

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude des propriétés antidiabétiques du bleuet canadien *Vaccinium angustifolium***

Présenté par :

**Audrey Couture**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Audrey Claing  
Président rapporteur

Pierre S. Haddad  
Directeur de recherche

Dre Lise Coderre  
Membre du jury



W

4

U58

2005

V. 181

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Étude des propriétés antidiabétiques du bleuet canadien *Vaccinium angustifolium***

Par

**Audrey Couture**

Département de pharmacologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès science (M.Sc.)  
en pharmacologie

Juillet 2005



© Audrey Couture, 2005

## Résumé

Le diabète de type 2 affecte une proportion grandissante de la population adulte dans les pays développés, qui atteindra 325 millions en 2025. Les traitements disponibles ne parviennent pas systématiquement à contrôler la glycémie des patients. De nouvelles approches thérapeutiques étant nécessaires, nous avons recensé les plantes les plus recommandées pour cette maladie. Les naturopathes du Québec ont identifié le bleuet canadien *Vaccinium angustifolium* en première position des produits naturels recommandés pour le contrôle de la glycémie. Par contre, aucune étude n'a évalué son potentiel antidiabétique. Nous avons donc évalué le potentiel de cette plante au moyen de bio-essais *in vitro*. Des extraits éthanoliques ont été préparés à partir des racines, tiges, feuilles et fruits de la plante. Ces extraits ont significativement augmenté le transport de glucose des cellules myoblastiques C2C12, tant au niveau basal que stimulé à l'insuline. Les racines et les tiges ont démontré la plus grande efficacité. Chez les adipocytes 3T3-L1, une stimulation semblable du transport de glucose par l'insuline a été observée. De plus, les feuilles et les fruits ont augmenté la sécrétion d'insuline chez les cellules  $\beta$ -pancréatiques INS832/13. Des études de signalisation intracellulaire ont été entreprises pour déterminer le(s) mécanisme(s) d'action des extraits. Nos résultats suggèrent que *V. angustifolium* pourrait constituer un traitement complémentaire intéressant pour le diabète de type 2.

Mots clés : Diabète de type 2, produits de santé naturels, bio-essais *in vitro*, *Vaccinium angustifolium*, insulinomimétique, insulinosensibilisateur.

## Abstract

The prevalence of type 2 diabetes is increasing among the adult population of western countries and is expected to reach 325 millions in 2025. Unfortunately, current available treatments do not systematically control the glycemia of diabetic patients. Novel approaches are therefore required to efficiently treat the disease. We surveyed Quebec traditional practitioners about the most recommended plants for type 2 diabetes and found the Canadian blueberry *Vaccinium angustifolium* was ranked first. However, no studies reported the antidiabetic potential of the Canadian blueberry. Hence, we studied the antidiabetic potential of the plant using *in vitro* bioassays. Ethanolic extracts were prepared from the roots, stems, leaves and fruits of a freshly harvested plant. These extracts significantly increased C2C12 myoblasts basal and insulin-stimulated glucose transport. The roots and the stems appeared the most efficient. In 3T3-L1 adipocytes, a similar effect was observed on glucose transport in response to insulin. The leaves and the fruits also increased insulin secretion from INS832/13  $\beta$ -pancreatic cells. Insulin signaling studies were undertaken to identify the mechanism(s) of action of the extracts. Our results suggest *V. angustifolium* could reveal a beneficial complementary treatment for type 2 diabetes.

Index terms: Type 2 diabetes, natural health products, *in vitro* bioassays, *Vaccinium angustifolium* insulinomimetic, insulin sensitizing.

## Table des Matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières .....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Remerciements.....	viii
1. INTRODUCTION.....	1
1.1.1 Physiologie de l'insuline.....	1
1.1.2 Les voies de signalisation .....	3
1.2 Le diabète sucré .....	6
1.2.1 Le diabète de type 2.....	7
1.2.2 Les facteurs de risque.....	8
1.2.3 Les complications.....	9
1.3 Pathophysiologie du diabète de type 2.....	11
1.3.1 Mécanismes cellulaires de résistance à l'insuline.....	12
1.4 Les traitements actuels.....	15
1.4.1 Les sulfonylurées .....	16
1.4.2 La metformine.....	16
1.4.3 Les thiazolidinediones.....	17
1.4.4 Les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase.....	18

1.5 Les produits de santé naturels.....	21
1.5.1 Réglementation des PSN.....	22
1.5.2 Historique des PSN au Québec.....	22
1.5.3 PSN et diabète de type 2.....	25
- <i>L'aloë vera</i> .....	26
- Le ginseng américain .....	26
- <i>Gymnema sylvestre</i> .....	27
- Le fenugrec.....	27
1.6 Prémisse de la présente étude .....	31
2. PRÉSENTATION DES MANUSCRITS.....	32
2.1.1 Abstract.....	34
2.1.2 Introduction.....	35
2.1.3 Research Design and Methods.....	37
2.1.4 Results.....	43
2.1.5 Discussion.....	48
2.1.6 References .....	51
2.2.1 Abstract.....	56
2.2.2 Introduction.....	57
2.2.3 Research Design and Methods.....	59
2.2.4 Results.....	62
2.2.5 Discussion.....	67
2.1.6 References .....	72



3. DISCUSSION.....	74
3.1 Préparation des extraits.....	74
3.2 Innocuité de <i>V. angustifolium</i> .....	75
3.3 Transport de glucose.....	76
3.4 Signalisation et mécanisme(s) d'action.....	81
3.5 Sous-fractionnement des tiges .....	84
3.6 Sécrétion d'insuline.....	86
3.7 Perspectives futures.....	87
3.7.1 Études <i>in vitro</i> .....	87
3.7.2 Études <i>in vivo</i> .....	90
4. CONCLUSION.....	92
5. RÉFÉRENCES.....	93

**Liste des tableaux**

Tableau I. Effets de l'insuline sur le métabolisme de divers nutriments

Tableau II. Prévalence du DT2 au Canada de 2000 à 2016

Tableau III. PSN les plus recommandés au Québec et au Maroc pour le DT2

Tableau IV. Comparaison de l'efficacité des quatre extraits

## Liste des figures

Figure 1. Molécule d'insuline porcine

Figure 2. Signalisation intracellulaire du récepteur à l'insuline

Figure 3. Effets de la résistance périphérique à l'insuline

Figure 4. Action des divers agents pharmacologiques pour le traitement du DT2

Figure 5. Viabilité des cellules HTC exposées à 25 ou 12,5mg/L d'extraits

Figure 6. Effets des extraits sur le transport de glucose sans insuline

Figure 7. Molécule de Quercétine

Figure 8. Effet des sous-fractions de tiges sur le transport de glucose C2C12.

**Liste des abréviations**

ADN :	Acide déoxyribonucléique
ADP :	Adénosine diphosphate
AGL :	Acides gras libres
AMPK :	Adénosine monophosphate kinase
ATP :	Adénosine triphosphate
DT2 :	Diabète de type 2
Erk 1/2 :	Extracellular Related Kinase-1/2
GSK-3 :	Glycogen Synthase Kinase-3
GS :	Glycogen Synthase
IRS-1/2 :	Insulin Receptor Substrate-1/2
JNK :	c-Jun N-terminal kinase
MAP :	Mitogen Activated protein
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO :	Monoxyde d'azote
PGA :	Produit de glycosylation avancé
PGH :	Production de glucose hépatique
PI3K :	Phosphatidylinositol-3 kinase
PIP <sub>2</sub> :	Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate
PIP <sub>3</sub> :	Phosphatidylinositol-3 Phosphate
PPAR $\gamma$ :	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$
PTP-1b :	Protein tyrosine phosphatase-1b
SHP2 :	SH2-domain containing phosphatase-2
TNF- $\alpha$ :	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TZD :	Thiazolidinediones

## Remerciements

L'achèvement des deux dernières années de ma vie est en grande partie résumé dans les pages qui suivent. Je ne me suis jamais ennuyée. Que de défis, le plus souvent inattendus, ai-je dû affronter durant cette période! La recherche m'ouvrait ses portes sur un monde plein de promesses pour quiconque sait y mettre persévérance et ténacité. Le résultat final fût à la hauteur de ces efforts.

Devant tout le travail accompli, je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Pierre Haddad, qui m'a généreusement accueillie dans son laboratoire à une époque moins faste. Merci pour ta confiance, ton soutien, tes précieux conseils. Merci pour tout le travail réalisé dans l'ombre mais dont j'ai grandement bénéficié, comme le réseautage et les contacts mis à ma disposition.

Merci à Diane, pour m'avoir appris les rudiments du métier dans les règles de l'art. Au travers les difficultés rencontrées, ton expérience et tes conseils m'ont fait économiser temps et énergie. Tu m'as formée d'une main de maître, mais tu es devenue une amie auprès de laquelle il fait bon travailler jour après jour.

Merci au Professeure Josette Noël pour ses nombreux conseils et son engagement dans le raffinement de nos techniques. Ta générosité est sans borne.

Merci à mes parents, qui n'ont jamais douté de mes capacités. Votre appui constant est énormément apprécié. Vous m'apportez toujours conseils et réconfort lorsque j'en ai besoin. Vous m'avez offert la meilleure éducation possible, tant au plan scolaire que personnel. Vous avez fait de moi une personne responsable, persévérante, qui voit loin tout en sachant savourer le moment présent. Durant ces deux années, vous aurez eu un horaire particulièrement chargé ; vous n'avez malgré tout jamais manqué de temps pour moi. Votre fierté reste pour moi le plus grand des honneurs.

Merci François pour ta patience et ta compréhension. J'ai puisé énormément d'énergie dans notre relation. Merci d'avoir attendu, fidèle au poste, pendant mes congrès, mes stages, mes expériences qui n'en finissaient plus. Merci d'avoir écouté mes inlassables monologues, ton seul regard sympathisant suffit à me redonner confiance. Merci d'être juste là, au jour le jour.

Merci finalement à tous mes précieux compagnons de laboratoire, plus particulièrement Amine et Marjolaine, qui m'ont accompagnée depuis mes débuts en recherche. Merci à toute l'équipe qui s'est greffée en cours de route et à Louis Martineau pour ses idées intarissables et son implication dans mes travaux. Combien agréable c'était de travailler ensemble. Mais toute bonne chose ayant une fin... Bonne chance à tous!



Totalisant 51 acides aminés et 3 ponts disulfures, l'insuline agit sur son récepteur exprimé principalement par le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux. Son action vise à abaisser la glycémie via l'induction du transport de glucose sanguin à l'intérieur des cellules ainsi que son stockage sous diverses formes (Tableau I). Le foie transforme le glucose sanguin en glycogène, une forme rapidement utilisable en cas d'hypoglycémie, le muscle en tirera son énergie pour la contraction, en le transformant aussi en glycogène, tandis que les adipocytes le stockeront sous forme de triglycérides, une réserve d'énergie à plus long terme que le glycogène. Lorsque la glycémie atteint un niveau normal, le transport de glucose diminue vers l'intérieur des cellules  $\beta$ -pancréatiques, ce qui diminue la concentration d'ATP disponible, entraînant l'ouverture des canaux potassiques. La cellule se repolarise alors, empêchant les vésicules d'insuline de fusionner à la membrane plasmique et terminant le processus de sécrétion.

Nutriment	Foie	Muscle	Tissu adipeux
<b>Glucides</b>	↑ Glycolyse ↑ Synthèse de glycogène ↓ Glycogénolyse ↓ Gluconéogenèse	↑ Transport de glucose ↑ Glycolyse ↑ Synthèse de glycogène	↑ Transport de glucose ↑ Synthèse de glycérol
<b>Graisses</b>	↑ Lipogénèse ↓ Lipolyse		↑ Synthèse de triglycérides ↑ Synthèse d'acides gras ↓ Lipolyse
<b>Protéines</b>	↓ Dégradation	↑ Transport d'acides aminés ↑ Synthèse de protéines	

**Tableau I.** Effets de l'insuline sur le métabolisme de divers nutriments. L'action de l'insuline sur les trois tissus a pour effet global d'abaisser la glycémie et d'augmenter les réserves d'énergie du corps. (Tiré de Rang & Dale<sup>34</sup>)

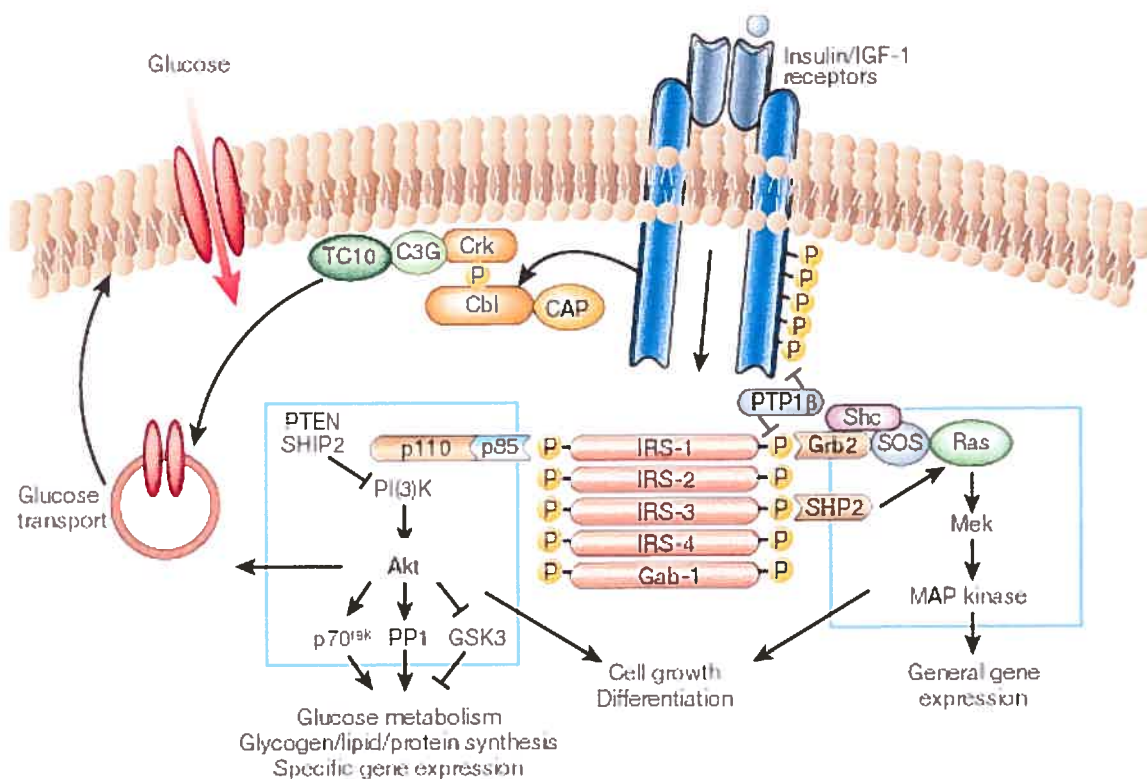
### 1.1.2 Les voies de signalisation

Le récepteur à l'insuline est une glycoprotéine constituée de chaînes polypeptidiques liées entre elles par des ponts disulfures. Deux chaînes alpha, entièrement extracellulaires, sont responsables de la liaison à l'insuline. Deux chaînes transmembranaires  $\beta$  contiennent chacune un site de liaison de l'ATP, un domaine tyrosine kinase et un domaine de régulation C-terminal. Lorsque l'insuline se lie au récepteur, l'activité tyrosine kinase des chaînes  $\beta$  permet leur autophosphorylation sur des résidus tyrosines spécifiques. Deux voies principales de signalisation s'activent alors dans la cellule.

Les IRS-1 et -2 (Insulin Receptor Substrate), au moyen de leurs domaines SH2, se lient au récepteur activé et deviennent elles aussi phosphorylées sur les résidus tyrosines. Cette étape permet le recrutement à la membrane de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3 kinase) cytoplasmique, dont la sous-unité régulatrice p85 interagit avec les IRS phosphorylées. Une fois activée par phosphorylation, la sous-unité catalytique p110 de la PI-3 kinase phosphoryle la position 3' du phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), créant le phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate (PIP<sub>3</sub>). La présence de ces molécules active la PDK-1 (*PIP<sub>3</sub>-dependent kinase-1*), une sérine/thréonine kinase. Cette kinase active ensuite d'autres sérine/thréonine kinases, dont la protéine kinase B (PKB/Akt). L'activité kinase de l'Akt entraîne l'inhibition par phosphorylation de la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3). Celle-ci maintient normalement dans un état phosphorylé, donc inactif, la glycogène synthase (GS)<sup>29</sup>. Une fois l'activité inhibitrice



de la GSK-3 éliminée, la GS synthétise du glycogène à partir du glucose transporté à l'intérieur de la cellule. De même, l'activation de l'Akt a été associée à l'augmentation du transport de glucose chez le muscle et le tissu adipeux. En effet, ces cellules contiennent des vésicules de GLUT-4, un transporteur de glucose, qui transloquent à la membrane suite à l'activation de la voie de la PI-3kinase. Celle-ci serait nécessaire mais pas suffisante pour augmenter ce transport. Jusqu'à maintenant, nous ignorons quels en sont les médiateurs mais il est probable que d'autres protéines d'échafaudage comme Cbl et TC10 soient recrutées au niveau du récepteur à l'insuline et se combinent à l'effet de l'Akt pour induire ce transport<sup>29</sup> (Figure 2).



**Figure 2.** Signalisation intracellulaire du récepteur à l'insuline. Deux voies de signalisation sont activées par la liaison de l'insuline à son récepteur : la voie des MAP kinases, conduisant à la croissance cellulaire et à la transcription de gènes, et la voie de la PI3 kinase, conduisant au métabolisme du glucose. L'effet sur le transport de glucose implique la voie PI3 kinase et une interaction avec TC10. (Tiré de Saltiel et Khan, 2001<sup>36</sup>)

La seconde voie de signalisation implique plusieurs protéines de couplage, dont GRB2, qui interagit via son domaine SH2 avec les phospho-tyrosines du récepteur à l'insuline. Parallèlement, le domaine SH3 de GRB2 recrute le facteur d'échange de nucléotides SOS qui démarre, via la petite protéine G Ras, la voie des mitogen-activated protein (MAP) kinases. La p42/44 MAP kinase (Erk1/2), phosphorylée principalement sur des résidus sérine/thréonine, transloque au noyau et induit finalement la transcription de gènes impliqués dans la survie, la croissance et la différenciation cellulaires<sup>7</sup>.

La régulation fine de ces voies de signalisation n'est toujours pas bien définie, mais il a été démontré que des protéines tyrosine phosphatases sont activées par les effecteurs mêmes du récepteur et seraient responsables de la terminaison du signal. SHP2 et PTP-1B ont toutes deux été liées à cette fonction. De plus, la phosphorylation en sérine/thréonine du récepteur à l'insuline ainsi que des IRS est connue pour diminuer leur activité tyrosine kinase et empêcher l'interaction avec leurs partenaires tels que la PI-3 kinase. Les sérine/thréonine kinases impliquées dans cette fonction n'ont pas toutes été identifiées, mais le récepteur au TNF- $\alpha$  et les MAP kinases y jouent certes un rôle important.

Chacune des voies de signalisation de l'insuline sont individuellement empruntées par d'autres récepteurs. La spécificité au ligand provient de la combinaison particulière des protéines activées. Cependant, d'autres facteurs peuvent activer les mêmes fonctions physiologiques que l'insuline. Par exemple, la contraction musculaire peut augmenter le transport de glucose chez le muscle, en utilisant l'AMP kinase pour

induire la translocation des vésicules du GLUT-4. Ainsi, la réponse des organes à l'insuline est bien connue, mais les multiples interactions entre ses maintes voies de signalisation demeurent encore indéterminées. Lorsque cette complexe signalisation est compromise, de sérieuses conséquences en découlent, dont les maladies métaboliques telle que le diabète sucré.

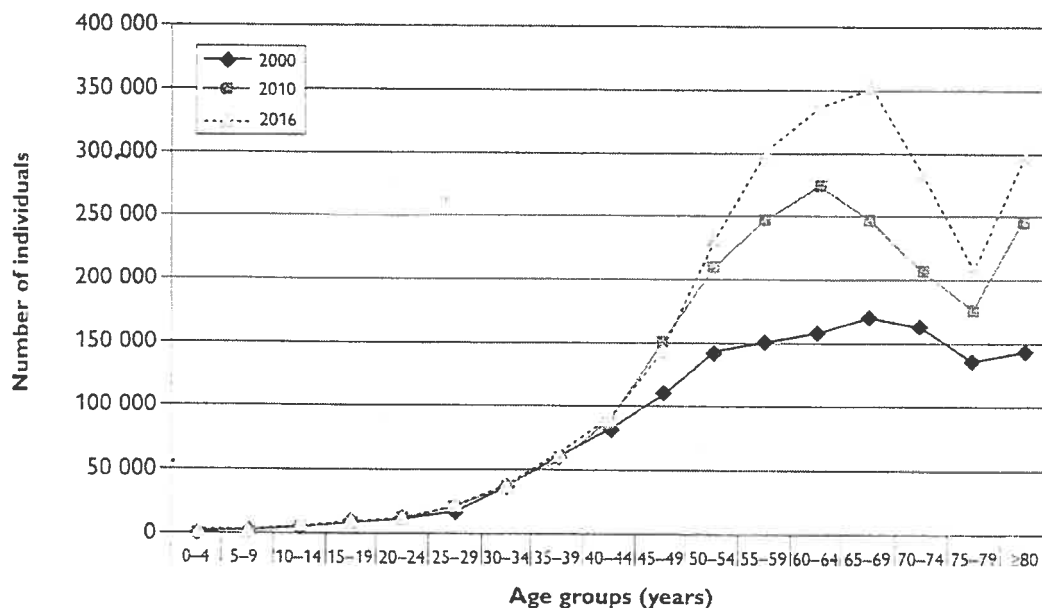
## 1.2 Le diabète sucré

Caractérisant une hyperglycémie, le diabète sucré existe sous trois formes distinctes, soit le diabète de type 1, le diabète de grossesse et le diabète de type 2 (DT2). De nature relativement simple, l'hyperglycémie liée au diabète de type 1 (diabète mellitus insulino-dépendant) est due à une absence de sécrétion d'insuline par le pancréas, attribuée à une réaction auto-immune contre les cellules  $\beta^4$ . Dans ce cas, le traitement se résume par des injections régulières d'insuline. Le diabète de grossesse touche environ 7% des femmes enceintes et son traitement varie selon la sévérité du diabète, allant d'une simple diète aux injections d'insuline. Ce diabète disparaît généralement après la grossesse, mais ces femmes sont plus à risque de développer un DT2 plus tard<sup>1</sup>. Ce dernier, représentant 90% des cas de diabète, demeure aussi le plus complexe. Une résistance à l'insuline se développe d'abord et, suite à l'échec des mécanismes compensatoires, entraîne à long terme une intolérance au glucose. La nature des traitements varie donc appréciablement mais les plus efficaces, diète et

exercice, sont aussi les moins populaires auprès des diabétiques, puisqu'ils demandent un changement parfois radical de leur style de vie.

### 1.2.1 Le diabète de type 2

Au septième rang des causes de mortalité en Amérique du Nord, le diabète de type 2 est une conséquence de notre style de vie sédentaire. Il touche particulièrement les adultes de plus de 40 ans ayant un surplus de poids. L'incidence croissante du DT2, passant de 150 à quelques 300 millions d'ici 2025<sup>49,55</sup>, en fait l'une des plus sérieuses épidémies de notre époque, et le Canada ne fait pas exception (Tableau II). Fait inquiétant, des cas sont aujourd'hui diagnostiqués avant l'âge adulte, chez des adolescents et des préadolescents. Les complications associées au DT2 pouvant se révéler sévères voire mortelles, la situation chez les jeunes reste préoccupante tant pour les professionnels de la santé que pour la société en général.



**Tableau II.** Prévalence du DT2 au Canada de 2000 à 2016<sup>33</sup>. Le diabète se développe surtout vers l'âge adulte, et l'incidence de la maladie augmentera au cours des prochaines années.

### 1.2.2 Les facteurs de risque

Le fait que la prévalence du DT2 suive parallèlement celle de l'obésité est un indice majeur quant à l'importance de ce facteur de risque dans le cours de la maladie<sup>25</sup>. En effet, l'obésité et le manque d'exercice sont des éléments majeurs pour prédire le développement du DT2<sup>41</sup>. Une alimentation surabondante conduit à une prise de poids engendrée par la réponse à l'insuline des tissus périphériques, qui absorbent une grande quantité du glucose sanguin et l'emmagasine sous forme de glycogène ou de triglycérides. A long terme, ces tissus développent une résistance à l'insuline qui se traduit initialement par une intolérance au glucose. A ce stade pré-clinique, un exercice régulier peut parvenir à restaurer la sensibilité à l'insuline; malheureusement, le style de

vie nord-américain a diminué les niveaux d'exercice de la population. Des prédispositions génétiques entrent aussi en jeu, mais celles-ci demeurent peu précises car les gènes potentiels sont variés et agissent probablement de concert<sup>41,44</sup>. Entre autre, ces gènes causeraient un défaut dans la sécrétion d'insuline, ce qui diminuerait la capacité compensatoire du pancréas et accélérerait le développement du DT2 lui-même<sup>38</sup>. C'est alors qu'une hyperglycémie s'installe et que l'état diabétique est diagnostiqué (glycémie à jeun > 7.0 mM selon les normes actuelles).

### 1.2.3 Les complications

Le diabète de type 2 engendre à long terme des problèmes sérieux attribués à la présence d'un surplus de glucose sanguin. Cet excès de glucose réducteur se lie à des groupements amines de protéines, de lipides ou d'ADN, formant ainsi les produits de glycosylation avancés (PGA) et une variété de radicaux libres. Ce stress oxydatif affecte profondément la macro et la microvasculature.

Au niveau macrovasculaire, les PGA accélèrent la formation de plaques athérosclérotiques. En effet, l'hyperglycémie augmente la production de radicaux libres, ce qui diminue la concentration du monoxyde d'azote (NO). La présence des PGA a donc pour conséquence une vasoconstriction des vaisseaux sanguins, l'épaississement de la paroi vasculaire et sa perte d'élasticité. De plus, les macrophages exprimant des

récepteurs aux PGA, ils induisent une inflammation qui vient s'ajouter au dysfonctionnement endothélial pour favoriser l'athérosclérose.

Les complications microvasculaires se manifestent dans divers tissus, dont la rétine, le rein et les neurones. La présence de PGA sanguins amplifie la perméabilité des capillaires de la rétine, perturbant la barrière hémato-oculaire et créant un épaissement de la membrane basale<sup>43.46</sup>. La mauvaise perfusion et l'ischémie qui en résultent sont responsables des problèmes de visions cliniques chez les patients, qui évoluent jusqu'à la cécité. En fait, le DT2 demeure la première cause de cécité chez les adultes.

Les reins subissant la même augmentation de la perméabilité vasculaire que la rétine, un semblable épaissement de la membrane basale s'organise, avec pour conséquences une hypertrophie du glomérule et un plus haut taux de filtration glomérulaire<sup>48</sup>. Ces deux phénomènes sont présents au début de la pathologie rénale, mais celle-ci dégénère jusqu'à l'insuffisance rénale. La dialyse ou la transplantation restent les traitements envisageables à ce stade. D'ailleurs, la majorité des patients en dialyse rénale sont des diabétiques.

Aussi affectés par les perturbations vasculaires, les neurones du diabétique subissent de surcroît une activation de la cascade des polyols. Cette voie métabolique catalyse la transformation du glucose en sorbitol puis en fructose. L'hyperglycémie suractive cette cascade et la cellule épuise ses réserves de cofacteurs NADH et NADPH

nécessaires à la réaction enzymatique. Conséquemment, le glutathion oxydé ne peut plus se régénérer, et un stress oxydatif endommage rapidement les neurones et les cellules de Schwann environnantes. La conduction neuronale s'en trouve compromise, tant par la démyélinisation que par la dégénération axonale<sup>40,43</sup>. Les manifestations cliniques de la neuropathie diabétique sont généralement liées à la perte de sensations protectrices dans les membres. La plus commune demeure l'ulcération du pied<sup>42</sup> (pied diabétique), qui place le diabète au premier rang des causes d'amputation en Amérique du nord.

Les complications du DT2 font bien état de la nature évolutive de la maladie. Elles se développent au fil du temps et continuent de s'aggraver par la suite. Le contrôle de la glycémie devient un objectif primordial à atteindre puisque la seule correction de l'hyperglycémie suffit à prévenir ces complications ou à en empêcher la progression.



### 1.3 Pathophysiologie du diabète de type 2

Généralement, lors du diagnostic de la maladie effectué par des tests de glycémie, la résistance à l'insuline est déjà bien installée dans les tissus périphériques. Au départ, cette résistance entraîne une intolérance au glucose plutôt qu'une hyperglycémie. En effet, un mécanisme compensatoire est initié par le pancréas, qui sécrète alors davantage d'insuline afin que la glycémie soit maintenue à des niveaux normaux. Cliniquement, le patient présente donc une normoglycémie combinée à une hyperinsulinémie. Cette situation peut se maintenir pendant des années. L'évolution vers le diabète commence lorsque les cellules  $\beta$ -pancréatiques ne parviennent plus à maintenir le rythme de sécrétion imposé par la résistance périphérique. Les dernières théories sur le sujet soutiennent qu'un défaut dans la sécrétion d'insuline, probablement génétique, serait responsable de cette progression vers le diabète de type 2<sup>38</sup>.

#### 1.3.1 Mécanismes cellulaires de résistance à l'insuline

De tous les tissus périphériques, le muscle squelettique absorbe environ 80% du glucose sanguin<sup>6</sup>. La résistance à l'insuline s'y manifeste par une importante diminution du transport de glucose, ce qui prolonge l'hyperglycémie associée à l'absorption d'un repas. Au niveau du foie, la résistance se présente sous forme d'une plus grande production de glucose hépatique (PGH). Habituellement, la PGH a lieu à jeun, soit en faibles concentrations d'insuline, et a pour but de maintenir la concentration de glucose

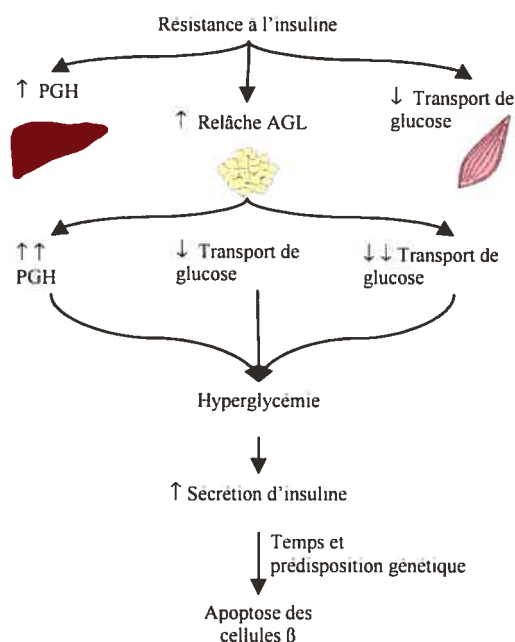
sanguin. S'opposant à l'action de l'insuline, la présence de glucagon augmente la PGH. La perte de sensibilité à l'insuline empêche tout antagonisme au glucagon, qui stimule alors une PGH plus grande que celle nécessaire au bon maintien de la glycémie. Le foie serait donc principalement responsable de l'hyperglycémie à jeun observée chez le diabétique<sup>6</sup>.

Cependant, le site de résistance à l'insuline entraînant les plus sérieuses conséquences physiologiques reste le tissu adipeux<sup>3</sup>. Jusqu'à récemment, la communauté scientifique croyait que la résistance se manifestait surtout par une diminution du transport de glucose dans le muscle, un site majeur de stockage. Chez les adipocytes résistants, la même diminution du transport de glucose est observée, mais à celle-ci s'ajoute l'échec de l'insuline pour supprimer la lipolyse. Les acides gras libres (AGL) ainsi générés circulent donc dans le sang et affectent la réponse à l'insuline des muscles et du foie. Le mécanisme d'action exact des AGL n'est pas encore déterminé, mais deux hypothèses sont actuellement avancées<sup>39</sup>. Ceux-ci pourraient engendrer l'accumulation de leur métabolite AcétylCoA en même temps que la déplétion du cofacteur NAD nécessaire à la réaction. Ceci inhiberait la pyruvate déshydrogénase, une enzyme de la glycolyse, bloquant alors le métabolisme du glucose. Par contre, certaines observations indiquent que les AGL pourraient agir directement sur des sérine/thréonine kinases qui arrêteraient la signalisation en réponse à l'insuline. Dans les deux cas, la conséquence directe de la résistance à l'insuline des adipocytes serait donc une aggravation de la résistance dans les autres tissus<sup>5</sup>.

Au niveau cellulaire, la résistance à l'insuline peut provenir de plusieurs sources. Dans le cas d'une hyperinsulinémie, la rétro-inhibition induite par les sérine/thréonine kinases au récepteur à l'insuline serait plus largement activée qu'en conditions normales, entraînant la diminution de l'activité tyrosine kinase du récepteur, la diminution de la phosphorylation en tyrosine des IRS-1/2 ainsi que de l'interaction avec la PI-3 kinase. La diminution du nombre de récepteurs est aussi possible, mais cette observation n'est pas généralisée chez l'ensemble des diabétiques. Il demeure probable que l'hyperinsulinémie induise une plus grande activation des phosphatases cellulaires<sup>5</sup>. Le résultat final pour les muscles et le tissu adipeux est donc une translocation moins efficace des vésicules du GLUT-4 à la membrane plasmique, et une synthèse de glycogène plus faible pour les hépatocytes<sup>6</sup>. Chez l'adipocyte, l'accumulation de lipides résulte en l'inhibition des voies de signalisation de l'insuline. De plus, le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) sécrété par les adipocytes agit de façon autocrine et réduit lui aussi la réponse à l'insuline par l'activité sérine/thréonine kinase de son récepteur (voir en p.5). Chez les diabétiques, les niveaux de TNF- $\alpha$  sont plus élevés que la normale. La résistance à l'insuline est donc multifactorielle et dérègle une variété de paramètres physiologiques, depuis le contrôle de la glycémie jusqu'à l'inflammation et la coagulation<sup>27</sup>.

Les tissus insulino-sensibles devenant résistants à l'insuline, ils contribuent à détériorer l'homéostasie des cellules  $\beta$ -pancréatiques. En effet, les concepts de glucotoxicité et de lipotoxicité émergent comme une potentielle explication de la perte progressive de sécrétion d'insuline. Les hautes concentrations plasmatiques de glucose

et d'acides gras libres induiraient l'apoptose des cellules  $\beta$ . Une composante auto-immune pourrait aussi entraîner cette mort cellulaire, en plus des défauts génétiques qui menacent la sécrétion compensatoire d'insuline face à la résistance périphérique<sup>38</sup>. Le diabète de type 2 est donc une maladie évolutive, et un dépistage précoce pourrait éviter la perte définitive des cellules  $\beta$  et favoriser le recouvrement des fonctions normales de l'organisme (Figure 3).



**Figure 3.** Effets de la résistance périphérique à l'insuline. Les trois tissus insulino-sensibles participent à l'hyperglycémie engendrée par la résistance. Les cellules  $\beta$ -pancréatiques peuvent compenser, mais leur apoptose éventuelle conduit au DT2.

## 1.4 Les traitements actuels

Le meilleur remède contre le DT2 restera toujours la diète et l'exercice. Dans les premiers stades de la maladie, alors que le dysfonctionnement des cellules  $\beta$ -pancréatiques n'est pas engagé ou est encore réversible, il est possible de vaincre la maladie grâce à ces deux moyens. Effectivement, la diète et l'exercice re-sensibilisent les tissus périphériques à l'insuline, dont l'effet recherché demeure le retour vers une normoglycémie. Ces changements de style de vie se révèlent très bénéfiques même dans les cas plus avancés du DT2 qui nécessitent des injections d'insuline. S'il existe de nombreux traitements pharmacologiques au DT2, c'est en raison de l'échec de la population diabétique de type 2, souvent obèse et sédentaire, à effectuer ces changements.

### 1.4.1 Les sulfonylurées

Cette classe de médicaments dite sécrétagogue agit directement sur les canaux potassiques de la cellule  $\beta$ -pancréatique, et ferment ces derniers, entraînant une dépolarisation cellulaire et la sécrétion d'insuline. Leur effet principal reste donc d'augmenter la sécrétion d'insuline. L'efficacité des sulfonylurées est donc étroitement liée à l'état des cellules  $\beta$  et au nombre résiduel d'entre elles. Conséquemment, ce traitement doit être débuté peu après le diagnostique de la maladie et nécessitera avec le temps la combinaison avec un autre agent pharmacologique ou des injections d'insuline. Le principal effet indésirable des sulfonylurées reste l'hypoglycémie possible suite à une

sécrétion trop importante d'insuline. L'hypoglycémie pouvant causer la mort rapidement, elle est autant à éviter que l'hyperglycémie, mortelle elle aussi mais à plus long terme.

#### 1.4.2 La metformine

Contrairement aux sulfonylurées qui sont des hypoglycémiantes, la metformine est dite antihyperglycémiant, c'est-à-dire qu'elle n'entraîne pas d'hypoglycémies. De plus, la metformine sensibilise les cellules à l'insuline, car elle diminue la glycémie sans changer l'insulinémie. Bien que son mécanisme d'action exact demeure inconnu, elle agirait plus particulièrement au niveau du foie en normalisant la PGH, potentiellement via un effet sur la chaîne respiratoire mitochondriale<sup>24</sup>. Elle augmente aussi l'activité de l'AMP kinase musculaire, qui stimule le transport de glucose par une voie alternative<sup>21</sup>. Une diminution de l'appétit est aussi associée à la prise de metformine, de même qu'une diminution des AGL en circulation. Tel que démontré par la résistance à l'insuline, plusieurs interactions ont lieu entre les tissus insulino-sensibles. Ainsi, nous ne savons pas si l'effet de la metformine sur les muscles et les AGL dérive de la diminution de la PGH ou vice versa. De même, le mécanisme de l'acidose lactique grave remarquée chez certains patients n'est toujours pas éclairci. A long terme, la metformine entraîne en outre une diminution importante des niveaux de vitamine B12<sup>20</sup>. Malgré tout, les propriétés de la metformine en font l'agent antihyperglycémiant le plus prescrit aux États-Unis<sup>21</sup>.

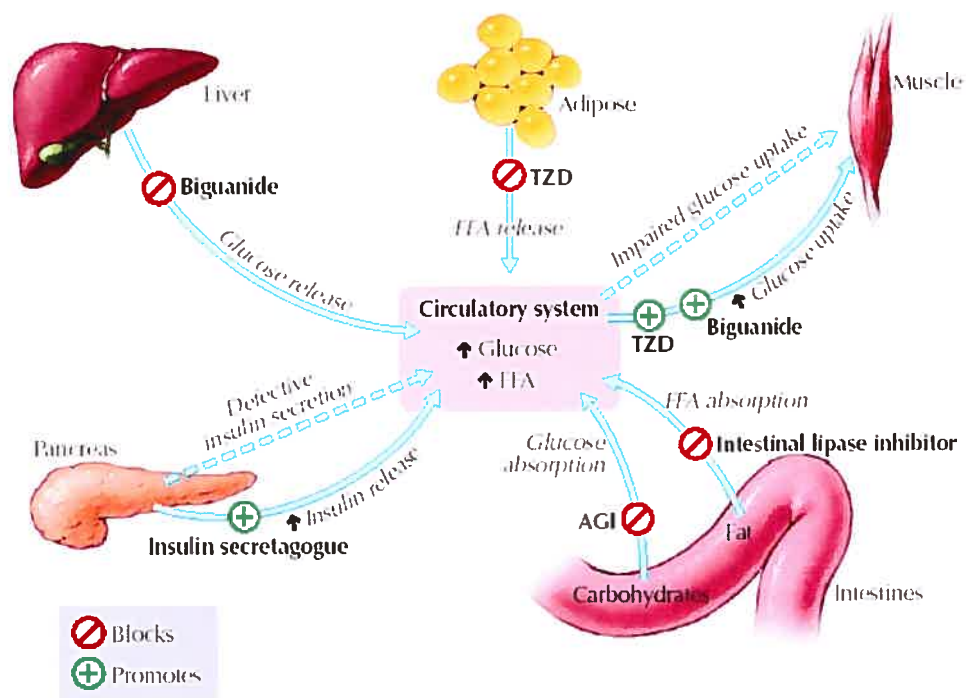
### 1.4.3 Les thiazolidinediones

Cette classe de médicaments améliore aussi la sensibilité à l'insuline, mais son mécanisme d'action se situe au niveau du tissu adipeux. Le PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ), un récepteur nucléaire présent dans les tissus insulino-sensibles mais plus particulièrement chez les adipocytes, régule la transcription d'une variété de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides<sup>3</sup>. Les thiazolidinediones sont des agonistes de ce récepteur, et leur action diminue les AGL en circulation de même que la sécrétion de TNF- $\alpha$ <sup>27</sup>. Les AGL affectant la sensibilité à l'insuline du foie et des muscles squelettiques, leur diminution permet un meilleur contrôle de la glycémie. Par contre, un gain de poids est associé au mécanisme d'action des thiazolidinediones, ce qui n'est pas idéal chez un diabétique ayant souvent un surplus de poids préalable. En effet, un meilleur emmagasinage du glucose dans les adipocytes induit la synthèse de triglycérides, qui accumulent en plus grande quantité dans le tissu adipeux.

### 1.4.4 Les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase

Les trois médicaments de cette classe agissent avant même l'établissement de l'hyperglycémie post-prandiale chez le diabétique en diminuant l'absorption du glucose intestinal. Leur effet antihyperglycémiant provient de l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase, présente dans la bordure en brosse intestinale. L' $\alpha$ -glucosidase est responsable de l'hydrolyse des polysaccharides en molécules de glucose, qui peut être absorbé par l'organisme. L'inhibition de cet enzyme par les trois agents reste compétitive et

réversible, ce qui diminue l'absorption sans toutefois l'empêcher complètement, prévenant ainsi une hyperglycémie<sup>19</sup>. Les effets indésirables se situent surtout au niveau intestinal, conséquemment au glucose non digéré, et incluent gaz, diarrhées, douleurs abdominales. Malheureusement, puisque l'inhibition demeure réversible, un repas riche en hydrates de carbone peut contourner l'action de cette classe de médicaments. Il est donc préférable d'accompagner la prise de ces agents d'une diète ou d'un autre agent pharmacologique.



**Figure 4.** Traitements actuels pour le diabète de type 2. Relation entre les diverses classes de médicaments disponibles, leur site et mécanisme d'action sur les tissus impliqués dans la gestion du glucose. (Tiré de Cheng et Fantus, 2005<sup>10</sup>)



Malgré toutes les options thérapeutiques présentées ici, l'objectif du contrôle de la glycémie n'est pas atteint chez un grand nombre de patients. D'une part, la nature évolutive du diabète de type 2 peut expliquer ce phénomène. Il est fréquent de commencer le traitement par une monothérapie, efficace au départ, et d'ensuite combiner deux médicaments ou plus pour y parvenir. D'autre part, les médicaments actuels comportent tous des effets secondaires dérangeants voire dangereux. La communauté scientifique admet que de nouvelles approches doivent être développées pour améliorer le contrôle glycémique d'une population diabétique croissante.

## 1.5 Les produits de santé naturels

L'usage des plantes dans le traitement des maladies remonte aux anciennes traditions de toutes les civilisations. La médecine moderne elle-même s'est d'abord servie de la nature avant de synthétiser ses médicaments en laboratoire. Des estimations considèrent que 30% des médicaments d'ordonnance proviennent originellement des plantes<sup>50</sup>, comme l'Aspirine, dérivée de l'acide salicylique du *Salix alba*, ou de la metformine elle-même, dérivée du lilas français *Galega officinalis*. Avec le développement de la science et des technologies, notre société a délaissé les PSN, dont les mécanismes d'action demeurent inconnus, pour se tourner vers des banques de molécules interagissant avec une cible physiologique choisie afin d'identifier des composés potentiels dans le traitement d'une maladie.

De nos jours, les produits de santé naturels (PSN) connaissent un regain d'intérêt par la population. En effet, ceux-ci sont perçus différemment des médicaments. La population croit que les PSN sont sans danger, puisqu'ils sont *naturels*. En contrepartie, les professionnels de la santé se méfient de ces produits en raison du manque de données scientifiques les concernant, et rejettent trop souvent la possibilité qu'ils soient efficaces. Heureusement, un regain d'intérêt de la part des chercheurs vient équilibrer l'intérêt du public, et les scientifiques commencent à les étudier sérieusement.

### 1.5.1 Réglementations des PSN

En janvier 2004, Santé Canada a émis une nouvelle réglementation concernant les produits de santé naturels, dont les dispositions seront graduellement mises en place d'ici 2006. Les manufacturiers devront se soumettre aux bonnes pratiques de fabrication, normaliser leurs produits et fournir des preuves tant sur l'innocuité que l'efficacité de leurs produits. Ainsi, pour obtenir le droit d'émettre une allégation concernant la prévention ou le traitement d'une maladie spécifique, il faudra s'appuyer sur un usage traditionnel documenté ou des données cliniques publiées. Malheureusement, rares sont les études cliniques ou fondamentales accessibles à ce jour, et plusieurs renferment des faiblesses de protocoles qui rendent précaires toute conclusion tirée de l'étude. En effet, l'impossibilité de breveter un PSN et le sous-financement de tels projets imposent des contraintes ne permettant pas d'atteindre la rigueur scientifique rencontrée avec les médicaments d'ordonnance. Pour l'instant, la tâche d'évaluer l'efficacité et l'innocuité des PSN incombe principalement aux chercheurs universitaires et gouvernementaux.

### 1.5.2 Historique des PSN au Québec

La plupart des plantes utilisées pour une maladie proviennent de l'usage traditionnel local. Les pays comme le Maroc, l'Inde et la Chine sont des exemples types, riches d'une grande tradition de traitements par les plantes locales. Ceci explique que d'une région à l'autre, différentes plantes soient utilisées, ce qui enrichit grandement

la diversité des traitements issus de la médecine traditionnelle offerts aujourd'hui. Au Québec, cette tradition locale venant des quelques peuples amérindiens a été complétée par celle des autres pays. Les PSN utilisés ici sont donc diversifiés, et comprennent autant des plantes locales qu'exotiques.

Ces dernières années, les ventes de PSN ont affiché une croissance constante en Amérique du Nord<sup>15</sup>. Plusieurs raisons peuvent expliquer cet engouement, en commençant par l'échec de la médecine moderne, en particulier face aux maladies chroniques. Cet échec comprend autant l'inefficacité que les effets secondaires associés au traitement par les médicaments. De plus, les PSN demeurent bien plus accessibles que les médicaments d'ordonnance pour un patient n'obtenant pas rapidement un rendez-vous avec son médecin. Durant cette attente, la maladie suit son cours, et le patient a alors le sentiment d'agir concrètement sur sa propre santé lorsqu'il décide de prendre un PSN. Les naturopathes, un exemple de spécialistes des PSN, peuvent être rencontrés plus rapidement, le contact est souvent plus long et personnel qu'avec un médecin débordé. Le climat de confiance qui s'installe entre le patient et son spécialiste contribue à la bonne réputation des PSN. L'origine naturelle de ces produits leur confère aussi une image de produits fiables, sans effet indésirable ni toxicité. Or, certains PSN ont été retirés du marché en raison d'effets toxiques. Par exemple, le Kava (*Piper methysticum*) utilisé pour traiter l'anxiété engendrait une hépatotoxicité rare mais sévère et parfois mortelle<sup>45</sup>. De plus, l'efficacité de ces produits n'a, dans la plupart des cas, toujours pas été étudiée rigoureusement. Bien que les naturopathes soient

convaincus de l'efficacité de leurs produits, ceux-ci devraient pour l'instant enrichir, plutôt que substituer, un traitement pharmacologique prescrit par un médecin.

La qualité d'un PSN varie sensiblement selon le fabricant. Plusieurs études ont démontré des changements importants non seulement dans leur composition selon la marque déposée, mais aussi entre deux lots d'une même marque<sup>30,50</sup>. Contrôler la composition d'un PSN peut devenir très complexe, surtout si les conditions de culture modifient la concentration des molécules actives. De surcroît, le(s) composé(s) actif(s) des PSN est(sont) presque toujours inconnu(s). Il devient alors difficile de normaliser les PSN sur le marché. Un patient risque donc de consommer une dose variable de molécule active, et d'ainsi obtenir des effets différents dans le temps. Puisque la polypharmacie existe tant avec les médicaments qu'avec les PSN, les possibilités d'interactions s'accroissent vertigineusement. Deux types d'interactions restent plus probables dans ces cas. Tout d'abord, une interaction pharmacocinétique dite non-spécifique peut se développer au niveau du métabolisme, de la liaison aux protéines plasmatiques, du processus d'élimination et autres pour changer la concentration plasmatique du médicament. Ensuite, si le PSN est actif, son mécanisme d'action peut s'ajouter à celui du médicament, résultant en une apparente surdose. Ici, la situation peut se révéler dangereuse selon l'effet thérapeutique recherché. Par exemple, un médicament et un PSN anxiolytiques peuvent agir de concert et causer une dépression du système nerveux. Il devient clair que la recherche est primordiale dans le domaine des PSN, tant pour protéger la santé du patient que mieux l'informer sur les effets de ces produits.

Lorsqu'il y a consultation, les naturopathes et herboristes, détenteurs du savoir médicinal relié aux plantes au sein de notre médecine moderne, restent des intervenants majeurs entre le patient et les PSN. Ces spécialistes constituent donc une source de renseignements importants quant aux maladies en jeu, l'effet préventif ou curatif d'un PSN, de même que la posologie suggérée. Malheureusement, les naturopathes ne sont pas reconnus par les professionnels de la santé. Les informations distribuées par les naturopathes et les autres praticiens de la médecine alternative ne sont pas toujours uniformes et compliquent l'évaluation de l'efficacité des PSN recommandés. Il n'est pas étonnant que les patients préfèrent taire l'usage de ces produits plutôt que d'encourir les commentaires sceptiques ou carrément négatifs de leur médecin.

### 1.5.3 PSN et diabète de type 2

Sur le marché, des PSN existent pour pratiquement toutes les affections de l'homme, du rhume à l'insomnie en passant par la dépression, les infections bactériennes l'anxiété ou les allergies. La nature chronique et évolutive du DT2 ainsi que l'échec des traitements à long terme amènent les patients diabétiques à se tourner davantage vers les PSN que le reste de la population. De nombreux PSN sont recommandés pour traiter cette maladie, mais rares sont ceux qui font l'objet de recherche scientifique rigoureuse.

Gloria Y. Yeh et coll.<sup>52</sup> ont effectué une revue systématique des études cliniques portant sur les PSN et le diabète. Une liste exhaustive a été établie, qui inclut l'*aloe vera*, le ginseng américain, *Gymnema sylvestre* et le fenugrec. Les auteurs font aussi

état du protocole de recherche clinique utilisé. Rares sont les études à double insu avec placebo effectuées sur une longue période, mais les résultats obtenus demeurent néanmoins prometteurs et devraient encourager des études plus poussées. Il est aussi intéressant de s'attarder brièvement aux activités individuelles de ces plantes.

#### -L'*aloe vera*

Sur les tablettes des pharmacies, cette plante est plutôt populaire pour le soin de la peau et ses propriétés hydratantes et réparatrices. Des fibres de glucomannan, présentes dans les feuilles de la plante, seraient toutefois bénéfiques pour les diabétiques. Des études de cas et des études cliniques rapportent une diminution de la glycémie par l'*aloe vera*, mais le mécanisme d'action n'a toujours pas été déterminé.

#### -Le ginseng américain (*Panax quinquefolium*)

Le ginseng semble être une panacée, ce qui lui vaut une réputation de « stimulateur du bien-être général ». En effet, lui sont attribués des effets immunostimulants, de longévité et d'aide à la concentration. Cette plante est un exemple important de la complexité du processus de normalisation des PSN : la meilleure efficacité a été observée dans les racines du ginseng âgées de plus de trois ans. Les mécanismes d'action proposés incluent une diminution de l'absorption du glucose, une augmentation du transport de glucose de même qu'un effet sur la sécrétion d'insuline.

### -*Gymnema sylvestre*

Provenant de la médecine Ayurvédique, soit de tradition indienne, les feuilles de cette plante étaient mâchées pour diminuer le sens du goût, particulièrement celui du sucré. Nous pouvons imaginer qu'un bénéfice sur l'alimentation pouvait en résulter. Des études ont toutefois suggéré que la plante agirait à d'autres niveaux, soit sur la régénération des îlots de Langerhans, permettant d'une part un meilleur fonctionnement de la cellule  $\beta$ -pancréatique, mais aussi l'augmentation de la capacité de sécrétion d'insuline.

### -Le fenugrec

Cette plante, *Trigonella foenum graecum*, est à ce jour la plus étudiée par la communauté scientifique pour son activité antidiabétique. Plus particulièrement, ce sont les graines de fenugrec qui ont été étudiées dans les premières études cliniques. Des résultats prometteurs obtenus au niveau de contrôle de la glycémie ont stimulé la curiosité de chercheurs, qui ont entrepris une analyse scientifique approfondie de la plante. Une molécule active a d'ailleurs été identifiée, le 4-hydroxyisoleucine (4-OH-Ile), ce qui place le fenugrec dans une classe à part. De nos jours, le 4-OH-Ile est étudié *in vivo* chez le rat diabétique et en étude clinique de Phase II par Innodia, une entreprise en biotechnologie de Laval (Québec, Canada). Cet acide aminé atypique augmente la sécrétion d'insuline en réponse à une infusion de glucose<sup>8</sup>. Toutefois, l'action du 4-OH-Ile ne se borne pas à une activité insulinothèque. Le fenugrec semble aussi être un



sensibilisateur envers l'action de l'insuline. Des études de clamp chez le rat Zucker fa/fa ont démontré une augmentation du transport de glucose périphérique ainsi qu'une diminution de la production de glucose hépatique (PGH)<sup>9</sup>. Les investigateurs ont effectivement observé que le débit de l'infusion intraveineuse de glucose devait être augmenté en présence de fenugrec pour conserver une glycémie stable. Le fenugrec est probablement sur le point de se démarquer des PSN pour entrer dans une catégorie à mi-chemin entre le médicament et le produit naturel brut. De telles évidences scientifiques pourraient éventuellement changer la perception négative qu'ont les professionnels de la santé face aux PSN, et marquer un tournant dans l'histoire de la médecine moderne.

Dans le but de contribuer à l'étude des PSN, Haddad et coll.<sup>18</sup> ont recensé les plantes les plus recommandées pour le traitement du DT2 par les naturopathes et herboristes québécois et marocains (Tableau III). Les résultats démontrent bien la diversité culturelle des médecines traditionnelles, qui dépend des plantes locales accessibles. Seul le fenugrec, actuellement la plante antidiabétique la plus étudiée mondialement, est présent dans les deux cultures.

Un tel sondage permet d'identifier les produits que les diabétiques sont le plus susceptibles de consommer pour traiter leur maladie. D'autres études ayant démontré l'attrait plus grand des diabétiques pour les PSN<sup>14</sup>, il devient primordial d'étudier ces plantes afin d'en connaître l'efficacité. En effet, si le produit s'avère efficace, il peut s'ajouter à l'effet du traitement et dérégler le fragile équilibre établi par la dose de médicament prescrite, augmentant ainsi le risque d'hypoglycémie.

## A.

Rang	Nom commun	Nom latin	Citations	TCPT	% 1 <sup>er</sup> choix
1	Bleuet	<i>Vaccinium myrtillus / angustifolium</i>	15	12.00	33.3%
2	Fenugrec	<i>Trigonella foenum graecum</i>	9	9.00	25.0%
3	Pissenlit	<i>Taraxacum officinale</i>	6	3.12	8.7%
4	Chardon-Marie	<i>Silybum marianum</i>	3	2.50	6.9%
5	Gymnema sylvestre	<i>Gymnema sylvester</i>	3	2.50	6.9%
6	Réglisse	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	3	1.75	4.9%
7	Artichault	<i>Cynara scolymus</i>	3	1.70	4.7%
8	Jambul	<i>Syzygium cumini</i>	2	1.50	4.2%
9	Nopal	<i>Opuntia streptacantha</i>	2	1.50	4.2%
10	Ginseng	<i>Panax ginseng/Ginseng quinquefolium</i>	3	1.33	3.7%

## B.

Rang	Nom commun	Nom latin	Citations	TCPT	% 1 <sup>er</sup> choix
1	Fenugrec	<i>Trigonella foenum graecum</i>	9	6.58	25.3%
2	Armoise	<i>Artemisia herba alba</i>	10	6.41	24.6%
3	Globulaire	<i>Globularia alypum</i>	9	5.83	22.4%
4	Origan	<i>Origanum compactum</i>	6	3.67	14.1%
5	Nigelle	<i>Nigella sativa</i>	8	3.53	13.6%
6	Vigne rouge	<i>Vitis vinifera</i>	4	3.25	12.5%
7	Lupin	<i>Lupinus albus</i>	5	3.17	12.2%
8	Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	6	2.53	9.7%
9	Aristolochie	<i>Aristolochia longa</i>	3	2.50	9.6%
10	Soja	<i>Glycine max</i>	4	2.33	9.0%

**Tableau III.** Plantes les plus recommandées aux diabétiques de type 2 au Québec (A) et au Maroc (B). Citation : nombre de fois que la plante a été mentionnée par les répondants. TCPT : taux de citations pondéré total, nombre de citations ajusté selon le rang accordé par les répondants. % 1<sup>er</sup> choix : classification finale selon le rang accordé et le nombre de répondants ayant cité la plante.

Devant ces résultats, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au bleuet canadien *Vaccinium angustifolium*. Celui-ci se retrouve en première position au Québec avec sa cousine la myrtille, *Vaccinium myrtillus*. Cette dernière a déjà fait

l'objet de quelques études intéressantes. Chez le rat rendu diabétique avec la streptozotocine, un traitement avec *V. myrtillus* diminue les problèmes microvasculaires associés à la maladie<sup>2</sup>. Entre autre, la plante protège les fonctions rénales, tel que démontré par une diminution de l'albuminurie<sup>12</sup>. *In vitro*, la myrtille diminue aussi l'oxydation des LDL humains, un phénomène important chez le diabétique<sup>26</sup>. Par contre, *V.angustifolium* n'a pas bénéficié d'études sur ses propriétés antidiabétiques. Son fruit est toutefois étudié pour son activité antioxydante, conférée par sa richesse en polyphénols, telles les anthocyanines. En effet, les anthocyanines, ces pigments responsables de la coloration de plusieurs petits fruits rouges ou bleutés, possèdent une activité antioxydante appréciable<sup>37</sup>, et ils ont été associés à la prévention de plusieurs maladies dégénératives chroniques comme l'athérosclérose et le cancer, dans lesquelles le stress oxydatif joue un rôle prépondérant<sup>22,23</sup>.

## 1.6 Prémisses de la présente étude

Les PSN deviennent de plus en plus populaires dans notre société. *V. myrtillus*, étudiée pour ses bienfaits dans le DT2, est prescrite en Europe pour la prévention de la rétinopathie diabétique. La plante cousine d'origine canadienne, *V. angustifolium*, n'a toutefois pas reçu le même intérêt scientifique. Figurant au premier rang des PSN les plus recommandés pour le DT2 dans notre sondage, il est logique de penser que certains diabétiques du Québec consomment déjà ce produit.

Le présent projet voulait donc évaluer le potentiel du bleuet canadien à titre de traitement complémentaire dans le DT2. Nous avons adopté une approche initiale basée sur l'usage des soit bio-essais *in vitro*. Aillant identifié la (les) partie(s) active(s) de la plante, nous procéderons ensuite aux études *in vivo* chez l'animal.

Pour l'instant, nous avons étudié la sécrétion de l'insuline et son action sur les tissus insulino-sensibles au moyen de lignées cellulaires. La lignée cellulaire  $\beta$ -pancréatique INS832/13 a servi à tester le potentiel insulino-trope de *V.angustifolium*. Les cellules hépatiques HTC, les cellules du muscle squelettique C2C12 et les adipocytes 3T3-L1 ont été utilisées pour vérifier l'activité insulino-sensibilisatrice ou insulino-mimétique de la plante. En dernier lieu, le potentiel cytoprotecteur de *V.angustifolium* a été étudié chez les cellules INS832/13 et les PC12, une lignée de cellules neuronales. Les résultats obtenus, de même que les détails techniques, sont décrits dans le Chapitre 2.

## 2. PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

Les manuscrits suivants sont l'œuvre de plusieurs spécialistes dans leurs domaines respectifs ayant unis leurs efforts dans le contexte d'une subvention d'équipe pour compléter les études réalisées par l'auteure du présent mémoire. Le premier manuscrit est en phase finale d'approbation par les co-auteurs. Le second est en préparation.

Les Dr John Thor Arnason et Steffany Bennett, de même que Andrew Burt et Cory S. Harris à Ottawa ont effectué les analyses HPLC des extraits de *V. angustifolium* et les tests de cytoprotection chez les PC12.

Le Dr Marc Prentki et Erik Joly du CHUM ont quant à eux effectué les études de sécrétion d'insuline chez les cellules INS832/13.

L'auteure du présent mémoire a réalisé la totalité des études de viabilité cellulaire, de signalisation et de transport de glucose conjointement avec ses collègues de laboratoire Louis Martineau, Danielle Spoor, Ali Benhaddou-Andaloussi et Charles Leduc.

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1. Identification de l'étudiant et du programme

Audrey Couture  
2-520-1-0 MSc Pharmacologie

### 2. Description de l'article

**Auteurs :** Audrey Couture and Louis C. Martineau, Danielle Spoor, Charles Leduc, Ali Benhaddou-Andaloussi, Cory Harris, Andrew Burt, Erik Joly, Steffany A. Bennett, John T. Arnason, Marc Prentki, Pierre S. Haddad.

**Titre :** *In Vitro* Insulin-Like, Insulin-Secretagogue, and Cytoprotective Activities of the Canadian Blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait.

**État :** Cet article est en révision finale par les co-auteurs et sera soumis en 2005 au British Journal of Pharmacology.

### 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Audrey Couture inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Études des propriétés antidiabétiques du bleuet canadien *Vaccinium angustifolium* Ait.

[Redacted Signature]

Louis C. Martineau

1<sup>er</sup> Sept 05  
Date

[Redacted Signature]

Danielle Spoor

20 sept 05  
Date

[Redacted Signature]

Charles Leduc

20 Sept 05  
Date

[Redacted Signature]

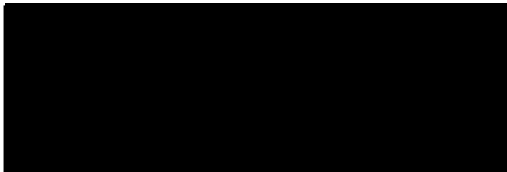
Ali Benhaddou-Andaloussi

20 sep 2005  
Date

[Redacted Signature]

Pierre S. Haddad

8 août 2005  
Date



Cory Harris

*Sept. 22/05*

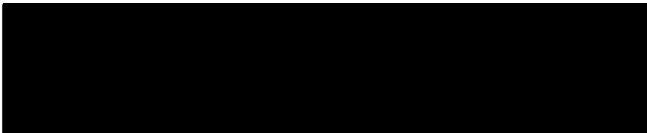
Date

Andrew Burt

Date

Steffany A. Bennett

Date



John Thor Arnason

*Sept 22 05*

Date

Erik Joly

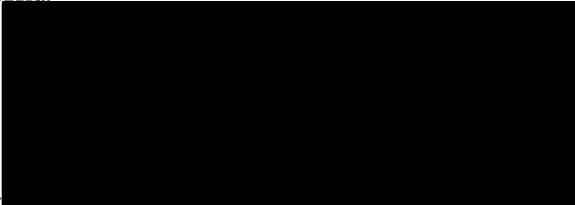
Date

Marc Prentki

Date

Cory Harris

Date



23/09/05

Andrew Burt

Date

Steffany A. Bennett

Date

John Thor Arnason

Date

Erik Joly

Date

Marc Prentki

Date



---

Andrew Burt

Date



*Sept 23 2005*

Steffany A. Bennett

Date

---

John Thor Arnason

Date

---

Erik Joly

Date

---

Marc Prentki

Date

Erik Joly

Date

07/09/2005.

Marc Prentki

Date

## ACCORD DES COAUTEURS -2

### 1. Identification de l'étudiant et du programme

Audrey Couture  
2-520-1-0 MSc Pharmacologie

### 2. Description de l'article

**Auteurs :** Audrey Couture, Louis C. Martineau, Diane Vallerand, Pierre S. Haddad.  
**Titre :** Activation of AKT and ERK Signalling Pathways in Insulin-Sensitive Cells Lines: Antidiabetic Properties of *Vaccinium angustifolium* Ait.

la revue dans laquelle l'article est ou sera publié et la date.  
Cet article est en préparation et sera soumis.....

### 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Audrey Couture inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Études des propriétés antidiabétiques du bleuet canadien *Vaccinium angustifolium* Ait.

[Redacted signature]

Louis C. Martineau

1<sup>er</sup> sept 05  
Date

[Redacted signature]

Diane Vallerand

1<sup>er</sup> Sept 05  
Date

[Redacted signature]

Pierre S. Haddad

9 août 2005  
Date

## I.

**In vitro Insulin-Like, Insulin-Secretagogue, and Cytoprotective Activities of the  
Canadian Blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait.**

\*Audrey Couture <sup>1</sup> and \* Louis C. Martineau <sup>1</sup>, Danielle Spoor <sup>1</sup>, Charles Leduc <sup>1</sup>, Ali Benhaddou-Andalousi <sup>1</sup>, Cory S. Harris <sup>3,4</sup>, Andrew Burt <sup>3</sup>, Erik Joly <sup>2</sup>, Steffany A. Bennett <sup>4</sup>, John T. Arnason <sup>3</sup>, Marc Prentki <sup>2</sup>, Pierre S. Haddad <sup>1</sup>

\* These authors contributed equally to this work.

**Affiliation**

<sup>1</sup> Département de Pharmacologie and Membrane Proteins Study Group, Université de Montréal, Montreal, Québec, Canada

<sup>2</sup> Département de Nutrition and Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Université de Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup> Department of Biology and Center for Research in Biopharmaceuticals and Biotechnology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada

<sup>4</sup> Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada

**Address for correspondence**

Pierre S. Haddad, PhD.  
Department of Pharmacology, S-459  
University of Montreal  
P.O. Box 6128 Station Centre-Ville  
Montreal, Quebec, Canada  
H3C 3J7

**Short Title:** Antidiabetic activities of the Canadian blueberry

**Keywords:** diabetes mellitus type II, natural health products, plant extracts, cell-based bioassays, pancreatic  $\beta$  cells, muscle cells, adipocytes, insulinomimetic, insulinotropic, cytoprotection.

### 2.1.1 Abstract

The incidence of type II diabetes is rapidly increasing worldwide. In order to identify complementary alternatives to existing medications, we studied anti-diabetic properties of *Vaccinium angustifolium* Ait., a widely used natural health product for the treatment of diabetes in Canada. Ethanolic extracts were prepared from roots, stems, leaves, and fruits and were tested for hypoglycemic and cytoprotective properties in cell-based assays. We assessed effects on: 1) deoxyglucose uptake in C2C12 muscle cells and 3T3-L1 adipocytes; 2) glucose-stimulated insulin secretion in INS832/13 pancreatic cells; 3) protection against cell death induced by elevated glucose in PC12 neuronal cells and 4) protection from glucolipototoxicity in INS832/13 cells. At 12.5 mg/L, root, stem, and leaf extracts significantly enhanced basal and insulin-stimulated transport in C2C12 cells by 15-25% following overnight incubation; no enhancement resulted from 1 h incubation. In 3T3 cells, only the root and stem extracts enhanced uptake, with a greater efficacy after 1 h than after 20 h, with uptake increasing by up to 75% in basal conditions. Following overnight incubation, the leaf and fruit extracts potentiated glucose-stimulated insulin secretion from INS832 cells by 40-50%, without affecting basal insulin secretion. Extracts did not protect INS cells against glucolipototoxicity, but reduced high glucose-induced apoptosis in PC12 cells by 25-50%. These results demonstrate that the Canadian blueberry has both insulin-like and insulintropic properties, while conferring protection against hyperglycaemic insult. These results thereby support the current ethnobotanical use of this plant in diabetes.

### 2.1.2 Introduction

The incidence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) has reached epidemic proportions in western and developing countries, with an estimated 150 million people affected worldwide<sup>27</sup>. Peripheral insulin resistance is a key feature of T2DM and results from a combination of sedentary lifestyle, unhealthy dietary habits, and genetic predisposition<sup>28</sup>. Insulin resistance is also implicated in a number of life-threatening disorders collectively referred to as the metabolic syndrome<sup>12</sup>.

Current medication options for the treatment of diabetes are relatively limited, have non-negligible side-effects, and must often be prescribed in combination<sup>9</sup>. The use of natural health products as complements or alternatives to existing medications is growing in popularity. While these have been the object of very few rigorous scientific studies, it is clear that many plants possess hypoglycemic activity, among which can be found plants with appreciable anti-diabetic potential<sup>22</sup>. Indeed, the widely prescribed insulin-sensitizer metformin was derived from guanidine, a molecule isolated from *Galega officinalis* L. (French lilac)<sup>2,29</sup>. Moreover, 4-hydroxy-isoleucine and derivatives of this amino acid isolated from *Trigonella foenum-graecum* L. (Fenugreek), a plant long consumed around the world for its anti-diabetic properties, are currently being developed as novel anti-diabetic molecules<sup>6,7</sup>.

Various members of the *Vaccinium* genus, including *Vaccinium myrtillus* L (European blueberry or Bilberry) and *Vaccinium macrocarpon* Ait.(American cranberry), are

reputed to possess anti-diabetic activity<sup>4,8</sup> and have been used extensively as traditional medicines for the treatment of diabetic symptoms<sup>17</sup>. In Canada, *Vaccinium angustifolium* Ait. (Canadian blueberry) is consumed widely as a natural health product (NHP) for this same purpose. A recent survey identified this plant as the most recommended anti-diabetic plant by Quebec naturopaths, ranking higher than fenugreek<sup>11</sup>. However, despite such claims and widespread use, the majority of published studies have focussed on the anti-oxidant properties of this species<sup>18</sup> and its anti-diabetic potential has not been the object of rigorous scientific investigation. The purpose of the present study was to test *V. angustifolium* for insulin-like activity, thiazolidinedione-like insulin-sensitizing activities, insulin-secretagogue activity and cytoprotective activity in cell-based bioassays.

### 2.1.3 Research Design and Methods

**Plant Material and Preparation.** Samples of a wild plant of *Vaccinium angustifolium* Ait. were harvested in La Vérendrye Wildlife Reserve, Quebec, Canada. Voucher specimens are stored at the University of Ottawa Herbarium. Before extraction, the plant was washed and separated into four organs: fruits, leaves, roots and stems. Fresh leaves were extracted in ethanol at room temperature (RT) for 6 wk. The ethanolic phase was recovered, dried at 40°C under low atmospheric pressure and lyophilised. Fresh roots and stems were dried, crushed, and extracted three times in ethanol at RT for 4 h. The ethanolic phase was then dried and lyophilised, as above. Fresh fruits were frozen at -80°C before crushing and extraction as for roots and stems. Final extracts were stored at 4°C.

**Cell cultures.** Reagents were purchased from Invitrogen Life Technologies unless otherwise noted. C2C12 murine skeletal myoblasts and 3T3-L1 murine pre-adipocytes were obtained from American Type Cell Collection (ATCC; Chicago, IL). INS832/13 cells<sup>15</sup>, kindly provided by C.B. Newgard (Duke University), are a clonal derivative of the INS-rat insulinoma cell line<sup>1</sup> that exhibit superior glucose-stimulated insulin secretion. PC12-AC cells are a clonal derivative of the PC12 pheochromocytoma cell line (ATCC).



All cells were cultured at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air atmosphere. C2C12 myoblasts were cultured in high glucose Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 10% horse serum (HS), and penicillin-streptomycin, until 75-80% confluent. Myoblasts were then differentiated into myotubes over 6 days in DMEM containing 2% HS. At the end of this period, all cells were multinucleated. 3T3-L1 cells were proliferated in DMEM containing 5% FBS and antibiotics. Upon confluence, differentiation was initiated by adding 0.5 nM isotonylmethylxanthine, 0.25 µM dexamethasone and 0.5 mg/L insulin (Sigma) to this medium for two days. Differentiation was then continued in DMEM containing 5% FBS and 5 mg/L insulin for 10 days, at which point more than 90% of cells contained lipid droplets visible under low power magnification. INS832/13 cells were grown in RPMI 1640 medium with 11 mM glucose and supplemented with 10 mM HEPES, 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 µM beta-mercaptoethanol, and antibiotics, until 80% confluence. PC12-AC cells were maintained in RPMI 1640 containing 10% HS, 5% FBS, and antibiotics and subcultured at 80% confluence (approx. twice weekly).

*V. angustifolium* extracts were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) for application to cell cultures; final DMSO concentration was 0.05 or 0.1% for all experiments. All extracts were applied at a dose of 12.5 mg/L. This dose was selected based on cytotoxicity experiments conducted in HTC hepatoma cells (results not shown), and overnight incubation at this concentration was confirmed to have no effect on the morphology of the various cell types employed here. Myotubes and adipocytes were incubated

approximately 18 h with extracts in respective medium, followed by 3 h in serum-free medium in order to minimize insulin-stimulated glucose uptake. Alternatively, cells were incubated with extracts for only 1 h during the third and final hour of serum starvation. INS832 cells were incubated overnight with extracts while PC12 cells were incubated 96 h with extracts.

**Glucose transport assay.** Differentiated C2C12 and 3T3-L1 cells were incubated for approximately 18 h with 12.5 mg/L of each extract in medium containing 0.5% HS or 0.5% FBS, respectively, and then serum starved for 1 h. Cells were starved in extract-supplemented, serum-free DMEM for 3 h if incubated with normal serum overnight or 1 h if incubated with 0.5% serum. Cells were then rinsed twice with a Krebs phosphate buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 136 mM NaCl, 5 mM PO<sub>4</sub>, 4.7 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 0.5% BSA) at 37°C and incubated at 37°C-5%CO<sub>2</sub> with insulin for 30 min in this buffer. Cells were washed twice with a glucose-free Krebs-phosphate buffer and <sup>3</sup>H-labeled 2-deoxyglucose (TRK-383, Amersham Biosciences) was then added to the glucose-free Krebs medium and incubation was continued for 10 min. Thereafter, cells were rinsed three times with ice-cold Krebs and lysed with 0.1 M NaOH. The final lysate was added to Ready Gel liquid scintillation cocktail (586601, Beckman Coulter) and the incorporated radioactivity was read in a scintillation counter. Metformin (400 μM) and fenugreek (75 μg/ml) were used as a positive controls.

**Insulin secretion assay.** INS832/13 cells were seeded in 12-well plates at a density of  $2-4 \times 10^5$  cells per well and incubated in growth medium for 24 h until 80% confluence. Cells were then incubated 18 h with or without 12.5 mg/L of plant extracts in medium containing 3 mM glucose. Cells were rinsed with and pre-incubated for one hour at 37°C in a Krebs-Ringer buffer (KRBH, 1 M HEPES, 0.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4, 135 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 2 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.07% fatty-acid-free BSA) containing 2 mM glucose in presence or absence of extracts. Medium was then replaced with KRBH containing 2 mM glucose in the presence or absence of extracts (basal insulin secretion) or KRBH containing 11 mM glucose or 2 mM glucose plus 30 mM of the non-fuel secretagogue KCl (stimulated insulin secretion) in the presence or absence of extracts, and incubation was prolonged for 1 h. At the end of this period, insulin secretion was assessed by sampling insulin content of medium. Samples were centrifuged 3min at 4°C at 3,000 x g to remove any cells, and supernatants were stored at -20°C until assayed by radioimmunoassay (RIA). Insulin measurements were normalized using total cell number per well. This was measured by quantifying genomic DNA using SYBR green fluorescent dye (Molecular Probes) after the insulin secretion experiment. Briefly, 0.3 ml of Dubelcco's-PBS (311-420, Wisent Inc.) supplemented with 20 mM HEPES (pH 7.4), 0.4% Triton X-100 and SYBR diluted 1:2500 was added in each well. Plates were stirred 10 min at 150 RPM before measurement of fluorescence with a FLUOstar Optima microplate reader (BMG Labtechnologies GmbH) using 485/530nm excitation/emission filters. Fluorescence values were compared to a standard curve made with known quantities of INS832/13 cells. Cellular insulin content was measured in unstimulated (basal) cells. Insulin was extracted in 1.25% HCl - 75%

ethanol and samples were kept overnight at 4°C. These samples were briefly sonicated and centrifuged at 30,000 *g* for 5 min before measurement of insulin in the supernatant by RIA.

**Radioimmunoassay.** Samples were placed on ice and appropriate dilutions were prepared for analysis of basal and stimulated insulin secretion, and of total cellular insulin content in a phosphate buffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.5, 25 mM EDTA, 1% BSA RIA-grade, 0.01% thimerosal) as previously described<sup>26</sup>. Diluted samples were incubated in 12 x 75 mm polypropylene RIA tubes with rat <sup>125</sup>I-insulin (Linco Research) and a primary antibody against rat insulin (Linco, #1013). The tubes were incubated at 4°C overnight in the dark before the secondary antibody (Linco, #2020) was added and incubated for 2 h at 4°C. Tubes were then centrifuged at 5,350 x *g* for 15 min and radioactivity in the pellet was measured. Human insulin was used as a standard.

**Protection against glucolipototoxicity.** To induce glucolipototoxicity, INS832/13 cells were seeded in clear bottom black 96-well plates (Costar) at a density of 15,000 cells per well and grown for two days in complete growth medium. Medium was removed and cells were then incubated for 24 h in growth medium containing 1% FBS and supplemented with either 5 mM glucose plus 0.5% BSA (G5-control condition) or 11 mM glucose plus 0.3 mM palmitate (Nu-Check Prep; Elysian, MN) bound to 0.5 % BSA (P11-glucolipototoxicity condition), in the presence or absence of 12.5 mg/L of plant extracts. BSA-bound FFA was prepared as described previously<sup>10</sup>. Glucolipototoxicity was assessed by measuring caspase-3 activity using the homogenous Caspase-Glo 3/7

Assay luminescence kit from Promega (Madison, WI). Caspase-3 activities were quantified by adding the luminescent reagent in the 96-well plates without harvesting or washing the cells, as described in the manufacturer's protocol, and luminescence was measured with a FLUOstar Optima microplate reader.

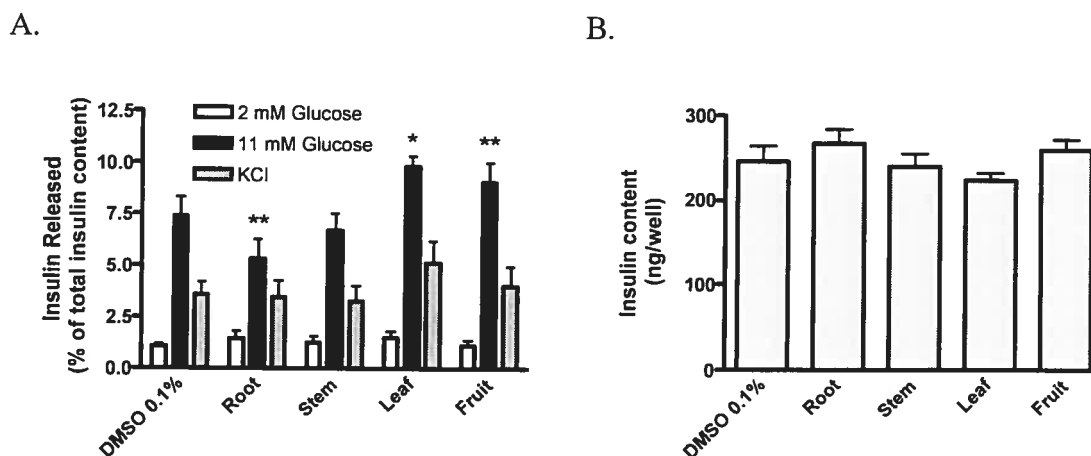
**Protection from high-glucose induced apoptosis.** PC12 cells were plated in 96-well plates at a density of  $6.25 \times 10^3$  cells/well and allowed to incubate for 24 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Complete medium was then replaced with serum-free RPMI containing 11 mM glucose (low glucose) or 150 mM (high glucose) and supplemented with 0.025% BSA (Sigma) and 0.1% DMSO, with or without extract. After 96 h of treatment, 10 µL of WST (Roche, Laval Quebec) was added to each well and the plate allowed to incubate for 75 minutes before colorimetric analysis for absorbance at  $\lambda = 420/620$ . Cell number per well was calculated from absorbance based on experimentally prepared standard curves of known cell number<sup>4,19</sup>. Low glucose and high glucose vehicle only controls were included on every plate and pooled for statistical analysis. All treatments were conducted with a minimum of 8 replicates. Data was expressed as percent protection where:

$$\% \text{ protection} = \frac{((\text{high glucose with extract}) - (\text{high glucose no extract}))}{((\text{low glucose no extract}) - (\text{high glucose no extract}))} \times 100$$

**Statistical analysis.** Results were analysed by one-way analysis of variance with Fisher post hoc test using StatView software (SAS Institute Inc). Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . All data are reported as mean  $\pm$  SEM.

#### 2.1.4 Results

**Enhancement of glucose-stimulated insulin secretion in INS832/13 cells, with no change in total insulin content or basal insulin secretion.** In order to test whether extracts of *V.angustifolium* possess insulintropic activity, insulin-secreting INS832/13 cells were incubated overnight with or without 12.5 mg/L of each extract, and insulin secretion assessed following 1 h in medium containing 2 mM glucose (basal secretion), 11 mM glucose (glucose-stimulated secretion), or 2 mM glucose plus 30 mM KCl (non-fuel secretagogue stimulated secretion), in the presence or absence of extract. In this model, insulin secretion increases 8-fold above basal levels in response to 11 mM glucose in cells incubated with vehicle only (DMSO). Measurement of insulin released into the medium revealed that extracts did not significantly alter basal secretion. KCl-stimulated secretion was not altered, indicating normal cellular function. However, insulin secretion in response to elevated glucose was significantly increased by leaf and fruit extracts, resulting in 12- and 11-fold increases over vehicle-only basal secretion, respectively, in response to 11 mM glucose (Figure 1A). Measurement of intracellular insulin content in unstimulated-basal cells revealed that extracts did not alter total insulin content (Figure 1B). Normalizing secretion data by total insulin content indicates that the percentage of total content released over 1 h in response to high-glucose increased 52 and 40% after treatment with leaf and fruit extracts, respectively.

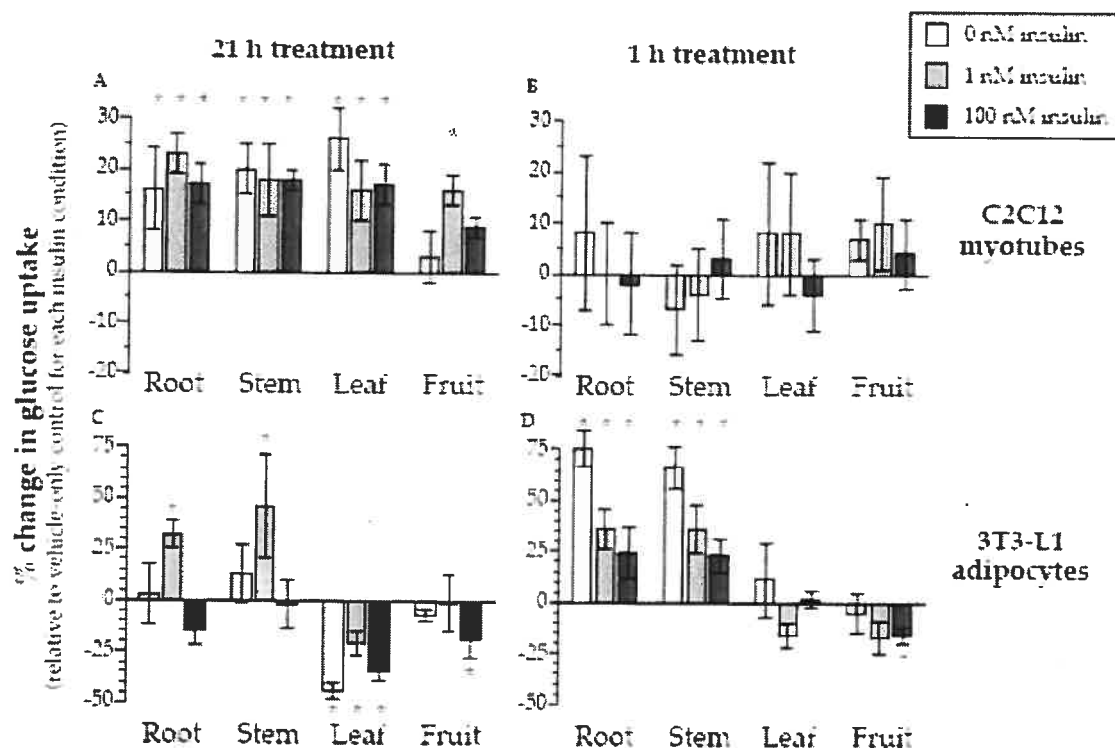


**Figure 1.** Effect of blueberry extracts (12.5mg/L) on insulin secretion (A) and total insulin content (B) of INS832/13 cells. Insulin secretion conditions (A) are 2 mM glucose (basal insulin secretion), 11 mM glucose (glucose-stimulated secretion), or 2 mM glucose plus 30 mM KCl (non-fuel secretagogue). Total cellular insulin content was assessed in cells that received the same treatment but were not subjected to the secretion assay (B). Data are means + SEM for a total of 12 measurements carried out in 3 separate experiments. \* $p < 0.05$ .

**Enhancement of deoxyglucose uptake in differentiated C2C12 muscle cells and 3T3-L1 adipocytes.** Extracts of *V.angustifolium* were tested for insulin-like properties by assessing insulin-dependent and -independent glucose uptake in two insulin-responsive and GLUT4-containing cell lines: differentiated C2C12 myotubes and differentiated 3T3-L1 adipocytes. In C2C12 cells, 100 nM of insulin induces approx. a 40% increase in uptake of labelled deoxyglucose. Metformin can be used as a positive control, and overnight incubation with 400  $\mu$ M metformin induces approx. a 40% increase in uptake, with or without insulin. In 3T3-L1 cells, 100 nM of insulin induces approx. a 400% increase in transport.

Overnight incubation of C2C12 cells with 12.5 mg/L of root, stem, or leaf extracts prior to the deoxyglucose transport assay resulted in significant ( $p < 0.05$ ) enhancement of

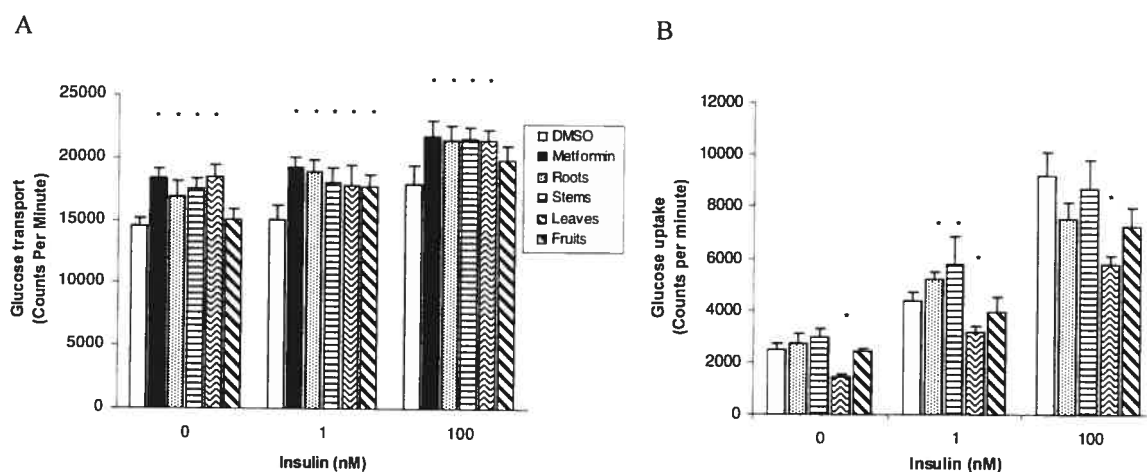
uptake by 15-25% in the presence or absence of insulin (Figure 2A). Incubation with fruit extract only enhanced uptake in the presence of insulin. Reducing extract incubation time to 1 h abolished all enhancement of uptake in C2C12 cells (Figure 2B).



**Figure 2.** Effects of blueberry extracts on C2C12 myotubes and 3T3-L1 adipocytes  $^3\text{H}$ -deoxyglucose transport. Results are expressed as percent change of incorporated radioactivity (CPM) per well normalized to the radioactivity incorporated in the respective vehicle-treated cells  $\pm$  SEM.  $n=3-6$ ,  $*p < 0.05$ .

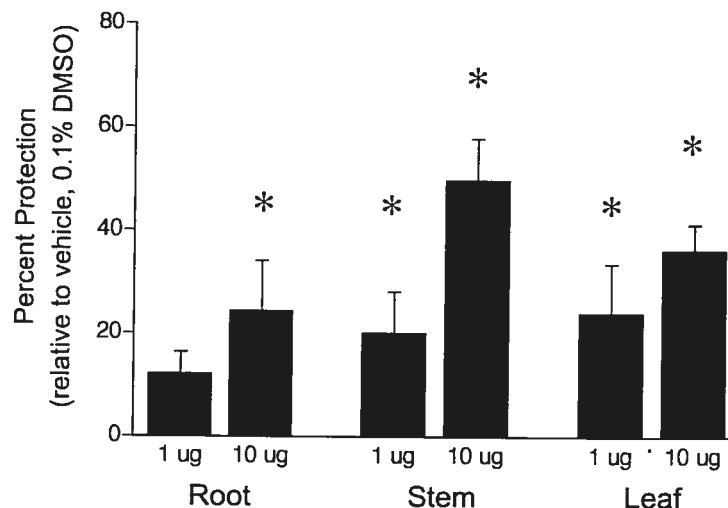
Overnight incubation of 3T3-L1 cells with root or stem extract significantly enhanced transport at 1 nM insulin, but not at 100 nM or in the absence of insulin (Figure 2C). Reducing incubation time with root or stem extract to 1 h resulted in significantly enhanced transport at 0, 1, and 100 nM insulin (Figure 2D). Overnight incubation with leaf extract inhibited uptake at all insulin concentrations, while fruit extract had no effect (Figure 2C). At 1 h, leaf and fruit extracts did not affect uptake (Figure 2D).





**Figure 3.** Raw data from the  $^3\text{H}$ -deoxyglucose transport assay, after 21h of incubation with extracts. Metformin (400  $\mu\text{M}$ ) and fenugreek (75  $\mu\text{g/ml}$ ) served as positive controls for myotubes and adipocytes, respectively. Results are expressed in CPM  $\pm$  SEM,  $n=3-6$ ,  $*p < 0.05$ . A: C2C12 myotubes. B: 3T3-L1 adipocytes.

**Reduction of high-glucose-induced apoptosis in PC12 neuronal cells.** The ability of extracts of *V.angustifolium* to protect against cell-death induced by an elevated concentration of glucose was tested in PC12 neuronal cells. Metabolic activity was assessed based on the ability of mitochondrial dehydrogenases, active in viable cells, to cleave the tetrazolium salt WST-1 to formazan, a colored salt<sup>4,19</sup>. When PC12 cells were incubated in medium containing 150 mM glucose for 96 h, cell viability decreased by more than 40% (data not shown). PC12 cells were incubated under these conditions in the presence of 1 or 10  $\mu\text{g/ml}$  of root, stem, or leaf extract. All extracts tested were found to significantly reduce high glucose-induced death in a dose-dependent manner (Figure 4). Following incubation with 1  $\mu\text{g/ml}$  of extract, cell viability increased significantly by 20-25% for stem and leaf ( $p < 0.05$ ). With 10  $\mu\text{g/ml}$  of extract, all three plant parts significantly improved viability by 20-50%. Higher extract concentrations (30  $\mu\text{g/ml}$ ) were toxic to cells and potentiated glucose-induced death (results not shown).



**Figure 4.** Effects of 1 or 10  $\mu\text{g}$  of root, stem, or leaf extracts on PC12 cells survival to high glucose-induced cell death. Data are means + SEM of the % protection calculated from viability counts.  $n = 7-14$ , \*  $p < 0.05$ .

**Absence of protection from glucolipototoxicity in INS832/13cells.** The ability of extracts of *V.angustifolium* to protect pancreatic  $\beta$  cells from cell death induced by a combination of elevated glucose and elevated free fatty acid concentrations (i.e. glucolipototoxicity) was tested in INS832/13 insulin-secreting cells. Cell death, predominantly in the form of apoptosis, was induced in over 50% of these cells when they are incubated overnight in medium supplemented with a combination of 0.3 mM palmitate and 11 mM glucose. Incubating cells with *V.angustifolium* extracts under these conditions of glucolipototoxicity had no effect on incidence of cell death by apoptosis, as measured by caspase-3 activation (results not shown).

### 2.1.5 Discussion

*Vaccinium angustifolium* is reputed to possess anti-diabetic properties<sup>11</sup>, much like other better- studied species of the *Vaccinium* genus<sup>8,21</sup>. However, despite such claims and widespread use, the antidiabetic potential of *V.angustifolium* has not been subjected to rigorous scientific investigation and only its anti-oxidant properties have been documented to date<sup>18</sup>. Using a number of cell-based bioassays, the present study has confirmed that *V. angustifolium* possesses insulin-like and insulinotropic activities *in vitro* and can protect cells against hyperglycemic insult.

An important finding of the present study is the insulin-secretagogues present in *V.angustifolium* that act in a glucose-dependent manner *in vitro*, not affecting secretion at the basal glucose concentration, but potentiating it at elevated concentrations. This is a desirable property in an insulinotropic molecule in the treatment of T2DM, as it lessens the danger of inducing hypoglycemia, a severe adverse effect of sulfonylureas and related insulin secretagogues<sup>2</sup>. The magnitude of the effect of *V. angustifolium* extracts is remarkable considering that the ethanolic extracts are complex mixtures of molecules; this may indicate that, once purified, the secretagogues(s) will exhibit high activity. The active insulinotropic molecule in these extracts remains to be identified. However, it is likely to be a flavonoid of the anthocyanin or of the flavonol class, as both classes contain known insulin secretagogues<sup>13,16</sup>. Furthermore, the observation that this activity is restricted to the leaf and fruit extracts may help in the future identification of the active compound.

Of equal importance is the finding that extracts of *V.angustifolium* contain one or more molecules with insulin-like properties, as evidenced by enhancement of insulin-dependent and -independent glucose uptake *in vitro*. Further work is required to elucidate the mechanism by which this effect is mediated. However, the tissue specific nature of the effect, whereby muscle cells are more greatly affected than adipocytes, combined with the observation that there is no saturation at the highest insulin concentration tested in myotubes, would suggest an insulin-independent mechanism such as involvement of the AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway<sup>23</sup>. The absence of enhancement following a 1h incubation with extracts suggests that regulation at the transcriptional or translational level may be involved as well. Tissue specific effects are desirable with “insulin-sensitizers” used in the treatment of T2DM such as metformin, since side-effects such as weight gain are minimized<sup>20</sup>. The molecules responsible for this action remain to be identified. However, differential activity among extracts of the four plant parts may again help with identification. Activity in root and stem extracts on glucose transport clearly supports that the molecule with insulin-like properties is different from the one with insulinotropic properties.

Complications secondary to chronic hyperglycemia are numerous and include damage to vascular endothelial cells, kidney podocytes, and neural tissue<sup>14</sup>. Using a model of high-glucose induced neuronal cell death, we found that extracts of *V. angustifolium* exert a protective effect in these cells. Possible mechanisms include a decrease in lipid peroxidation, protein oxidation and/or protein glycation<sup>24</sup>, consistent with known anti-oxidant properties of *V. angustifolium*<sup>18</sup> and properties of flavonoids in general<sup>5</sup>. In

contrast to neural cell death, death of pancreatic beta cells from a combination of elevated glucose and free fatty acids may be involved in the etiology of T2DM<sup>10</sup>. The mechanism responsible for glucolipotoxicity is believed to be more complex than an accumulation of oxidative and glycative damage<sup>25</sup>, and it is therefore not surprising to find that using an *in vitro* model, the extracts did not protect insulin-secreting cells against this type of insult.

These findings of potential anti-diabetic properties support the widespread use of *V. angustifolium* as a complementary or alternative treatment for T2DM. However, these *in vitro* results must be reproduced *in vivo* using animal models of insulin-resistance and diabetes before this can be ascertained. Mechanisms of action and active molecules responsible for the observed insulin-like, insulinotropic, and cytoprotective properties of *V. angustifolium* extracts remain to be identified. These pharmacological agents may contribute to the development of novel medications for the treatment of T2DM.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the Canadian Diabetes Association.

### 2.1.5 References

1. Asfari, M., et al. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*, **1992**, 130: 167-78.
2. Bailey, C. and Day, C. Avandamet: combined metformin-rosiglitazone treatment for insulin resistance in type 2 diabetes. *Int J Clin Pract*, **2004**, 58: 867-76.
3. Blumenthal, M., The Complete German Commission E Monographs - Therapeutic Guide to Herbal Medicines. *American Botanical Council*, **1998**: 685p.
4. Bonin F, Ryan SD, Migahed L, Mo F, Lallier J, Franks DJ, Arai H, Bennett SA. Anti-apoptotic actions of the platelet-activating factor acetylhydrolase I alpha2 catalytic subunit. *J Biol Chem*. **2004**, 279(50): 52425-36.
5. Bonnefont-Rousselot, D. The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. *Treat Endocrinol*, **2004**, 3: 41-52.
6. Broca, C., et al. 4-Hydroxyisoleucine: Experimental Evidence of its Insulinotropic and Antidiabetic Properties. *American Journal of Physiology Enocrinology and Metabolism*, **1999**, 277: E617-E23.
7. Broca, C., et al. The Insulinotropic Agent ID1101 (4-hydroxyisoleucine) Activates Insulin Signaling in Rat. *American Journal of Physiology Enocrinology and Metabolism*, **2004**,
8. Chambers, B. and Camire, M. Can cranberry supplementation benefit adults with type 2 diabetes? *Diabetes Care*, **2003**, 26: 2695-6.

9. Cheng, A. and Fantus, I. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ*, **2005**, 172: 213-26.
10. El-Assaad, W., et al. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology*, **2003**, 144: 4154-63.
11. Haddad, P. S., et al. Comparative Study on the Medicinal Plants Most Recommended by Traditional Practitioners in Morocco and Canada. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, **2003**, 10: 25-45.
12. Hansen, B. C. The Metabolic X syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1999**, 892: 1-24.
13. Hii, C. and Howell, S. Effects of flavonoids on insulin secretion and  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  handling in rat islets of Langerhans. *Endocrinology*, **1985**, 107: 1-8.
14. Hill, J. Identifying and managing the complications of diabetes. *Nurs Times*, **2004**, 100: 40-4.
15. Hohmeier, H., et al. Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*, **2000**, 49: 424-30.
16. Jayaprakasam, B., et al. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *J Agric Food Chem*, **2005**, 53: 28-31.
17. Jellin, J., et al. *Pharmacist's Letter/Prescriber's Letter. Natural Medicines Comprehensive Database*. Therapeutic Research Faculty, Stockton, CA, 2005.

18. Kay, C. D. and Holub, B. J. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on post-prandial serum antioxidant status in human subjects. *British Journal of Nutrition*, **2002**, 88: 389-97.
19. Kiss, K., Kiss, J., Rudolf, E., Cervinka, M., and Szeberenyi, J. Sodium salicylate inhibits NF-kappaB and induces apoptosis in PC12 cells. *J Biochem Biophys Methods*. 2004, 61(1-2): 229-40.
20. Krentz, A. and Bailey, C. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, **2005**, 65: 385-411.
21. Laplaud, P., Lelubre, S. and Chapman, M. Antioxidant action of *Vaccinium myrtillus* extract on human low density lipoproteins in vitro: initial observations. *Fundam Clin Pharmacol*, **1997**, 11: 35-40.
22. Marles, R. and Farnsworth, N. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, **1995**, 2: 137-65.
23. Musi, N. and Goodyear, L. AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. *Acta Physiol Scand*, **2003**, 178: 337-45.
24. Obrosova, I. Update on the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Curr Diab Rep*, **2003**, 3: 439-45.
25. Prentki, M., et al. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes*, **2002**, 51 Suppl 3:: S405-S13.



26. Roduit, R., et al. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes*, **2004**, 53: 107-1019.
27. Scott, C. L. Diagnosis, Prevention, and Intervention for the Metabolic Syndrome. *American Journal of Cardiology*, **2003**, 92: 35i-42i.
28. Skyler, J. Diabetes Mellitus: Pathogenesis and Treatment Strategies. *J Med Chem*, **2004**, 47: 4113-7.
29. Witters, L. A. The Blooming of the French Lilac. *The Journal of Clinical Investigation*, **2001**, 108: 1105-7.

**II.****Activation of AKT and ERK Signalling Pathways in Insulin-Sensitive Cell Lines:  
Antidiabetic Properties of *Vaccinium angustifolium* Ait.**

Audrey Couture, Louis C. Martineau, Diane Vallerand and Pierre S. Haddad

Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada and  
Institut des Nutraceutiques et Aliments Fonctionnels (INAF), Université Laval, Québec.

Pierre S. Haddad, PhD.  
University of Montreal  
Department of pharmacology  
PO Box 6128 Station Centre-Ville  
Montreal, QC, CANADA  
H3C 3J7

Short Title: Intracellular signalling effects of *V. angustifolium*

Keywords: Type 2 diabetes mellitus, Insulinomimetic, Insulin sensitizer, *Vaccinium angustifolium*, *in vitro* bioassays, natural health products.

### 2.2.1 Abstract

The popularity of alternative and complementary medicines is increasing within the North American population. In previous work, we studied the *in vitro* antidiabetic potential of *Vaccinium angustifolium*, one of the plants most recommended in Eastern Canada for treating T2DM. Our results demonstrated increased glucose uptake activity in response to insulin in skeletal muscle. In order to determine the effect of the plant on insulin signaling pathways, we used various insulin-responsive cell cultures, including the HTC hepatoma, C2C12 myoblast and the 3T3-L1 adipocyte cell lines. Overnight incubation with the ethanolic stem extract of *Vaccinium angustifolium* resulted in increased basal and insulin-stimulated PKB/Akt activation in C2C12 myoblasts and 3T3-L1 adipocytes. The root extract produced a similar activation but only in 3T3-L1 cells. No overall effect was noted in HTC hepatocytes, although a tendency to increase insulin-stimulated activation of AKT could be observed. For ERK1/2 Map kinase activation, the roots and stems increased basal and insulin-stimulated activation in HTC cells. This effect did not reach significance in 3T3-L1 and C2C12 cells, although these extracts tended to increase activation of the Map kinases in response to insulin stimulation. No intracellular signaling effects were observed with the leaf and fruit extracts. These results indicate that the roots and stems may act via insulin signaling proteins to exert their positive effect on glucose transport *in vitro*.

### 2.2.2 Introduction

The use of complementary and alternative medicine (CAM) is increasingly popular in developed countries<sup>6</sup>. However, a larger number of rigorous studies are needed to confirm the efficacy of several natural health products, an important part of CAM. Patients suffering from type 2 diabetes mellitus (T2DM) are likely to seek such therapies, because of both the chronicity of their disease and the relatively poor efficacies of prescription drugs in long term glycemic control<sup>5</sup>.

Haddad and colleagues<sup>6</sup> have previously surveyed traditional practitioners on anti-diabetic plants most recommended for the treatment of T2DM in Eastern Canada. The Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* ranked first in Quebec, CANADA. Data to support the use of this plant in diabetics is scarce and we therefore analysed the potential insulinotropic and insulin-sensitizing activities of *V. angustifolium*. Our initial results have shown that the root, stem and leaf extracts of the plant increased basal and insulin-stimulated muscle glucose transport to a similar extent as metformin, but failed to identify such extensive activity in adipocytes<sup>4</sup>. These results have suggested the potential activity of the Canadian blueberry in overcoming the insulin resistance associated with T2DM. In order to identify the mechanism(s) of action of the extracts accounting for such interesting insulin-like activities, we studied the activation of the insulin signaling pathway in three major insulin-sensitive cell lines, namely hepatocytes, skeletal muscle cells and adipocytes.

In these tissues, binding of insulin causes receptor autophosphorylation and activation of two major intracellular signaling pathways: the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathway involved in glucose transport and glycogen synthesis, and the extracellular regulated kinase (ERK) pathway, predominantly associated with gene regulation and cell survival<sup>2,11</sup>. Because decreased insulin receptor mediated cellular signaling is observed in type 2 diabetic patients, agents that stimulate these pathways could have potential interest as complementary treatments for this disease.

The purpose of the study was therefore to determine the mechanism(s) of action of *V. angustifolium* on these two pathways in cell lines of skeletal muscle, adipose tissue and hepatic origin.

### 2.2.3 Research Design and Methods

**Plant Material and Preparation.** Extracts of *Vaccinium angustifolium* were prepared as previously described<sup>4</sup>. Briefly, fresh *V. angustifolium* plants were harvested and separated into four parts: fruits, leaves, roots and stems. Ethanolic extraction was carried out and the ethanolic phase was lyophilised and stored at 4°C. Before use in cell cultures, extracts were solubilised in DMSO and used at a final concentration of 12.5 mg/L, previously shown to be non-cytotoxic and active on these cell lines<sup>4</sup>.

**Cell cultures.** Cell culture reagents were purchased from Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON) unless otherwise noted. HTC hepatoma cells were originally provided by Dr J. Gregory Fitz of the Colorado Health Service Center (Denver, CO). C2C12 murine skeletal muscle cells and 3T3-L1 murine adipocytes were obtained from American Type Cell Collection (Chicago, IL). HTC cells were cultured in minimal essential medium (MEM, Sigma, St-Louis, MO) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and 0.1% penicillin-streptomycin (100U/L and 10mg/mL respectively) at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Confluent cells were incubated in the presence of extracts for 21h. The first 18h of incubation were carried out in MEM + 5% FBS and the three last hours were spent in serum-free medium supplemented with fresh extract. Serum starving ensured absence of insulin, allowing insulin signaling pathways to return to baseline levels (data not illustrated). C2C12 myoblast cells were incubated as previously described<sup>13</sup> in high glucose Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 10% horse serum (HS), 0.1% penicillin-streptomycin until

75-80% confluent. Differentiation was then initiated by reducing serum content to 2% HS for a total of 7 days. On day 6, cells were incubated overnight (18h) with extracts followed by a 3h period in a serum-free DMEM containing fresh extracts on day 7. 3T3-L1 cells were allowed to proliferate in DMEM + 5% FBS. The differentiation step was initiated by adding 0.5nM isotonylmethylxanthine, 0.25 $\mu$ M dexamethasone and 0.5mg/L insulin (Sigma-Aldrich, Mississauga, ON) for two days. Differentiation was continued in DMEM with 5% FBS and 5mg/L insulin for 10 days. Treatment with extracts was the same as C2C12 cells.

**Treatment with insulin.** Bovine insulin (Sigma) was dissolved at 0.5mM in 0.01M HCl and kept at 4°C. The day of the experiment, fresh dilutions in 0.01M HCl were prepared and kept on ice until use. After extract incubation and serum starvation as described above, insulin was added in serum-free media to final concentrations of 0, 1 or 10 nM depending on their respective insulin responsiveness, and incubation pursued for 5 min. Cells were then rinsed with culture medium and re-incubated with extract for various periods of time. The reaction was stopped by rinsing twice with ice-cold PBS. Cells were lysed in a freshly prepared lysis buffer (25mM Tris-HCl (pH 7.4), 25mM NaCl, 0.5mM EDTA, 1% Triton-X-100, 0.1% SDS, 2mM benzamidine, 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 10 $\mu$ g/ml aprotinin, 10mM sodium fluoride, 1mM sodium orthovanadate, and 10mM sodium pyrophosphate). Lysis was allowed to take place for 5 minutes on ice before scraping with a rubber policeman. Lysates were recovered and unsolubilized material was removed by centrifugation (4,500  $\times$  g for 10 min) at 4°C. The supernatant was kept at -80°C until analysed.

**Western blot analyses.** Protein content of the samples was assayed using a bicinchoninic acid kit (Pierce, Rockford, IL). Samples were appropriately diluted for western blotting in a reducing sample buffer (62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol 5%  $\beta$ -mercaptoethanol and 0.01% bromophenol blue) and boiled for 3 min. 10 to 25 $\mu$ g total protein of each sample were loaded onto 10% acrylamide mini-gels (Bio-Rad, Mississauga, ON) for separation by SDS-PAGE. Proteins were then electroblotted onto a 0.45 $\mu$ m nitrocellulose membrane and the membrane subsequently blocked for 60 to 120 min in TBS (200mM Tris, 1.37M NaCl, pH 7.6), 0.1% Tween-20 and 5% non-fat dry milk. Immunodetection of phosphorylated forms of Akt (Ser473) and p42/44Map kinase (Thr202/Tyr204) was performed using phospho-specific primary antibodies (Cell Signaling #9271 and #9106, Beverly, MA) at concentrations of 1:1,000 and 1:2,000 respectively for one hour at room temperature in TBS 0.1% Tween-20 and 5% non-fat dry milk. Following detection of the phosphorylated forms of Akt and p42/44MapK, membranes were stripped and total content of the previously detected proteins was assessed by incubating membranes with a pan-specific antibody (1:1,000 anti-Akt, Cell Signaling #9272 or 1:2,000 anti-p42/44MapK, Cell Signaling #9102). Secondary anti-rabbit or anti-mouse HRP-conjugated antibodies were used (1:100,000) for detection with an enhanced chemiluminescence detection kit (Perkin Elmer, Boston, MA).

**Statistical analysis.** All data are reported as mean  $\pm$  SEM. Results were analysed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures as appropriate following the Fisher post hoc method using the StatView software (SAS Institute Inc, Cary, NC). Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

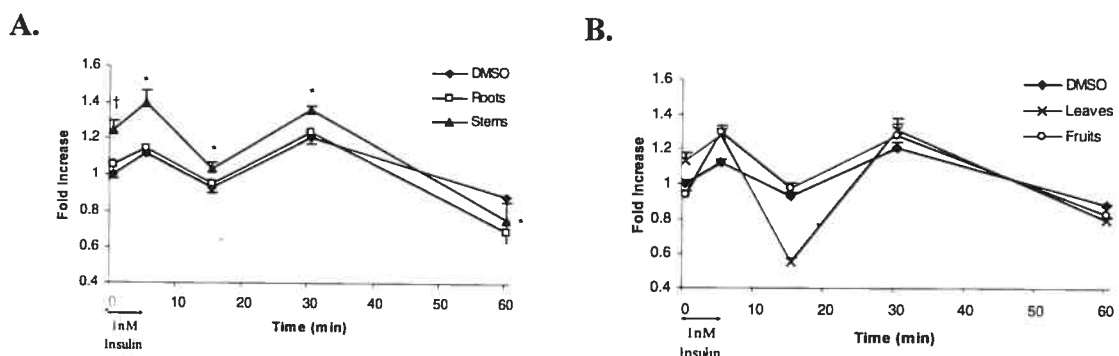


## 2.2.4 Results

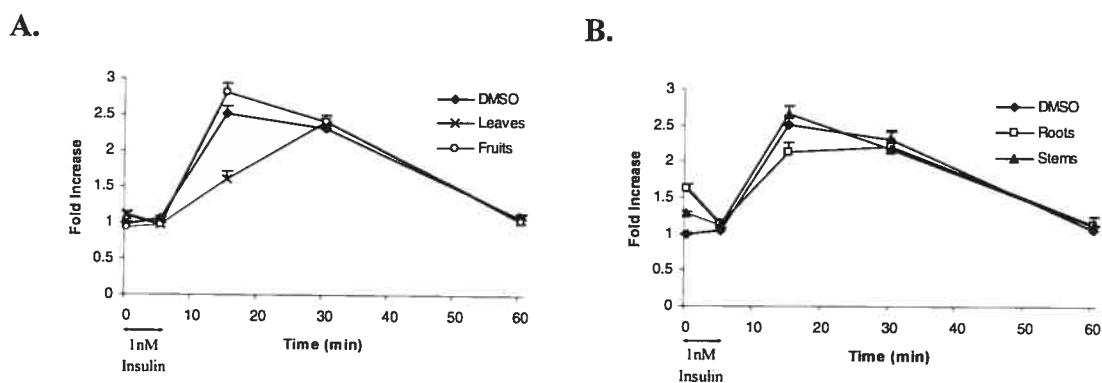
**Baseline signaling response to insulin in the three cell lines.** Changes in the insulin signaling pathways were analysed to gain further insight into the mechanisms underlying the increases in glucose transport observed previously in muscle and adipose tissues<sup>4</sup>. We extended the signaling analysis to include HTC cells, a cell line model for the liver, which plays an important role in glycemic control. Cells were incubated in conditions identical to those used previously for the glucose transport bioassays. As expected, control cells of all lineages displayed an increase in the phosphorylated forms of PKB/Akt that was maximal 5 min after the onset of insulin stimulation. For the ERK1/2 MAP kinase, this stimulation was most pronounced 10 min after insulin removal, as shown previously in hepatocytes<sup>8</sup>.

**Effects of *V. angustifolium* on intracellular insulin signaling in C2C12 cells.** The time course of PKB/Akt phosphorylation in C2C12 cells treated with the stem extract showed a statistically significant increase in PKB/Akt activation (repeated measures ANOVA,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ; Figure 1A). The effect of the stem extract on C2C12 PKB/Akt signaling confirms the downstream effects on glucose uptake observed previously in this cell line<sup>4</sup>. *V. angustifolium* fruit extract tended to increase activation of this signaling pathway but this effect did not reach significance (Figure 1B). No significant overall changes could be observed in PKB/Akt phosphorylation when C2C12 myoblasts were incubated with the root (Figure 1A) or leaf (Figure 1B) extracts. Interestingly, the stems increased both basal and insulin-stimulated activation of the effector, suggesting that the

presence of insulin is not required for the stems to exert their stimulatory action. This tonic stimulation of both PKB/Akt signaling and glucose transport in the absence of insulin indicates that the stems may act via an insulinomimetic or an insulin-independent mechanism. On the other hand, the phosphorylation curve of ERK1/2 was not significantly modified by the extracts in C2C12 cells. The only discernable effect was a tendency for the leaves to delay the peak ERK1/2 activation following insulin stimulation from 15 to 30 min (Figure 2).

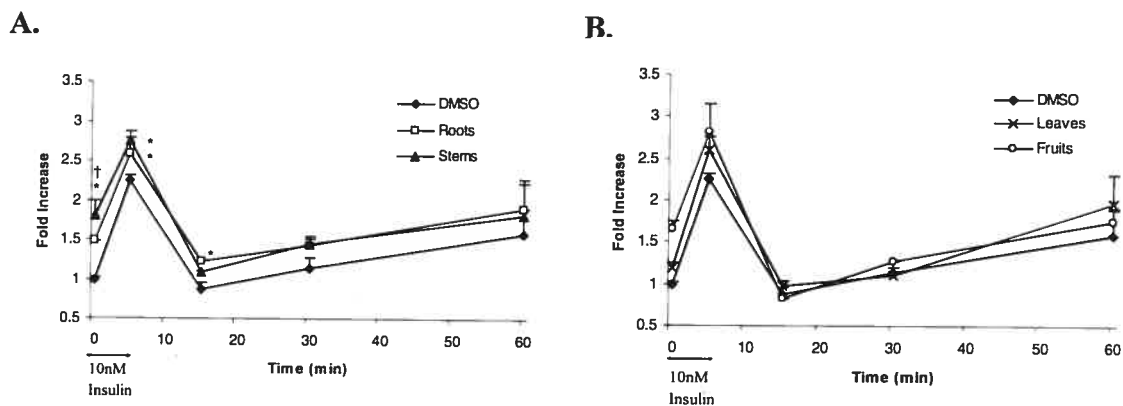


**Figure 1.** Phosphorylation of PKB/Akt in C2C12 myoblasts after treatment with extracts compared with vehicle. Insulin was added at 1nM for 5min and then removed. Cells were re-incubated with extracts for varying amounts of time before lysis. Data are mean  $\pm$  s.e.mean of  $n=3$ , \* $p < 0.05$ , †  $p < 0.001$ .

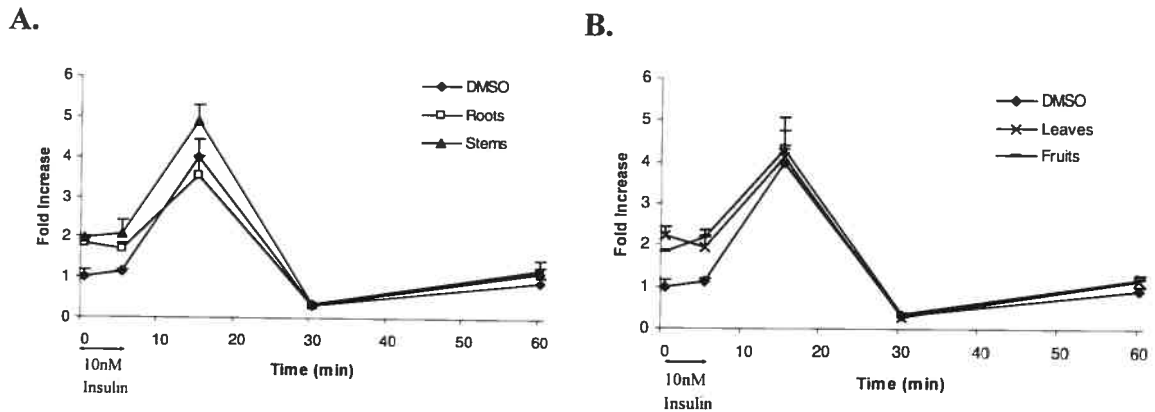


**Figure 2.** Phosphorylation of ERK1/2 MAP kinase in C2C12 after treatment with extracts compared with vehicle. Insulin was added at 1nM for 5min and then removed. Cells were re-incubated with extracts for varying amounts of time before lysis. Data are mean  $\pm$  s.e.mean of  $n=3$ .

**Effects of *V. angustifolium* extracts on intracellular insulin signaling in 3T3-L1 cells.** In 3T3-L1 cells, the activation of PKB/Akt in response to insulin was significantly increased by the stem as well as the root extracts (RM ANOVA,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ; Figure 3A). Both extracts had previously demonstrated an increase in glucose transport in these cells<sup>4</sup>. Similar to C2C12 response, the action of these extracts appears insulin-independent, as suggested by the significant increase in basal PKB/Akt phosphorylation. The insulin-stimulated state was increased by the two extracts to the same extent as their basal effect, that is, the phosphorylation curves are shifted upwards and parallel the curve of the extract vehicle. *V. angustifolium* leaf and fruit extract did not influence PKB/Akt activation pattern in response to physiological insulin stimulation (Figure 3B). As for the muscle cells, no significant effects were observed at the level of ERK1/2 MAP kinase activity in 3T3-L1 adipocytes for any extracts (Figure 4). The stems tended to increase this activation but the AUC changes did not reach significance.



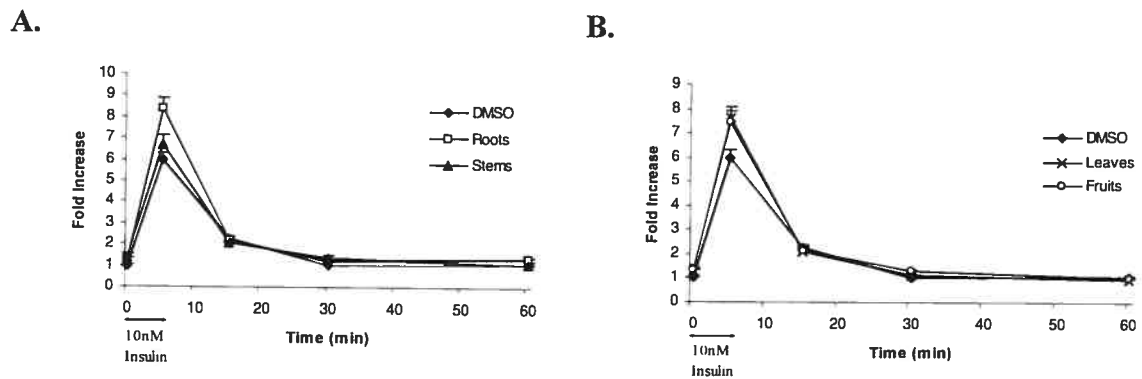
**Figure 3.** Phosphorylation of PKB/Akt in 3T3-L1 adipocytes after treatment with extracts compared with vehicle. Insulin was added at 10nM for 5min and then removed. Cells were re-incubated with extracts for varying amounts of time before lysis. Data are mean  $\pm$  s.e.mean of  $n=3$ , \* $p < 0.05$ , †  $p < 0.001$  for stems.



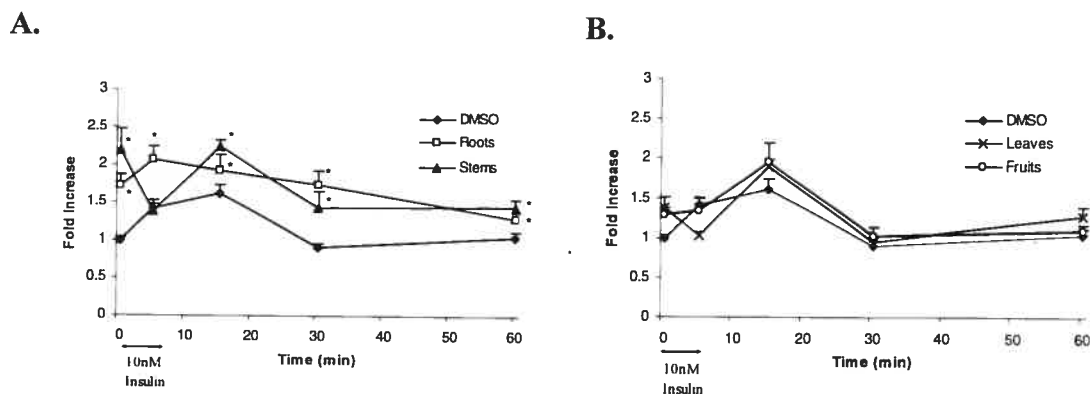
**Figure 4.** Phosphorylation of ERK1/2 MAP kinase in 3T3-L1 after treatment with extracts compared with vehicle. Insulin was added at 10nM for 5min and then removed. Cells were re-incubated with extracts for varying amounts of time before lysis. Data are mean  $\pm$  s.e.mean of n=3.

#### **Effects of *V. angustifolium* extracts on intracellular insulin signaling in HTC cells.**

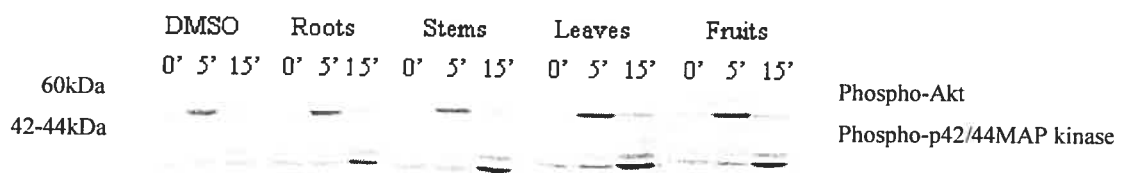
In HTC cells, the extracts behaved differently than observed in myoblasts and adipocytes. In hepatocytes, the extracts did not significantly change the phosphorylation curve of PKB/Akt as compared with the vehicle control (Figure 5). On the other hand, extracts of the roots and stems both significantly increased the activation of ERK1/2 (RM ANOVA,  $p < 0.001$ ,  $n=3$ ; Figure 6A). This effect was most pronounced in basal conditions and at peak activation (15min) of the MAP kinase. The kinase did not appear to be significantly affected by *V. angustifolium* leaf and fruit extracts (Figure 6B).



**Figure 5.** Phosphorylation of PKB/Akt in HTC hepatoma cells after treatment with extracts compared with vehicle. Insulin was added at 10nM for 5min and then removed. Cells were re-incubated with extracts for varying amounts of time before lysis. Data are mean  $\pm$  s.e.mean of n=3.



**Figure 6.** Phosphorylation of ERK1/2 MAP kinase in HTC hepatoma cells after treatment with extracts compared with vehicle. Insulin was added at 10nM for 5min and then removed. Cells were re-incubated with extracts for varying amounts of time before lysis. Data are mean  $\pm$  s.e.mean of n=3, \*p < 0.05.



**Figure 7.** Example of a representative western blot for HTC cells treated with 10nM insulin for 5 min and then removed. The basal (0min) and the peak activation of Akt (5 min) and MAP kinases (15min) are shown. Compared to controls, activation of the effector appears enhanced.

### 2.2.5 Discussion

In a previous survey from our laboratory, *Vaccinium angustifolium* was one of the plant most recommended by traditional practitioner for the treatment of type 2 diabetes<sup>7</sup>. We searched the literature and found that data on biological activity of the plant did not address its antidiabetic potential. Hence, we studied the effects of ethanolic extracts of roots, stems, leaves and fruits of *V. angustifolium* in bio-assays using various insulin-responsive cells.

Our previous work demonstrated that several *V. angustifolium* ethanolic extracts increased basal and insulin-stimulated <sup>3</sup>H-glucose transport in C2C12 skeletal muscle cells and in 3T3-L1 adipocytes<sup>4</sup>. In an attempt to specify the mechanism of action of *V. angustifolium* extracts, we analysed the activation of the insulin signaling cascade in these insulin-sensitive tissues as well as in liver cells modeled by HTC hepatoma cells.

Insulin stimulates two major pathways, the first being the PI3-kinase pathway involving PKB/Akt that leads to glycogen synthesis and glucose uptake, and the second is the MAP kinase pathway, leading to cell growth and survival<sup>10</sup>. In C2C12 myoblasts, the increased levels of phosphorylated PKB/Akt correlated well with the enhanced glucose uptake induced by treatment with the stems, suggesting that this extract could involve an insulinomimetic activity to increase glucose uptake in skeletal muscle. However, the levels of activated ERK1/2 MAP kinase were not found to be significantly affected by the stems, indicating that the two insulin signaling pathways are differentially affected

by the extract. This discrepancy between the effects on PKB/Akt and ERK1/2 tends not to support an insulinomimetic action of the extract, which would be expected to induce increased activation of both pathways. Similarly, the baseline activation of PKB/Akt signaling in the absence of insulin does not favour an insulin-sensitizing mechanism of action. However, *V. angustifolium* stem extract appears to exert an insulin-like effect that is additive to the action of insulin and that can stimulate glucose transport via an increase in PKB/Akt phosphorylation. Our results cannot determine if the stem extract directly activates this pathway or acts on another effector that indirectly affects insulin responses. One such alternative could implicate a phosphatase activity. Moreover, the lack of significant effects of the other extracts on PKB/Akt signaling in the face of stimulated glucose transport (eg. roots) also points to an action on other proteins known to modulate this cellular activity. Potential candidates include AMP-activated kinase (AMPK), the target of metformin, that has been shown to increase glucose uptake in an insulin-independent manner<sup>12</sup>. Another possible target is the downstream effector p38 MAP kinase that has been proposed to activate GLUT transporters by a mechanism yet to be determined<sup>14</sup>. Extracts could also inhibit a protein tyrosine phosphatase such as PTP-1b, which has been implicated in the normal down-regulation of the insulin signalling pathway<sup>1</sup> and in the impaired insulin signaling state encountered in diabetes<sup>9</sup>. Indeed, Xie et al.<sup>15</sup> showed that inhibition of PTP-1b lead to increased PKB/Akt activation, as well as increased glucose transport in CHO cells. Our results are in accordance with these findings, and could account for the mechanism of action of the stem extract.

Experiments using 3T3-L1 adipocytes confirmed the action of the stem on the phosphorylated levels of PKB/Akt. In these cells however, the roots were also effective at stimulating this pathway. The stem and root extracts apparently acted via a mechanism similar to that observed with stems in myoblasts. Namely, they appeared to increase glucose uptake through a baseline effect on phosphorylated PKB/Akt that elevates the phosphorylation response at physiologic insulin concentrations in C2C12 cells. In this cell line, no overall effects were measured on the phosphorylation of ERK1/2 MAP kinases in response to insulin. However, it must be noted that the activation of PI-3 kinase activity, with the ensuing downstream activation of PKB/Akt, is the major signaling pathway previously documented to increase glucose transport in adipose and skeletal muscle tissues.

In HTC liver cells, all four extracts tended to increase basal activation of PKB/Akt, as in other tested cell lines, but this effect did not reach statistical significance. Similarly, peak PKB/Akt phosphorylation appeared to be increased by the stem, leaf and fruit extract of *V. angustifolium* but the remainder of the insulin response pattern was not different from the vehicle control. Interestingly, in this cell line extracts were effective at stimulating the activation of the MAP kinase pathway. Thus, differences in the response pattern of the two major insulin signaling pathways again argue against the insulinomimetic hypothesis. In hepatocytes, insulin does not stimulate glucose transport as in skeletal muscle and adipocytes since insulin-responsive GLUT-4 is not expressed in the liver. On the other hand, insulin triggers metabolic responses, among which glycogen synthesis has been demonstrated to implicate the MAP kinase pathway<sup>3</sup>.



In summary, the present studies clearly demonstrate that an activation of the insulin-responsive PKB/Akt pathway can explain, at least in part, the enhanced glucose transport induced in adipocytes and skeletal muscle cell lines by a treatment with *V. angustifolium* ethanolic stem extract. A similar conclusion can be drawn for the action of the root extract in adipocytes. In liver cells, extracts of roots and stems increased baseline and insulin-stimulated MAP kinase activation known to promote glycogen synthesis. The fact that *V. angustifolium* leaf extract, and to a lesser extent that of the fruit, were effective at enhancing glucose transport in C2C12 and 3T3-L1 cells argues for a pharmacological action at sites other than PKB/Akt or MAP kinase that can mediate insulin-like, insulin-dependent or –independent effects.

In this context, our results do not support an insulino-mimetic or insulin-sensitizing effect in view of the different actions of *V. angustifolium* extracts on the two major insulin signaling pathways and of the presence of an action on baseline activities of these pathways. Nonetheless, *V. angustifolium* biological activities were generally additive in the context of stimulation with physiologic insulin concentrations. Future studies will therefore need to consider other components such as AMP kinase and certain phosphatases known to influence glucose transport. Alternatively, novel yet controversial evidence suggests that GLUT-4 transporters may need to be activated to become fully active<sup>11,14</sup>. Glucose transporters should thus also be considered as additional possible targets of *V. angustifolium* extracts.

In conclusion, the present studies have demonstrated that two major components of the insulin signaling pathway are implicated in the pharmacological action of *V. angustifolium*. The activation of these enzymatic pathways explains, at least in part, the stimulation of glucose transport in skeletal muscle and adipose tissue obtained by treatment with root and stem extracts of *V. angustifolium*. These studies provide novel molecular mechanisms to support the ethnobotanical use of *Vaccinium angustifolium* as an anti-diabetic plant<sup>7</sup>.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the Canadian Diabetes Association. Mrs Couture received graduate summer studentship support from Diabète-Québec. Dr Pierre S. Haddad is a National Research Scholar of the Fonds de Recherche en Santé du Québec.

### 2.2.6 References

1. Asante-Appiah, E. and Kennedy, B. Protein tyrosin phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2003**, 248: E663-E70.
2. Barthel, A. and Schmolz, D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, **2003**, 285: E685-E92.
3. Carlsen, J., Christiansen, K. and Vinten, J. Insulin Stimulated Glycogen Synthesis in Isolated Rat Hepatocytes: Effect of Protein Kinase Inhibitors. *Cellular Signaling*, **1997**, 9: 447-50.
4. Couture, A., et al. In vitro insulin-like, insulin-secretagogue, and cytoprotective activities of the Canadian Blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Unpublished work*, **2005**,
5. Egede, L., et al. The Prevalence and Pattern of Complementary and Alternative Medicine Use in Individuals With Diabetes. *Diabetes*, **2002**, 25: 324-9.
6. Eisenberg, D., et al. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *JAMA*, **1998**, 280: 1569-75.
7. Haddad, P. S., et al. Comparative Study on the Medicinal Plants Most Recommended by Traditional Practitioners in Morocco and Canada. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, **2003**, 10: 25-45.

8. Haddad, P. S., et al. Synergistic activation of mitogen-activated protein kinase by insulin and adenosine triphosphate in liver cells: permissive role of  $\text{Ca}^{2+}$ . *Metabolism*, **2003**, 52: 590-8.
9. Kennedy, B. and Ramachandran, C. Protein Tyrosine Phosphatase-1B in Diabetes. *Biochem Pharmacol*, **2000**, 60: 877-83.
10. Kido, Y., Nakae, J. and Accili, D. The Insulin Receptor and Its Cellular Targets. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **2001**, 86: 972-9.
11. Konrad, D., et al. Need for GLUT4 activation to reach maximum effect of insulin-mediated glucose uptake in brown adipocytes isolated from GLUT4myc-expressing mice. *Diabetes*, **2002**, 51: 2719-26.
12. Musi, N. and Goodyear, L. AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. *Acta Physiol Scand*, **2003**, 178: 337-45.
13. Saltiel, A. R. and Pessin, J. E. Insulin Signaling in Time and Space. *TRENDS in Cell Biology*, **2002**, 12: 65-71.
14. Somwar, R., et al. A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation. *J Biol Chem*, **2002**, 277: 50386-95.
15. Xie, L., et al. Cellular Effects of Small Molecule PTP1B Inhibitors on Insulin Signaling. *Biochemistry*, **2003**, 42: 12972-804.

### 3. DISCUSSION

Dans cette dernière section, nous aborderons en profondeur le potentiel de *V. angustifolium* et ses possibles mécanismes d'action dans le DT2. De nouveaux résultats s'ajouteront aussi à ceux présentés dans les manuscrits, qui compléteront les données préliminaires que notre équipe désirait amasser sur cette plante en particulier. Étant donné le peu de littérature scientifique accessible sur la pharmacologie des plantes, notre travail s'inscrit dans un large processus de documentation des PSN. L'accumulation d'évidences thérapeutiques sur les PSN demeure prioritaire au pays, tant pour protéger la population qui les consomme que pour enrichir notre savoir médical. En effet, une molécule active isolée d'un PSN possède le potentiel de devenir un médicament d'ordonnance dans quelques années.

#### 3.1 Préparation des extraits

L'extraction des racines, tiges, feuilles et fruits a été réalisée à l'Université d'Ottawa dans le laboratoire de notre collaborateur le Dr John Thor Arnason. L'éthanol a été choisi comme solvant en fonction du large spectre de molécules qu'il peut extraire. Ne sachant pas quel est le principe actif de la plante, nous ne pouvions risquer de perdre l'activité en raison d'un solvant trop ou pas assez polaire. Nous avons choisi d'extraire séparément les quatre parties de la plante pour déterminer lesquelles sont actives et poursuivre l'étude avec celles-ci seulement. De plus, les répondants à notre sondage sur les PSN ont parfois précisé la partie de *V. angustifolium* qu'ils recommandent, et les

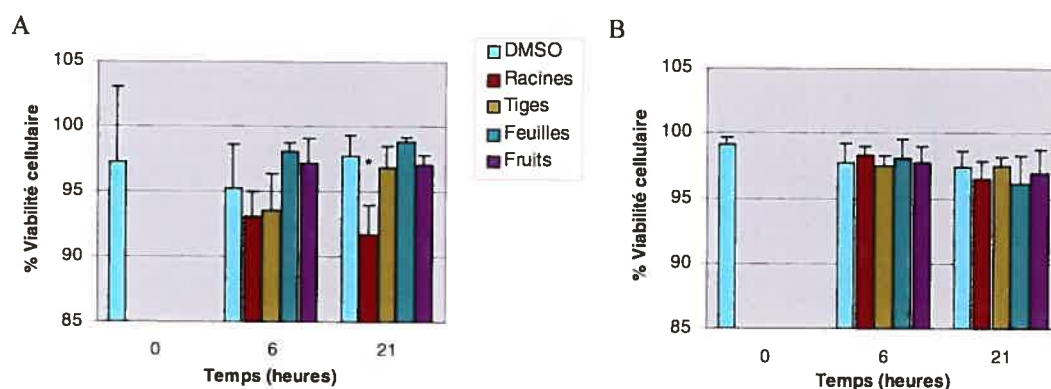
racines comme les feuilles ont été mentionnées. Ainsi, nous avons évalué séparément les racines, les tiges, les feuilles et les fruits, ce qui facilitera le processus d'identification du (des) principe(s) actif(s).

### 3.2 Innocuité de *V. angustifolium*

Pour le moment, aucun effet secondaire n'a été rapporté suite à la consommation de ce PSN actuellement en vente libre. Il est vrai que la surveillance autour des PSN demeure beaucoup moins importante que pour les médicaments d'ordonnance, et les patients ne savent pas toujours quel organisme aviser en cas de réactions adverses. Par contre, *V. angustifolium* possède une tradition qui la positionne en tant que GRAS (*generally regarded as safe*) au niveau de la FDA américaine. De plus, elle possède une composante nutritionnelle puisque son fruit est un aliment largement consommé.

Dans nos bio-essais, nous avons commencé par déterminer une dose non toxique d'extraits chez les cellules HTC (hépatome de rat). Puisqu'il est très complexe de traduire une concentration *in vitro* en dose *in vivo*, nous avons tout d'abord déterminé la solubilité maximale de nos extraits. Le meilleur solvant s'est révélé le DMSO, surclassant l'eau et l'éthanol. Les extraits se solubilisèrent tous à environ 25g/L au maximum dans le DMSO. Afin d'éviter un effet du solvant lui-même dans nos bio-essais, nous avons établi à 0,1% la concentration maximale du DMSO dans les milieux de culture. Ainsi, la quantité maximale d'extraits que nous pouvions utiliser était de 25mg/L (25g/L x 0,1%). Cependant, cette dose s'est révélée légèrement mais signifi-

cativement (5%,  $p < 0.05$ ) toxique pour l'extrait des racines (Figure 5A). Nous avons donc employé la moitié de cette dose, soit 12.5mg/L, qui n'entraînait aucune toxicité (Figure 5B), dans les bio-essais subséquents. Nous nous assurons ainsi que des mécanismes d'apoptose ou de nécrose n'interagissaient pas avec la mesure de la réponse à l'insuline.

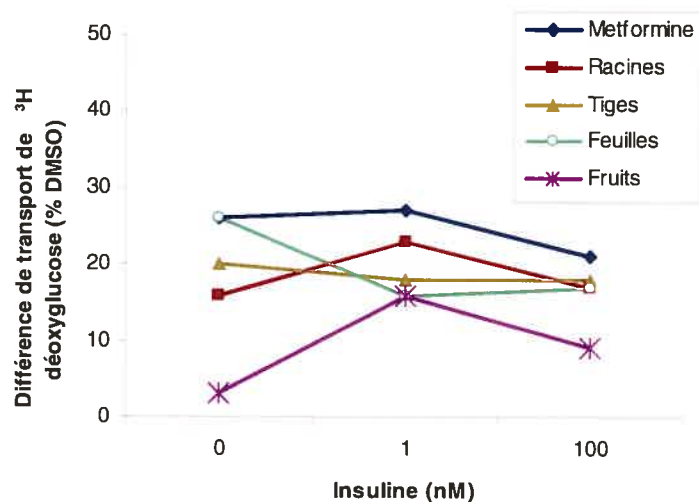


**Figure 5.** Viabilité des cellules HTC exposées à 25mg/L (A) ou 12,5mg/L (B) d'extraits éthanoliques de *V. angustifolium* pendant 6 ou 21 heures. Ces résultats ont été obtenus par tests d'exclusion au Bleu de Trypan. (n=3), \*  $p < 0.05$ .

### 3.3 Transport de glucose

Tel que mentionné dans la section 1.1.1, les muscles squelettiques et les adipocytes possèdent des vésicules de GLUT-4 intracellulaires qui transloquent à la membrane en réponse à l'insuline. Nous avons regardé l'effet de nos extraits sur ce transport de glucose. Chez les C2C12, le transport n'est pas modifié par la présence aiguë des extraits, soit pendant une heure d'exposition seulement. Une incubation plus longue (20h) augmente toutefois le transport en absence et en présence d'insuline.

Ce résultat démontre que les extraits demandent un certain temps pour exercer leur action sur ce tissu. Il est donc possible que le mécanisme d'action implique un changement dans l'expression des gènes de la cellule. Fait intéressant, les extraits semblent posséder une action indépendante de l'insuline, en raison de leur effet sur le transport basal de glucose. De plus, cet effet ne diminue pas avec des doses élevées d'insuline. L'absence de phénomène de saturation indique que l'effet observé chez les C2C12 serait davantage insulino-indépendant qu'insulino-mimétique. De plus, les extraits ont un effet additif avec l'insuline. Comme le montre la figure suivante (Figure 6), l'augmentation du transport basal par les extraits demeure inchangée lorsque l'insuline est présente. En soustrayant l'effet de l'insuline sur le transport de glucose, la même augmentation qu'en condition basale est retrouvée.



**Figure 6.** Augmentation du transport de  $^3\text{H}$ -glucose apporté par les extraits seulement, l'effet de l'insuline ayant été retirée, chez les myoblastes C2C12. (Pourcentage du transport avec extrait (dose d'insuline X) – DMSO à la dose X d'insuline).



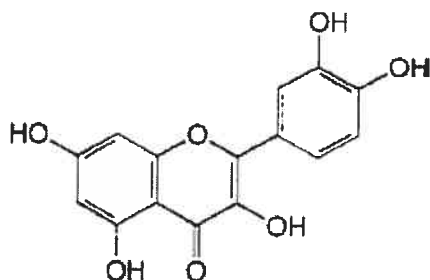
Cet effet des extraits reste, comme le montre la Figure 6, semblable à celui de la metformine, considérée comme un agent sensibilisateur, quoique légèrement plus faible. Cependant, l'action de la metformine est indépendante de l'insuline et se situe au niveau de l'AMPK. Il s'agit en réalité d'un effet tonique sur le transport basal qui s'ajoute à l'action de l'insuline lorsque celle-ci est présente. Étant donné la ressemblance dans cette observation particulière, les futures études sur nos extraits devraient vérifier s'ils agissent sur l'AMPK. De plus, la concentration de metformine a été fixée à 400 $\mu$ M dans les bio-essais, soit 50mg/L, alors que les concentrations d'extraits atteignaient seulement 12,5mg/L. Si nos extraits agissent sur la même cible, cette différence de concentrations pourrait expliquer la plus faible augmentation du transport avec nos extraits par rapport à la metformine.

L'effet potentialisateur de *V. angustifolium* sur le transport de glucose musculaire est prometteur pour une éventuelle application chez l'humain. Le muscle étant responsable d'une large part de l'absorption de glucose sanguin post-prandial, une augmentation de ce transport chez l'homme contribuerait à abaisser plus efficacement la glycémie. De plus, chez un diabétique de type 2, cette action pourrait contrer la résistance à l'insuline des muscles, qui se traduit par une diminution du transport de glucose. L'augmentation du transport de glucose tonique, soit en l'absence d'insuline, est aussi intéressante car la glycémie des diabétiques demeure élevée entre les repas. Évidemment, les études cliniques devront éventuellement être effectuées, mais cette observation *in vitro* sur le transport de glucose indique que des études *in vivo* chez l'animal seraient souhaitables.

Les mêmes études de transport de glucose ont été réalisées sur les adipocytes de souris 3T3-L1, qui possèdent aussi des vésicules du GLUT-4 sensibles à l'insuline. Dans ces cellules, une heure d'incubation avec les extraits s'est révélée suffisante pour augmenter le transport de glucose, tandis qu'une augmentation de la réponse n'est pas présente à 100nM d'insuline, suggérant une saturation de l'action des racines et des tiges. Clairement, le mécanisme d'action des extraits varie selon le type cellulaire testé. Par ailleurs, lors d'une incubation de 21h avec les extraits, les feuilles ont inhibé le transport de glucose adipeux, alors qu'un effet inverse était observé sur le muscle. Au niveau clinique, cette inhibition pourrait se révéler intéressante car une augmentation du glucose intracellulaire dans les adipocytes conduit à une augmentation des triglycérides emmagasinés, et ultimement à une prise de poids. La très grande majorité des diabétiques de type 2 présentant déjà une surcharge pondérale, il serait bienfaisant d'éviter une prise de poids supplémentaire due au traitement. Ce phénomène est d'ailleurs observé avec les thiazolidinediones (section 1.4.3).

Toutefois, une hypothèse peut être avancée pour expliquer le comportement de l'extrait des feuilles. La détermination par HPLC de la composition de cet extrait révèle la présence de quercétine, une molécule étudiée comme antioxydant et connue pour son effet inhibiteur sur le transport de glucose des adipocytes<sup>47</sup>. Cette étude a démontré l'absence d'effets sur la phosphorylation des IRS et une phosphorylation en tyrosine normale dans la voie de signalisation de l'insuline, suggérant une action directe sur le transporteur GLUT-4. En accord avec ces résultats, nous n'avons observé aucun effet

sur la signalisation intracellulaire des adipocytes malgré une inhibition du transport de glucose.



**Figure 7.** Molécule de Quercétine. Tiré de Rosenberg-Zand et al.<sup>35</sup>

Une seconde étude par Yoshizumi et coll.<sup>53</sup> sur des cellules musculaires lisses de l'aorte vient confirmer nos observations avec l'extrait des feuilles sur la signalisation dans les myoblastes C2C12. Ces auteurs ont démontré une inhibition par la quercétine de l'activation de la PI-3 kinase et des MAP kinases en réponse à l'angiotensine II. Nos résultats montrent aussi cette tendance sur les deux kinases dans les C2C12, en réponse à l'insuline cette fois. Le même mécanisme d'action pourrait être proposé pour expliquer ce phénomène. Cependant, les feuilles ont augmenté le transport de glucose dans ce type cellulaire malgré l'inhibition de la signalisation. Nos bio-essais ne nous permettent pas d'établir le mécanisme d'action de l'extrait menant à ces observations, mais des indications complémentaires sont apportées par Lee et coll.<sup>28</sup> Cette équipe a démontré que la kinase JNK (c-Jun N-terminal kinase), était activée par l'insuline et induisait une rétro-inhibition du signal par phosphorylant en position Ser307 des IRS. En inhibant spécifiquement JNK, le transport de glucose était augmenté. Or, la quercétine a inhibé l'activation de JNK dans l'étude de Yoshizumi en réponse à l'angiotensine. Jusqu'à

maintenant, il s'agit d'une hypothèse plausible quant au mécanisme d'action de l'extrait des feuilles, dont les activités sont en apparence contradictoires.

#### 3.4 Signalisation intracellulaire et mécanisme(s) d'action

Au niveau de la signalisation intracellulaire du récepteur à l'insuline, la voie de la PI3 kinase est la plus étroitement associée au transport de glucose dans les myocytes. L'absence d'effets sur la PKB/Akt (qui se situe en aval de la PI-3 kinase) avec les racines, les feuilles et les fruits suggère l'emprunt d'une voie alternative, comme l'AMPK, ou un effet en aval de cet effecteur, comme JNK ou la p38 MAP kinase, pour augmenter le transport de glucose. L'activation de l'AMPK par l'AICAR entraîne un effet additif avec l'insuline sur le transport de glucose<sup>31</sup>. De plus, la phosphorylation en PKB/Akt n'est pas modifiée par l'AICAR puisqu'il agit sur une voie de signalisation alternative. Ces observations correspondent à ce que nous avons obtenu avec les racines, les feuilles et les fruits sur les C2C12. Cependant, les effets précis de l'AMPK ne sont pas tous connus et certaines études démontrent un effet insulino-sensibilisateur que nous ne retrouvons pas dans nos bio-essais<sup>16</sup>, même pour la metformine. L'AMPK active la p38 MAP kinase, qui est aussi sujette à activation par l'insuline. La p38 MAPK serait impliquée dans un processus d'activation des transporteurs de glucose. Bien que controversées, certaines études laissent présager que la translocation à la membrane des GLUT-4 n'est pas suffisante pour leur conférer une pleine activité. La p38 MAPK a été identifiée comme potentielle activatrice des GLUT-4, une action aussi dirigée vers les transporteurs GLUT-1. Nos extraits pourraient stimuler cette MAP kinase et induire une plus grande activité des transporteurs GLUT-4 et GLUT-1, ces

derniers étant constamment situés à la membrane cytoplasmique et responsables d'une grande partie du transport basal de glucose. Dans les études de Geiger et coll.<sup>17</sup>, une augmentation de la sensibilité à l'insuline a aussi été documentée avec l'activation de la p38 MAPK et correspondrait au mécanisme d'action attribué à la metformine sur l'AMPK en amont. Les extraits des racines, des feuilles et des fruits pourraient agir sur ces effecteurs pour augmenter le transport de glucose sans modifier l'activation de la voie PI3 kinase.

Les extraits des racines et des fruits pourraient aussi inhiber la JNK, comme la quercétine présente dans l'extrait des feuilles. Cependant, la quercétine est absente de ces deux extraits, et d'ailleurs aucune inhibition du transport dans les adipocytes n'a été observée. Dans ce cas, l'inhibition de cette kinase pourrait être induite par d'autres composantes présentes dans les extraits, qui empêcheraient alors la rétro-inhibition du signal de l'insuline<sup>28,32</sup>.

Il est aussi possible que nos extraits aient augmenté le transport de glucose musculaire suite à une augmentation de la synthèse de protéines comme les transporteurs GLUT-1 ou GLUT-4. En effet, il a fallu une incubation de 20h avec les extraits pour observer un effet sur le transport de glucose, alors qu'une incubation de 1h n'était pas suffisante. Chez les 3T3-L1, le mécanisme d'action des extraits semble différent car une augmentation du transport a été observée avec les racines et les tiges après 1h d'incubation.

Parallèlement à un effet sur la signalisation du récepteur à l'insuline, nos extraits pourraient moduler l'activité d'une enzyme impliquée dans le métabolisme du glucose (glycolyse, synthèse de lipides ou de glycogène). Une activation de l'hexokinase, de la 6-phospho-fructokinase, de la GS comme une inhibition de la glucose 6-phosphatase ou de la GSK-3 demeurent toutes de potentiels mécanismes d'action de nos extraits.

L'extrait des tiges semble avoir augmenté le transport de glucose via une activation par phosphorylation de la PKB/Akt chez les C2C12 et les 3T3-L1. Il serait facile de conclure à un effet insulino-mimétique, mais tel que mentionné dans la section 3.3 (voir p.77), une saturation serait alors observée aux doses élevées d'insuline, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. D'autres mécanismes entrent probablement en jeu comme pour les autres extraits. Par exemple, l'inhibition d'une phosphatase telle que PTP-1b, SHP2 ou PTEN, qui ont toutes été impliquées dans l'arrêt de la signalisation du récepteur à l'insuline,<sup>11,54</sup> pourrait constituer le mécanisme d'action des tiges. Leur inhibition *in vitro* a provoqué une activation de la PKB/Akt et du transport de glucose en absence et en présence d'insuline<sup>51</sup>. Davantage de données sont requises pour confirmer ce mécanisme d'action potentiel et préciser s'il provient d'une inhibition directe de la phosphatase, d'un effet sur sa transcription ou sur la traduction de son ARN messenger.

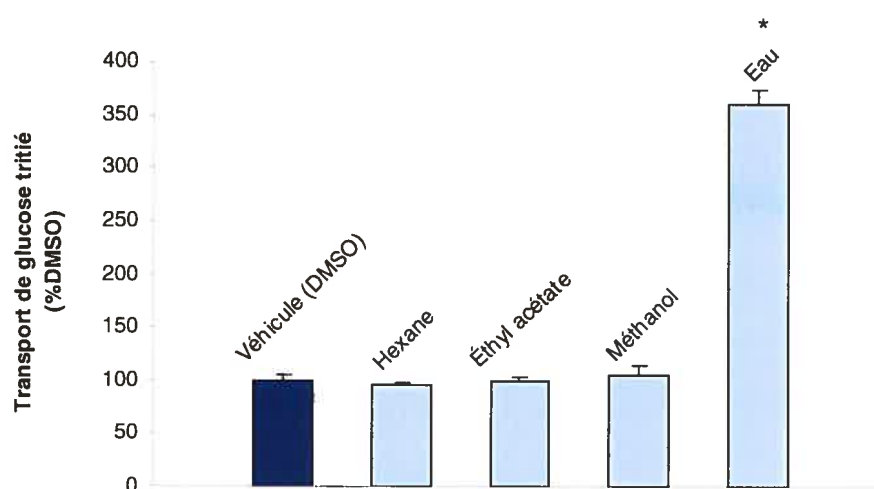
Les médicaments étant des molécules purifiées, la détermination de leur mécanisme d'action demeure relativement simple en comparaison aux extraits

éthanoliques utilisés dans nos bio-essais. En effet, une grande quantité de molécules potentiellement actives s'y retrouvent et peuvent agir de façon indépendante, additive ou synergique pour exercer une activité biologique. Les différences dans les réponses cellulaires entre les myoblastes C2C12 et les adipocytes 3T3-L1 laissent présager que plusieurs principes actifs sont présents dans nos extraits et/ou sujets à des régulations cellulaires spécifiques. La complexité des extraits peut être simplifiée par leur sous-fractionnement. Cela aidera à mieux cerner la ou les molécules actives, voire de les isoler et de les identifier.

### 3.5 Sous-fractionnement des tiges

Afin de préciser davantage le principe actif de nos extraits, nous avons débuté le sous-fractionnement de l'extrait des tiges, qui possède une bonne activité tant sur le transport de glucose des muscles et des adipocytes que sur la signalisation intracellulaire. Quatre solvants ont été employés pour caractériser l'extrait éthanolique des tiges, soit en ordre croissant de polarité : l'hexane, l'éthyl acétate, le méthanol et l'eau. Ses sous-fractions ont ensuite été testées pour leurs effets sur le transport de glucose des adipocytes. Afin de reproduire la concentration de chacun des composés dans l'extrait éthanolique d'origine, nous avons ajusté les doses des sous-fractions selon le rendement total obtenu suite au processus de sous-fractionnement. Les sous-fractions ont été re-solubilisées dans le véhicule d'origine, soit le DMSO. Ainsi, nous avons utilisé des concentrations finales de 0,8, 1,2, 9,3 et 1,2 mg/L des sous-fractions d'hexane, d'éthyl

acétate, de méthanol et d'eau respectivement. Suite à une incubation de 20h avec ces doses, l'activité de l'extrait des tiges sur le transport basal de glucose s'est retrouvée exclusivement dans la fraction aqueuse (Figure 8). Lors des prochaines étapes de caractérisation de cet extrait, nous nous pencherons donc sur cette fraction aqueuse pour en déterminer le précieux principe actif.



**Figure 8.** Transport basal de  $^3\text{H}$ -déoxyglucose dans les cellules 3T3-L1 incubées 16-20h avec les sous-fractions de l'extrait éthanolique des tiges. Résultats exprimés en pourcentage du véhicule  $\pm$  SEM (n=4). \*  $p < 0.05$ .



### 3.6 Sécrétion d'insuline

Dans les sections précédentes, nous avons discuté de l'effet des extraits sur la réponse à l'insuline. Il convient toutefois de s'attarder sur la sécrétion de l'hormone elle-même, via les cellules  $\beta$ -pancréatiques INS832/13. Tel que démontré dans le manuscrit, les feuilles et les fruits ont augmenté la sécrétion d'insuline à des concentrations de glucose *in vitro* (11mM) correspondant à une hyperglycémie.

La quercétine pourrait être le principe actif dans l'extrait des feuilles agissant sur ce type cellulaire. Quant à l'extrait des fruits, son ingrédient actif demeure inconnu à ce jour. Ces résultats nous apparaissent très prometteurs en raison de leur dépendance au glucose. Aucun effet n'a été observé en concentration physiologique de glucose; il faut atteindre des conditions hyperglycémiques (11mM de glucose *in vitro*) pour observer l'augmentation de la sécrétion d'insuline. Ce résultat nous permet d'espérer que les extraits de *V. angustifolium* n'augmenteront la sécrétion d'insuline des diabétiques qu'en cas d'hyperglycémie. D'une part, ceci diminue les risques d'hypoglycémie, et d'autre part minimise la demande d'insuline auprès des cellules  $\beta$ , en ne stimulant pas continuellement sa sécrétion.

De plus, il est intéressant de noter que nos extraits semblent complémentaires. L'activité sur les tissus insulino-sensibles est plus grande avec les racines et les tiges, alors que l'activité insulino-trope se situe chez les feuilles et les fruits. Nous avons séparé les quatre parties de la plante pour déterminer laquelle était active, mais nous

avons découvert que chacune pouvait exercer un effet bénéfique sur l'action de l'insuline. En résumé, un extrait de la plante entière pourrait aussi se révéler intéressant *in vivo*, puisqu'il renfermerait autant l'action insulino trope que l'effet sur la réponse à l'insuline.

Transport de glucose :	<b>Tiges <math>\cong</math> Racines</b> >> Feuilles > Fruits
Sécrétion d'insuline :	<b>Feuilles <math>\cong</math> Fruits</b> >> Tiges $\cong$ Racines

**Tableau IV** : Efficacité des extraits de *V. angustifolium* selon les bio-essais *in vitro* réalisés sur les C2C12 et les INS832/13, témoignant respectivement de l'action de l'insuline et de la sécrétion de l'endohormone.

### 3.7 Perspectives futures

#### 3.7.1 Études *in vitro*

Afin de mieux cerner le mécanisme d'action des extraits, plusieurs expérimentations restent à faire sur les lignées cellulaires *in vitro*. Tout d'abord, il serait intéressant de regarder la synthèse de glycogène chez les cellules hépatiques HTC, afin de se doter d'une mesure physiologique sur ce tissu. De même, dans les adipocytes, la lipolyse pourrait être inhibée par nos extraits, ce qui contribuerait grandement à réduire la résistance à l'insuline *in vivo* chez un éventuel patient (voir section 1.3.1, p.13). Une

alternative demeurerait de regarder la consommation de glucose par les cellules en réponse à l'insuline. Les hépatocytes représentent quant à eux un site de production de glucose important pour le maintien de la glycémie entre les repas. Nous pourrions compléter nos études sur ce tissu en regardant cette production de glucose en réponse au glucagon et son inhibition par l'insuline.

Des mesures d'activité enzymatique se révéleraient intéressantes pour vérifier l'état des diverses voies métaboliques du glucose. Nous pourrions regarder, au moyen de glucose marqué, l'activité glycolytique intracellulaire suite à une incubation avec les extraits et en réponse à l'insuline, qui active aussi cette voie.

En ce qui concerne le mécanisme d'action moléculaire des extraits, il conviendrait d'étudier l'activation de diverses kinases par immunobuvardage, comme l'AMPK, la p38 MAP kinase ou JNK. Si un effet inhibiteur est observé avec JNK, une mesure de la phosphorylation en sérine 307 des IRS (qui devrait être diminuée) viendrait confirmer ce mécanisme. De même, le SB202190 et le SB203580 inhibent la p38 MAPK et pourraient confirmer une action sur l'activité de l'AMPK ou de la p38 MAPK. Si d'autres mécanismes d'action étaient présents en plus de celui sur l'AMPK et/ou la p38 MAPK, l'incubation avec l'inhibiteur ne suffirait pas à bloquer entièrement l'effet des extraits sur le transport de glucose. Des études au  $^{32}\text{P}$  pourraient déterminer si l'inhibition d'une phosphatase est impliquée dans le mécanisme d'action de la plante. Certaines phosphatases doivent aussi être phosphorylées pour devenir actives, ce qui pourrait être vérifié par immunobuvardage.

Pour déterminer si nos extraits modifient la synthèse de protéines, une incubation simultanée avec les extraits et un inhibiteur de la synthèse protéique comme la cycloheximide pourrait répondre à cette question. Nous devrions observer une diminution du transport de glucose avec la cycloheximide par rapport à une incubation avec extrait seulement. Une analyse par immunobuvardage pourrait finalement préciser si l'effet provient d'une synthèse des transporteurs GLUT-1 et/ou GLUT-4.

Il serait aussi intéressant de vérifier l'effet d'un inhibiteur de la PI3-kinase telle la wortmannin ou le LY294002 sur le transport de glucose avec l'extrait des tiges, afin de déterminer si l'action de cet extrait provient effectivement de l'activation de cette voie de signalisation. Il est possible que d'autres mécanismes entrent en jeu avec cet extrait, qui a démontré la plus grande efficacité sur le transport de glucose musculaire et adipeux.

Finalement, des études ont été entreprises récemment pour déterminer l'effet des extraits sur la liaison extracellulaire de l'insuline à son récepteur. Nous pourrions aussi analyser l'activité tyrosine kinase du récepteur suite à une incubation avec les tiges. Cependant, un élément essentiel de nos recherches demeure la confirmation que les activités *in vitro* se retrouvent aussi dans un modèle *in vivo*.

### 3.7.2 Études *in vivo*

Ce volet d'étude viendra compléter les premières observations décrites dans ce mémoire et ouvrir la voie aux études cliniques proprement dites. Le choix du modèle animal sera un élément clé pour ce second volet. En effet, des modèles génétiques de résistance à l'insuline sont disponibles, ce qui nous permettraient de vérifier l'efficacité de nos extraits dans un contexte de résistance à l'insuline. Des modèles de diabète induit existent, qui imitent un diabète de type 1 (streptozotocine), ou une intolérance au glucose (streptozotocine et nicotinamide). Finalement, des modèles de résistance induite par la diète sont envisageables, étant plus comparables au développement de la maladie humaine.

Les modèles génétiques ont comme principal inconvénient une résistance à l'insuline dès la naissance, ce qui ne permet pas d'imiter la situation chez l'homme, où la résistance à l'insuline se développe au fil du temps. Entre autres, les rats Zuckers, (fa/fa) et les souris ob/ob, db/db, sont bien décrits dans la littérature scientifique et présentent diverses tares génétiques que nous pourrions exploiter.

Au premier coup d'oeil, un modèle de diabète à la streptozotocine semble moins intéressant pour nos extraits. Puisqu'il s'agit d'un diabète de type 1 avec destruction des cellules  $\beta$ -pancréatiques, nous ne pourrions apprécier l'activité des feuilles et des fruits sur la sécrétion d'insuline dans ce modèle. Cependant, l'action insulino-indépendante des extraits des tiges et des racines sur les tissus périphériques pourrait être isolée et

quantifiée sans interaction avec l'insuline. Comme nos extraits ont eu un effet sur le transport basal de glucose, nous devrions observer une baisse de la glycémie de ces animaux, en considérant que le principe actif est biodisponible.

L'utilisation de plusieurs modèles devrait nous permettre de vérifier l'action des extraits sur la résistance à l'insuline périphérique de même que la sécrétion d'insuline pancréatique. Nous planifions mesurer, au moyen de clamp euglycémique et hyperinsulinémique, la tolérance au glucose et à l'insuline des animaux traités par rapport aux témoins. De plus, un effet sur la consommation de nourriture et/ou le poids corporel est possible. Il faudra contrôler la quantité de nourriture consommée et le poids des animaux tout au long du traitement. Finalement, au moment du sacrifice, il serait intéressant d'isoler les hépatocytes des animaux par perfusion à la collagénase, de même que prélever des échantillons des muscles squelettiques et du tissu adipeux. Ces cellules seront par la suite analysées par immunobuvardage pour mesurer leur réponse à l'insuline et leur quantité en protéines impliquées dans le transport de glucose. Nous pourrons alors faire un parallèle avec les études *in vitro* et mieux cerner le mécanisme d'action des extrait de bleuet.

#### 4. CONCLUSION

Cette étude *in vitro* consiste en un premier pas vers la détermination de l'efficacité d'un PSN, le bleuet canadien *Vaccinium angustifolium*, actuellement en vente libre et probablement utilisé par un bon nombre de Québécois diabétiques. Ces données contribuent au développement d'un traitement complémentaire pour le DT2, où une maîtrise efficace de la glycémie reste encore à atteindre. Sur les tablettes, les extraits de bleuet sont souvent préparés à base de racines. Nos résultats confirment ce choix et démontrent que les tiges, les feuilles et les fruits sont tout aussi intéressants.

Notre étude sur ce PSN répond à un besoin des patients, que les approches naturelles attirent de plus en plus. Il s'agit aussi d'un début de réponse aux professionnels de la santé, qui désirent en connaître l'efficacité réelle, l'innocuité et les interactions potentielles avec les traitements prescrits.

Finalement, nos résultats sont prometteurs même s'il reste encore beaucoup à accomplir pour confirmer les bienfaits d'un tel PSN chez l'homme. Néanmoins, nous entrons dans une vaste campagne pour l'étude des nombreux PSN, vendus trop souvent sans évidence scientifique suffisante pour les maladies qu'ils adressent. Santé Canada a finalement entendu l'appel de la population, tant professionnelle (médecins, pharmaciens, chercheurs) que générale (patients, consommateurs), et ouvert la voie à la recherche scientifique dans ce domaine, qui existe depuis les premiers balbutiements de la médecine humaine.

## 5. RÉFÉRENCES

1. ADA. Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, **2004**, 27: S88-S90.
2. Anjaneyulu, M. and Chopra, K. Quercetin, an anti-oxidant bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **2004**, 31: 244-8.
3. Arner, P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, **2003**, 14: 137-44.
4. Ashcroft, F. M. and Ashcroft, S. J. H., Insulin - Molecular Biology to Pathology. *Oxford University Press*, **1992**: 421p.
5. Bailey, C. J. Insulin Resistance and Antidiabetic Drugs. *Biochemical Pharmacology*, **1999**, 58: 1511-20.
6. Bajaj, M. and DeFronzo, R. A. Metabolic and molecular basis of insulin resistance. *Journal of Nuclear Cardiology*, **2003**, 10: 311-23.
7. Bevan, P. Insulin signalling. *Journal of Cell Science*, **2001**, 114(pt8): 1429-30.
8. Broca, C., et al. 4-Hydroxyisoleucine: Experimental Evidence of its Insulinotropic and Antidiabetic Properties. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, **1999**, 277: E617-E23.
9. Broca, C., et al. The Insulinotropic Agent ID1101 (4-hydroxyisoleucine) Activates Insulin Signaling in Rat. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, **2004**, 287: E463-71.



10. Cheng, A. and Fantus, I. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ*, **2005**, 172: 213-26.
11. Clément, S., et al. The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature*, **2001**, 409: 92-6.
12. Cohen-Coulakia, F., et al. In Vivo Sequential Study of the Muscle Capillary Permeability in Diabetic Rats: Effet of Anthocyanosides. *Metabolism*, **2000**, 49: 880-5.
13. Couture, A., et al. In vitro insulin-like, insulin-secretagogue, and cytoprotective activities of the Canadian Blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Unpublished work*, **2005**.
14. Egede, L. E., et al. The Prevalence and Pattern of Complementary and Alternative Medicine Use in Individuals with Diabetes. *Diabetes Care*, **2002**, 25: 324-9.
15. Eisenberg, E., et al. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997. *JAMA*, **1998**, 280: 1569-75.
16. Fisher, J., et al. Activation of AMP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2002**, 282: E18-E23.
17. Geiger, P., et al. Activation of p38 MAP kinase Enhances Insulin Sensitivity of Muscle Glucose Transport to Insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **December 2004**, Epub ahead of press: 30p.
18. Haddad, P. S., et al. Comparative Study on the Medicinal Plants Most Recommended by Traditional Practitioners in Morroco and Canada. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, **2003**, 10: 25-45.

19. Harrigan, R. A., Nathan, M. S. and Beattie, P. Oral agents for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: Pharmacology, Toxicity and Treatment. *Annals of Emergency Medicine*, **2001**, 38: 68-78.
20. Hermann, L., Nilsson, B. and Wettre, S. Vitamin B12 Status of Patients Treated With Metformin: A Cross-Sectional Cohort Study. *Br J Diabetes Vasc Dis*, **2004**, 4: 401-6.
21. Hundal, R. S. and Inzucchi, S. E. Metformin: New Understandings, New uses. *Drugs*, **2003**, 63: 1879-94.
22. Katsube, N., et al. Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the Anthocyanins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2003**, 51: 68-75.
23. Kay, C. D. and Holub, B. J. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on post-prandial serum antioxidant status in human subjects. *British Journal of Nutrition*, **2002**, 88: 389-97.
24. Kirpichnikov, D., McFarlane, S. I. and Sowers, J. R. Metformin: An Update. *Annals of Internal Medicine*, **2002**, 137: E25-E33.
25. Klein, S., et al. Weight Management through lifestyle modification for the prevention and management of type 2 diabetes: rationale and strategies. A statement of the American Diabetes Association, the North American Association for the Study of Obesity, and the American Society for Clinical Nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2004**, 80: 257-63.

26. Laplaud, P., Lelubre, A. and Chapman, M. Antioxidant action of Vaccinium myrtillus extract on human low density lipoproteins in vitro: initial observations. *Fundamental Clinics of Pharmacology*, **1997**, 11: 35-40.
27. Lebovitz, H. E. and Baerji, M. A. Treatment of insulin resistance in diabetes mellitus. *European Journal of Pharmacology*, **2004**, 490: 135-46.
28. Lee, Y., et al. c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Mediates Feedback Inhibition of the Insulin Signaling Cascade. *J Biol Chem*, **2003**, 278: 2896-902.
29. Lizcano, J. M. and Alessi, D. R. The insulin signalling pathway. *Current Biology*, **2002**, 12: R236-R8.
30. Miller, L. G. Herbal Medicinals. *Archives of International Medicine*, **1998**, 158: 2200-11.
31. Musi, N. and Goodyear, L. AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. *Acta Physiol Scand*, **2003**, 178: 337-45.
32. Nakatani, Y., et al. Modulation of the JNK Pathway in Liver Affects Insulin Resistance Status. *J Biol Chem*, **2004**, 279: 45803-9.
33. Ohinmaa, A., et al. The Projection of Prevalence and Cost of Diabetes in Canada: 2000 to 2016. *Canadian Journal of Diabetes*, **2004**, 28: 116-23.
34. Rang, H. P., Dale, M. M. and Ritter, J. M., Pharmacology. *Churchill-Livingston*, **1999**: p.385-98.

35. Rosenberg-Zand, R., Jenkins, D. and Diamandis, E. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Research and Treatment*, **2000**, 62: 35-49.
36. Saltiel, A. and Khan, R. Insulin Signalling and the Regulation of Glucose and Lipid Metabolism. *Nature*, **2001**, 414: 799-806.
37. Satué-Garcia, T., Heinonen, M. and Frankel, E. Anthocyanins as antioxidants on human low-density liposome systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1997**, 45: 3362-7.
38. Scheen, A. J. Pathophysiology of insulin secretion. *Annals of Endocrinology*, **2004**, 65: 29-36.
39. Shulman, G. I. Unraveling the Cellular Mechanism of Insulin Resistance in Humans: New Insights from Magnetic Resonance Spectroscopy. *Physiology*, **2004**, 19: 183-90.
40. Simmons, Z. and Feldman, E. L. Update on diabetic neuropathy. *Current Opinion in Neurology*, **2002**, 15: 595-603.
41. Simpson, R. W., Shaw, J. E. and Zimmet, P. Z. The prevention of type 2 diabetes - lifestyle change or pharmacotherapy? A challenge for the 21st century. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **2003**, 59: 165-80.
42. Singh, N., Armstrong, D. and Lipsky, B. Preventing Foot Ulcers in Patients With Diabetes. *JAMA*, **2005**, 293: 217-28.
43. Singh, R., et al. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, **2001**, 44: 129-46.

44. Skyler, J. S. Diabetes Mellitus: Pathogenesis and Treatment Strategies. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2004**, 47: 4113-7.
45. Stickel, F., et al. Hepatitis induced by Kava (*Piper methysticum rhizoma*). *Journal of Hepatology*, **2003**, 39: 62-7.
46. Stitt, A. W. The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Experimental and Molecular Pathology*, **2003**, 75: 95-108.
47. Strobel, P., et al. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Biochemical Journal*, **2004**, Immediate publication: Epub ahead of print.
48. van Dijk, C. and Berl, T. Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, **2004**, 5: 237-48.
49. Winer, N. and Sowers, J. R. Epidemiology of Diabetes. *Journal of Clinical Pharmacology*, **2004**, 44: 394-405.
50. Winslow, L. C. and Kroll, D. J. Herbs as Medicines. *Archives of International Medicine*, **1998**, 158: 2192-9.
51. Xie, L., et al. Cellular Effects of Small Molecule PTP1B Inhibitors on Insulin Signaling. *Biochemistry*, **2003**, 42: 12792-804.
52. Yeh, G. Y., et al. Systematic Review of Herbs and Dietary Supplements for Glycemic Control in Diabetes. *Diabetes Care*, **2003**, 26: 1277-94.

53. Yoshizumi, M., et al. Quercetin inhibits Shc- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated c-Jun N-terminal kinase activation by angiotensin II in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, **2001**, 60: 656-65.
54. Zhang, S., et al. Receptor-Specific Regulation of Phosphatidylinositol 3'-Kinase Activation by the Protein Tyrosine Phosphatase Shp2. *Mol Cell Biol*, **2002**, 22: 4062-72.
55. Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M. and Shaw, J. Global and Societal Implications of the Diabetic Epidemic. *Nature*, **2001**, 414: 782-7.



Digitized by Google