sup>j</sup>	15 <sup>m</sup>	50 <sup>h</sup>	<sup>h</sup> Waterhouse <i>et al.</i> , 2002; <sup>j</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1993; <sup>m</sup> Carando <i>et al.</i> , 1999
Thé (2 g/100 ml)						
Noir	50 <sup>j</sup>	32 <sup>j</sup>	10 <sup>j</sup>	186 <sup>d</sup>	82 <sup>d</sup>	<sup>j</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1993; <sup>d</sup> de Pascual-Teresa <i>et al.</i> , 2000
Vert	46 <sup>j</sup>	30 <sup>j</sup>	24 <sup>j</sup>	384 <sup>d</sup>	55 <sup>d</sup>	<sup>j</sup> Hertog <i>et al.</i> , 1993; <sup>d</sup> de Pascual-Teresa <i>et al.</i> , 2000
<b>Chocolat</b> (noir)	NM <sup>c</sup>	NM <sup>c</sup>	NM <sup>c</sup>	800 <sup>c</sup>	4300 <sup>c</sup>	<sup>c</sup> Scalbert <i>et al.</i> , 2000
<b>Cacao</b> (poudre)*	70 <sup>n</sup>	ND <sup>n</sup>	ND <sup>n</sup>	12000 <sup>p</sup>	38000 <sup>p</sup>	<sup>n</sup> Lamuella-Raventos <i>et al.</i> , 2001; <sup>p</sup> Holt <i>et al.</i> , 2002

\* : mg/kg d'extrait sec en poudre; + : seuls les dimères ont été mesurés; ID : identifiés sans quantification; ND : non détecté; NM : non mentionné.



ment par l'aminoguanidine mais également par des flavonoïdes tels que la rutine ou la diosmine (Odetti *et al.*, 1990; Vertommen *et al.*, 1994). Chez des rats diabétiques normo- et hypertendus, l'administration d'une fraction purifiée et micronisée de flavonoïdes réduit significativement la clearance urinaire de l'albumine et corrige l'hypoalbuminémie (Urios *et al.*, 2000b).

## CONCLUSION

Chez le patient diabétique, le contenu en AGE du collagène cutané et singulièrement le taux de pentosidine est lié à l'importance des complications microvasculaires (Sell *et al.*, 1992; Sternberg *et al.*, 2003). Les principaux essais cliniques des inhibiteurs de la glycation avancée, comme l'aminoguanidine, ont malheureusement été arrêtés en dépit de leurs effets notables, à cause de leurs effets rédhibitoires. Il apparaît donc que les aliments et breuvages d'origine végétale, riches en flavonoïdes, ou certaines préparations nutraceutiques de ces composés pourraient être utilisés pour la prévention à long terme des complications chroniques liées à la glyco-oxydation au cours du diabète. On peut donc spéculer sur les effets bénéfiques d'un apport prolongé de ces flavonoïdes chez le patient diabétique, pouvant constituer ainsi un réel traitement adjuvant aux anti-diabétiques.

**Remerciements.** – Ce travail a été soutenu par « La Fondation pour la Recherche Médicale » et « Naturalia & Biologia ». Nous remercions S. FEING, J. GARAUD, A. ROUX et C. ADAM pour leur assistance technique.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aherne S. A. & O'Brien N. M., Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 2002, 18, 75-81.
- Balant L., Burki B., Wermeille M. & Golden G., Comparison of some pharmacokinetic parameters of (+)-cyanidanol-3 obtained with specific and non-specific analytical methods. *Arzneimittelforschung*, 1979, 29, 1758-1762.
- Carando S., Teissedre P.-L., Pascual-Martinez L. & Cabanis J.-C., Levels of flavan-3-ols in french wines. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 4161-4166.
- De Groot H. & Rauen U., Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 1998, 12, 249-255.
- De Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C. & Rivas-Gonzalo J. C., Quantitative analysis of flavan-3-ols in spanish foodstuffs and beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 5331-5337.
- De Vries J. H., Hollman P. C., van Amersfoort I., Olthof M. R. & Katan M. B., Red wine is a poor source of bioavailable flavonols in men. *J. Nutr.*, 2001, 131, 745-748.
- Elgawish A., Glomb M., Friedlander M. A. & Monnier V. M., Involvement of hydrogen peroxide in collagen crosslinking by high glucose *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 12964-12971.
- Fuleki T. & Ricardo-Da-Silva J. M., Effects of cultivar and processing method on the contents of catechins and procyanidins in grape juice. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 640-646.
- Graefe E. U., Wittig J., Mueller S., Tiethling A. K., Uehleke B., Drelow B., Pforte B., Jacobasch G., Derendorf H. & Veit M., Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J. Clin. Pharmacol.*, 2001, 41, 492-499.
- Gu L., Kelm M., Hammerstone J. F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D. & Prior R. L., Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 7513-7521.
- Hakkinen S. H., Karenlampi S. O., Heinonen M., Mykkanen H. M. & Torronen A. R., Content of the flavanols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edibles berries. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 2274-2279.
- Hammerstone J. F., Lazarus S. A. & Schmitz H. H., Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J. Nutr.*, 2000, 130 (Suppl.), 2086S-2092S.
- Hertog M. G. L., Hollman P. C. H. & Katan M. B., Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, 2379-2383.
- Hertog M. G. L., Hollman P. C. H. & van de Putte B., Content of potentially anti-carcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41, 1242-1246.
- Holt R. R., Lazarus S. A., Cameron Sullards M., Yan Zhu Q., Schramm D. D., Hammerstone J. F., Fraga C. G., Schmitz H. H. & Keen C. L., Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4b-8)-epicatechin in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76, 798-804.
- Kris-Etherton P. M., Lefevre M., Beecher G. R., Gross M. D., Keen C. L. & Etherton T. D., Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annu. Rev. Nutr.*, 2004, 24, 511-538.
- Lamuella-Raventos R. M., Andres-Lacueva C., Permanyer J. & Izquierdo-Pulido M., More antioxidants in cocoa. *J. Nutr.*, 2001, 131, 834.
- Lee M.-J., Wang Z.-Y., Li H., Chen L., Sun Y., Gobbo S., Balentine D. A. & Yang C. S., Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 1995, 4, 393-399.
- Leenen R., Roodenburg A. J., Tijburg L. B. & Wiseman S. A., A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2000, 54, 87-92.
- Maiani G., Serafini M., Salucci M., Azzini E. & Ferro-Luzzi A., Application of a new high-performance liquid chromatographic method for measuring selected polyphenols in human plasma. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 1997, 692, 311-317.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. & Jimenez L., Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 79, 727-747.
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A. & Remesy C., Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Nutr.*, 2005, 81 (suppl.), 230S-242S.
- Monnier V. M., Bautista O., Kenny D., Sell D. R., Fogarty J., Dahms W., Cleary P. A., Lachin J., Genuth S. & the DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group, Skin collagen glycation, glycoxidation, and cross-linking are lower in subjects with long-term intensive versus conventional therapy of type-1 diabetes: relevance of glycated collagen products versus HbA1c as markers of diabetic complications. *Diabetes*, 1999a, 48, 870-880.
- Monnier V., Fogarty J. F., Monnier C. S. & Sell D. R., Glycation, glycoxidation and other Maillard reaction products. In: Byung Pal Yu (eds) *Methods in aging research*, CRC Press, New York, pp. 657-681.

- Monnier V. M., Intervention against the Maillard reaction *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, 419, 1-15.
- Nakagawa K., Okuda S. & Miyazawa T., Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1997, 61, 1981-1985.
- Odetti P. R., Borgoglio A., De Pascale A., Rolandi R. & Adezati L., Prevention of diabetes-increased aging effect on rat collagen-linked fluorescence by aminoguanidine and rutin. *Diabetes*, 1990, 39, 796-801.
- Olthof M. R., Hollman P. C., Vree T. B., Katan M. B., Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J. Nutr.*, 130, 1200-1203.
- Peyroux J. & Sternberg M., Advanced glycation end products (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Path. Biol.*, 2006, 54, 405-419.
- Price D. L., Rhett P. M., Thorpe S. R. & Baynes J. W., Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 48967-48972.
- Sano A., Yamakoshi J., Tokutake S., Tobe K., Kubota Y. & Kikuchi M., Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003, 67, 1140-1143.
- Scalbert A. & Williamson G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 2000, 130, 2073S-2085S.
- Sell D. R., Lapolla A., Odetti P., Fogarty J. & Monnier V. M., Pentosidine formation in skin correlates with severity of complications in individuals with long-standing IDDM. *Diabetes*, 1992, 41, 1286-1292.
- Spencer J. P., Chaudry F., Pannala A. S., Srai S. K., Debnam E. & Rice-Evans C., Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2000, 272, 236-241.
- Sternberg M. C., M'Bemba J., Urios P., Borsos A. M., Roux A., Adam C., Berne C., Selam J. L. & Slama G., Skin-Collagen Pentosidine and fluorescence at 370/440 nm as markers of diabetes duration and complications in a french population. *Diabetologia*, 2003, 46 (Suppl. 2), A406.
- Sternberg M., Borsos A. M., Roux A., Adam C. & Urios P., Compared inhibition of pentosidine formation in type-I collagen incubated with glucose by catechin, myricetin, kaempferol and quercetin: role of flavonoid structure. *Diabetologia*, 2002, 45 (suppl. 2), 393.
- Stitt A., Gardiner T. A., Anderson N. L., Canning P., Frizzell N., Duffy N., Boyle C., Januszewski A. S., Chachich M., Baynes J. W. & Thorpe S. R., The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes*, 2002, 51, 2826-2832.
- Tourino S., Selga A., Jimenez A., Julia L., Lozano C., Lizarraga D., Cascante M. & Torres J. L., Procyanidin fractions from pine (*Pinus pinaster*) bark: radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 4728-4735.
- Urios P., Grigorova-Borsos A. M., Feing-Kwong-Chan S. & Sternberg M., Quercetin and rutin inhibit pentosidine formation on type-I collagen incubated with glucose. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 2000a, 18/5, A11.
- Urios P., Kassab I., Borsos AM, Guillot R, Peyroux J, Sternberg M (2000b) Long-term treatment with a purified micronized flavonoid fraction reduces urinary albumin clearance and restores albuminemia in normotensive and hypertensive diabetic rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2000b, 50 (suppl. 1), S362.
- Urios P., Grigorova-Borsos A.-M. & Sternberg M., Unexpected elevation of pentosidine formation in collagen incubated with glucose by low concentrations of the AGE-inhibitor aminoguanidine. *Diabetologia*, 2004, 47, 959-961.
- Urios P., Grigorova-Borsos A.-M. & Sternberg M., Flavonoids inhibit the formation of the cross-linking AGE pentosidine in collagen incubated with glucose, according to their structure. *Eur J. Nutr.*, 2007, 46, 139-146.
- Vertommen J., Van Den Enden M., Simoens L. & De Leew I., Flavonoid treatment reduces glycation and lipid peroxidation in experimental diabetic rats. *Phytotherapy Research*, 1994, 8, 430-432.
- Waterhouse A. L., Wine phenolics. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2002, 957, 21-36.
- Woessner J. F., The determination of hydroxyproline and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 93, 440-447.
- Yang Y. & Chien M., Characterization of grape procyanidins using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 3990-3996.