

Université de Montréal

**Études *in vivo* et *in vitro* sur le potentiel néphroprotecteur
de plantes médicinales anti-diabétiques de la pharmacopée
traditionnelle des Cris de la Baie-James**

Par

Shilin Li

Département de Pharmacologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de du grade de Philosophiae Doctor (PhD)

en pharmacologie

Juillet, 2016

© Shilin Li, 2016

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée:

**Études *in vivo* et *in vitro* sur le potentiel néphroprotecteur
de plantes médicinales anti-diabétiques de la pharmacopée
traditionnelle des Cris de la Baie-James**

Présentée par:

Shilin Li

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dre Guy Rousseau, Président-rapporteur

Dr Pierre S. Haddad, Directeur de recherche

Dr René Cardinal, Membre du jury

Dr Charles Couillard, Examineur externe

Dre Josette Noël, Représentante du doyen de la FESP

Résumé ¹

Notre équipe a identifié le thé Labrador [*Rhododendron groenlandicum* L. (Ericaceae)] comme une plante potentiellement antidiabétique de la pharmacopée traditionnelle des Cris de la Baie James orientale. Dans la présente étude, nous avons évalué les effets néphroprotecteurs potentiels de la plante.

De la microalbuminurie et de la fibrose rénale ont été développées chez des souris alimentées avec une diète grasse (DG). Le *R. groenlandicum* améliore d'une façon non-significative la microalbuminurie, avec le rapport albumine/créatinine (ACR) diminuant de 0.69 à 0.53. La valeur de la fibrose rénale qui était, à l'origine, de 4.85 unités arbitraires (UA) dans des souris alimentées à la DG, a chuté à 3.27 UA après avoir reçu un traitement de *R. groenlandicum*. Le *R. groenlandicum* a réduit la stéatose rénale de presque la moitié alors que l'expression du facteur de modification de Bcl-2 (Bmf) a chuté de 13.96 UA à 9.43 UA.

Dans leur ensemble les résultats suggèrent que le traitement avec *R. groenlandicum* peut améliorer la fonction rénale altérée par DG.

Dans l'étude subséquente, notre équipe avait déjà identifié 17 espèces de la forêt boréale, appartenant à la pharmacopée traditionnelle des Cris de la Baie James orientale, qui ont présenté des activités biologiques prometteuses *in vitro* et *in vivo* dans le contexte du DT2.

Nous avons maintenant examiné ces 17 extraits afin d'identifier lesquels possèdent un potentiel cytoprotecteur rénal en utilisant des cellules Madin Darby Canine Kidney (MDCK) mises à l'épreuve dans un milieu hypertonique. Le potentiel cytoprotecteur ainsi que les mécanismes sous-jacents ont été étudiés.

Nous concluons que plusieurs plantes antidiabétiques Cris exercent une activité de protection rénale qui pourrait être pertinente dans le contexte de la néphropathie diabétique (ND) qui affecte une proportion importante de diabétiques Cris. La *G. hispidula* et la *A. balsamea* sont parmi les plantes les plus puissantes dans ce contexte et elles semblent protectrices principalement en inhibant la caspase 9 dans la voie de signalisation apoptotique mitochondriale.

Finalement, nous avons utilisé une approche de fractionnement guidée par un test biologique pour identifier les fractions actives et les composés de *A. balsamea* avec un potentiel de protection rénale *in vitro* dans des cellules MDCK mises au défi avec un milieu hypertonique.

¹ Ce résumé français est tiré en partie de ceux des articles 1, 2 et 3 dans la thèse en cours.

La fraction d'hexane (Hex) possède le potentiel le plus élevé parmi toutes les fractions étudiées contre les dommages cellulaires induits par le stress hypertonique. Dans des études précédentes, trois composés purs ont été identifiés à partir de la fraction Hex, à savoir, l'acide abiétique, l'acide déhydroabiétique et le squalène ; ceux-ci ont donc été testés. L'acide abiétique se distinguait par son effet puissant dans le maintien de la viabilité des cellules MDCK (cellules négatives pour Annexine V et Iodure de propidium, AnnV⁻/PI⁻) à un niveau relativement élevé (augmentation de 25.48% relative au stress hypertonique, P<0.0001), ainsi qu'une réduction significative (diminution de 20.20% par rapport au stress hypertonique, P<0.0001) de l'apoptose de stade précoce (AnnV⁺/PI⁻). L'acide abiétique peut donc servir à normaliser les préparations traditionnelles d'*A. balsamea* et à trouver des applications potentielles dans le traitement de la néphropathie diabétique.

Les trois études ont été intrinsèquement liées les unes aux autres, par conséquent, nous avons réussi à identifier *R. groenlandicum* ainsi que *A. balsamea* comme nouvelles plantes prometteuses contre la néphropathie diabétique. Nous croyons que ces résultats profiteront à la communauté criée pour la gestion des complications diabétiques, en particulier la néphropathie diabétique. En parallèle, nos données pourraient faire avancer l'essai clinique de certaines plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle des Cris de la Baie James orientale du Canada.

Mots clés : *Abies balsamea*, hexane, néphropathie diabétique, acide abiétique, médecine traditionnelle autochtone, *Rhododendron groenlandicum*, DG, microalbuminurie, fibrose, Bmf.

Abstract ²

Our team has identified Labrador tea [*Rhododendron groenlandicum* L. (Ericaceae)] as a potential antidiabetic plant from the traditional pharmacopeia of the Eastern James Bay Cree. In the present study, we assessed the plant's potential renoprotective effects.

Microalbuminuria and renal fibrosis were developed in high fat diet (HFD)-fed mice. Meanwhile, there was a tendency for *R. groenlandicum* to improve microalbuminuria, with the values of albumin-creatinine ratio (ACR) reducing from 0.69 to 0.53. Renal fibrosis value was originally 4.85 arbitrary units (AU) in HFD-fed mice, dropped to 3.27 AU after receiving *R. groenlandicum* treatment. *R. groenlandicum* reduced renal steatosis by nearly one half whereas the expression of Bcl-2-modifying factor (Bmf) diminished from 13.96 AU to 9.43 AU.

Taken altogether, the results suggest that *R. groenlandicum* treatment can improve renal function impaired by HFD.

In the following study, our team has identified 17 Boreal forest species from the traditional pharmacopeia of the Eastern James Bay Cree that presented promising *in vitro* and *in vivo* biological activities in the context of type 2 diabetes (T2D).

We now screened the 17 plants extracts for potential renal protective activity using Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells challenged with hypertonic medium. Cytoprotective potential as well as underlying mechanisms were investigated.

We conclude that several Cree antidiabetic plants exert renal protective activity that may be relevant in the context of diabetic nephropathy that affects a significant proportion of Cree diabetics. *G. hispidula* and *A. balsamea* are amongst the most powerful plants in this context and they appear to exert their modulatory effect primarily by inhibiting caspase 9 in the mitochondrial apoptotic signaling pathway.

We used a bioassay-guided fractionation approach to identify active fractions and compounds of *A. balsamea* with renal protective potential *in vitro* in MDCK cells challenged with hypertonic medium.

The hexane (Hex) fraction possessed the highest potential among all solvent fractions against cell damage induced by hypertonic stress. In previous studies, three pure compounds were identified from the Hex fraction, namely, abietic acid, dehydroabietic acid and squalene. Abietic acid stood

² Ce résumé anglophone est tiré en partie de ceux des articles 1, 2 et 3 dans la thèse en cours.

out by its strongest effect in maintaining MDCK cell viability (AnnV⁻/PI⁻) at a relatively high level (25.48% increase relative to hypertonic stress, P<0.0001) as well as a significant reduction (20.20% decrease relative to hypertonic stress, P<0.0001) of early stage apoptosis (AnnV⁺/PI⁻). Abietic acid may thus serve to standardize *A. balsamea* traditional preparations and find potential applications in the treatment of diabetic nephropathy.

The three studies were inherently associated with each other, as a result we had successfully identified *R. groenlandicum* as well as *A. balsamea* as novel medicinal plants against diabetic nephropathy. We believe such findings will benefit the Cree community for the management of diabetic related complications, especially diabetic nephropathy. Meanwhile, our data might advance the clinical trial of certain medicinal plants from the traditional pharmacopeia of the Canadian Eastern James Bay Cree.

Key words: *Abies balsamea*, hexane, diabetic nephropathy, abietic acid, Aboriginal traditional medicine, *Rhododendron groenlandicum*, HFD, microalbuminuria, fibrosis, Bmf.

Table of Contents

Résumé	i
Abstract	iii
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	ix
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Le diabète	2
1.1.1 Classification diabétique.....	3
1.1.2 La pathogenèse du diabète.....	8
1.2 Le Traitement diabétique.....	16
1.2.1 L'insuline	16
1.2.2 L'analogue de l'insuline	17
1.2.3 Les sécrétagogues d'insuline	18
1.2.4 Les biguanides.....	20
1.2.5 Les glitazones.....	22
1.2.6 Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase	23
1.2.7 Les incrétines.....	24

1.2.8 Les inhibiteurs SGLT-2	26
1.2.9 Autres traitements et médicaments complémentaires et alternatifs	28
1.3 Complications diabétiques.....	30
1.3.1 La rétinopathie.....	31
1.3.2 La neuropathie.....	31
1.3.3 Les maladies cardiovasculaires.....	32
1.3.4 La néphropathie diabétique.....	33
1.4 La néphropathie diabétique et l’apoptose	36
1.5 Objectif de cette étude	37
Chapitre 2 : Article 1	42
Chapitre 3 : Article 2	63
Chapitre 4. Article 3	102
Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives	124
Chapitre 6: Bibliographie	131

Liste des tableaux

Introduction

TABLE 1: VALEURS DE GLYCEMIE POUR LE DIAGNOSTIC DU DIABETE ET DES AUTRES FORMES D'HYPERGLYCEMIE (ADAPTÉ DE (ZIMMET ET AL., 2001)).....	1
TABLE 2: GÈNES CANDIDATS ET POLYMORPHISMES GÉNÉTIQUES ASSOCIÉS AU DT2 (ADAPTÉ DE (STUMVOLL ET AL., 2005)).	15
TABLE 3: LISTE DES ESPECES DE PLANTES MEDICINALES CEI UTILISEES DANS LE TRAITEMENT DES SYMPTOMES DU DIABETE (ADAPTATION DE (HARBILAS ET AL., 2009)).....	40

Article 1

TABLE 1: BODY AND ORGAN WEIGHTS AT THE END OF TREATMENT.	54
---	----

Article 2

TABLE 1: PHYTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF 17 CREE PLANT SPECIES (CONTINUED).....	79
TABLE 2: LIST OF INVESTIGATED PLANT SPECIES AND THE CONCENTRATIONS OF THE EXTRACTS TESTED IN MDCK CELLS (CONTINUED).	84

Article 3

TABLE 1: LIST OF A. BALSAMEA, ITS FRACTIONS AND THE CONCENTRATIONS OF THE EXTRACTS TESTED IN MDCK CELLS.	116
---	-----

Liste des figures

Introduction

FIGURE 1: LA PATHOLOGIE DETAILLEE DU DIABETE DE TYPE 1 (ADAPTE DE (MITTENDORFER AND KLEIN, 2014)).	9
FIGURE 2: PATHOPHYSIOLOGIE DE L'HYPERGLYCÉMIE ET DE L'ÉLEVATION DES TAUX CIRCULANTS DES FFA DANS LE DT2 (ADAPTÉ DE (STUMVOLL ET AL., 2005)).	11
FIGURE 3: SIGNALISATION DU RÉCEPTEUR À L'INSULINE ET RÉSISTANCE À L'INSULINE (ADAPTÉ DE (STUMVOLL ET AL., 2005)).	12
FIGURE 4: SITES D'ACTION DES THERAPIES PHARMACOLOGIQUES POUR LE TRAITEMENT DU DT2 (ADAPTE DE (FEINGOLD, 2000)).	27
FIGURE 5: INTERACTIONS ENTRE LES VOIES HOMEOSTATIQUES DU GLUCOSE ET LES CELLULES CIBLES SENSIBLES AUX COMPLICATIONS DU DIABETE. (ADAPTE DE (FORBES AND COOPER, 2013)).	35

Article 1

FIGURE 1. ALBUMIN/CREATININE RATIO (ACR) IS ELEVATED IN HFD-FED MICE AT THE 16TH WEEK OF STUDY.	56
FIGURE 2: FIBROSIS DEVELOPED SEVERELY IN HFD-FED MICE.	57
FIGURE 3: PERIODIC ACID-SCHIFF (PAS) STAINING, IN MOUSE KIDNEYS AT WEEK 16. MAGNIFICATION IS $\times 600$.	57
FIGURE 4: PAS STAINING AND QUANTIFICATION OF VACUOLES IN MOUSE KIDNEYS AT WEEK 16.	58
FIGURE 5. BMF EXPRESSION IS ELEVATED IN RENAL TISSUES OF HFD-FED MICE.	58

Article 2

FIGURE 1: RENAL PROTECTIVE POTENTIAL OF 17 ANTIDIABETIC MEDICINAL PLANT EXTRACTS.	89
FIGURE 2: CLEAVED CASPASE 3 ACTIVITY.	90
FIGURE 3: CLEAVED CASPASE 8 ACTIVITY.	91
FIGURE 4: CLEAVED CASPASE 9 ACTIVITY.	92

Article 3

FIGURE 1: RENAL PROTECTIVE POTENTIAL OF <i>A. BALSAMEA</i> AND ITS FRACTIONS.	118
FIGURE 2: RENAL PROTECTIVE POTENTIAL OF <i>A. BALSAMEA</i> , HEX FRACTION AND IDENTIFIED PURE COMPOUNDS.	119

Liste des abréviations

A. balsamea: *Abies balsamea*

ACE: enzyme de conversion de l'angiotensine (*angiotensin-converting enzyme*)

ACR: rapport albumine/créatinine (*albumin-creatinine ratio*)

ADN: acide désoxyribonucléique (*deoxyribonucleic acid*)

AGEs : produits finaux de glycation avancés (*advanced glycation end products*)

AGI: inhibiteur de la α -glucosidases (*α -glucosidases inhibitors*)

AMPK : protéine kinase activée par l'AMP (*5' AMP-activated protein kinase*)

AnnV: Annexine V

APS: Acide périodique–Schiff (*Periodic acid–Schiff*)

ATP: adénosine triphosphate (*adenosine triphosphate*)

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

Bmf: facteur de modification de Bcl-2 (*Bcl-2-modifying factor*)

cAMP: adénosine monophosphate cyclique (*cyclic adenosine monophosphate*)

CEI: Cris d'Eeyou Istchee (*Cree of Eeyou Istchee*)

DG: diète grasse (*high fat diet*)

DM: diabetes mellitus

DPP4: dipeptidyl peptidase-4

DRO: dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species*)

DSSCI: inventaire des soins auto-administrés des symptômes du diabète (*diabetes symptoms self-care inventory*)

DT1: diabète de type 1 (*type 1 diabetes*)

DT2: diabète de type 1 (*type 2 diabetes*)

EMPA: empagliflozine (*empagliflozin*)

ESRD: end-stage renal disease

EVA: visual analog scale

FBG: fasting blood glucose,

FDA: Food and Drug Administration

FFA: free fatty acid

Foxo1: Forkhead box protein O1

FPG: fasting plasma glucose

G. hispidula: *Gaultheria hispidula*

G6Pase: glucose 6-phosphatase

GAD: acide glutamique décarboxylase (*glutamic acid decarboxylase*)

GDM: diabète gestationnel (*gestational diabetes mellitus*)

GIP: Glucose-dependant Insulinotropic Polypeptide

GLP-1: glucagon-like peptide-1

GLUT4: transporteur de glucose 4 (*glucose transporter type 4*)

GS: glutamine synthétase (*glutamine synthetase*)

HbA1c: hémoglobine glyquée (*glycated hemoglobin*)

HepG2: human hepatoma G2

Hex: Hexane

HLA: antigènes des leucocytes humains (*human leukocyte antigen*)

IADPSG: International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups

IFG: impaired fasting glucose

IGT: impaired glucose tolerance

IL-6: interleukine 6 (*interleukin 6*)

IMC: indice de masse corporelle (*body mass index*)

IRSC : instituts de recherche en santé du Canada (*Canadian Institutes Health Research*)

IRSC-TAAM : Instituts de recherche en santé du Canada sur les médecines autochtones antidiabétiques (*Canadian Institutes Health Research Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines*)

MDCK: Madin Darby Canine Kidney

mTOR: mammalian target of rapamycin

ND: néphropathie diabétique (*diabetic nephropathy*)

NDDG: National Diabetes Data Group

OGTT: test oral de tolérance au glucose (*oral glucose tolerance test*)

OIA: obésité induite par l'alimentation (*diet induced obesity*)

PAI-1: plasminogène 1 (*plasminogen activator inhibitor 1*)

PI: Iodure de propidium (*Propidium iodide*)

PIP3: phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*)

R. groenlandicum: *Rhododendron groenlandicum* L.

RD: rétinopathie diabétique (*diabetic retinopathy*)

RI: résistance à l'insuline (*insulin resistance*)

RPG: random plasma glucose

RPTC: renal proximal tubules cells

RXR: récepteur X de rétinoïdes (*retinoid X recepto*)

SGLT2: sodium/glucose cotransporteur 2 (*sodium/glucose cotransporter 2*)

SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone (*renin–angiotensin–aldosterone system*)

SRAA: système rénine-angiotensine-aldostérone (*renin–angiotensin–aldosterone system*)

SUR: récepteurs des sulfonyles (*sulfonylurea receptors*)

TGF- β 1: transforming growth factor beta 1

TNF- α : facteur de nécrose tumorale α (*tumor necrosis factor alpha*)

TZD: thiazolidinediones

UA: unités arbitraires (*arbitrary units*)

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelial growth factor*)

VLDL : lipoprotéine de très basse densité (*very low-density lipoprotein*)

XIAP : protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*)

YY1 : Yin Yang 1

**À ma merveilleuse épouse Xin Peng
et ma famille bien-aimée**

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais exprimer ma plus grande gratitude à mon bien-aimé superviseur, le Dr Pierre S. Haddad, cela a été un honneur pour moi d'être recruté comme son étudiant au doctorat depuis septembre 2011. J'admire son enthousiasme et son expertise, et j'apprécie l'aide et les encouragements qu'il m'a fourni tout au long du voyage difficile. Le Dr Pierre Haddad m'avait soutenu de divers aspects, notamment en m'enseignant comment être un bon chercheur scientifique, en dirigeant mes expériences et en supervisant mes articles scientifiques et ma thèse. Mes sincères remerciements vont aussi au Dr René Cardinal pour son précieux soutien et ses conseils pour mon étude. Dr. Cardinal avait aimablement prêté sa main pour nous aider à écrire une demande de financement d'urgence lorsque notre laboratoire a été confronté à des difficultés financières. C'est grâce à ses efforts constants que j'ai pu surmonter tous les obstacles. Il était toujours là en arrière-plan dans les situations où j'aurais pu me décourager.

Je voudrais également exprimer ma profonde gratitude au Dr Jean-François Gauchat, à Sarah Pasquin et à Shirley Campbell. Merci à Shirley Campbell, car c'est grâce à son aimable suggestion que nous avons eu une merveilleuse collaboration avec le Dr Gauchat pour mon deuxième projet. L'étudiante au doctorat, Sarah Pasquin, était ma principale collaboratrice dans cette étude. Elle a généreusement partagé sa précieuse expérience sur la coloration fluorescente et la cytométrie de flux avec moi.

Un merci tout spécial va aux Dr Guy Rousseau, Dr. Jolanta Gutkowska, le Dr Éric Thorin et le Dr Pierre S. Haddad pour assister à mon examen oral de synthèse. Ils ont soigneusement évalué ma performance académique et exprimé leur approbation, depuis ce jour, je suis devenu un véritable candidat au doctorat.

Je dois aussi remercier le Dr Hélène Girouard, le Dr Audrey Claing, le Dr René Cardinal et le Dr Chantal Lambert pour leur soutien et leur motivation. Un comité de suivi de thèse a été établi par eux pour garantir à la fois mon étude et l'obtention de mon diplôme, car ils étaient conscients de la difficulté dans notre laboratoire. La réunion régulière avec le comité avait généré un impact positif, ce qui m'a aidé à surmonter tous les obstacles, les mots ne suffisent pas à exprimer ma gratitude éternelle.

Je dois aussi remercier Armelle Champion d'avoir pris du temps de son horaire chargé pour me donner une formation en cytométrie de flux qui était si importante pour moi parce que mes deux

derniers projets comptaient tellement sur elle. Je suis devenu rapidement familier avec la technique grâce à la patience et la vaste expérience d'Armelle.

Je voudrais également remercier ma belle-sœur Fanyun Peng de m'avoir aidé à adapter les figures de l'Introduction.

Mes journées à l'Université de Montréal ont été rendues agréables par des amis, des collègues et la vie de la ville. Je suis reconnaissant pour le temps passé avec mes amis, pour mes copains d'équipe de basket-ball et des nombreux matchs que nous avons joués ensemble, pour l'assistance d'Antoine Brault lorsque j'ai appris l'anatomie dans la première année, pour Hoda Eid et Mayra Luz Sanchez de prendre soin de moi quand j'étais en difficulté en faisant des expérimentations, et pour beaucoup d'autres personnes et de souvenirs.

Enfin, ma gratitude va à mes familles, j'ai ressenti fermement votre amour tout au long de ce voyage incroyable, même si nous ne pouvions être connectés à Internet que la plupart du temps. Surtout, le soutien constant de ma femme a été la force la plus importante qui m'a poussée jusqu'ici. Merci !

Chapitre 1 : Introduction

Le diabète sucré ou *diabetes mellitus* (DM) est un trouble métabolique chronique qui se manifeste par des taux de glucose plasmatique anormalement élevés qui sont soit supérieurs à 7.0 mmol/L (126 mg/dL) à jeun ou 11.1 mmol/L (200 mg/dL) deux heures après la prise de glucose (WHO, 1999; Zimmet et al., 2001). L'*impaired fasting glucose* (IFG) ainsi que l'*impaired glucose tolerance* (IGT) sont largement reconnues comme des tournants importants entre l'état physiologique normal et le diabète (WHO, 1999; Zimmet et al., 2001).

L'amélioration du niveau de vie ainsi que le travail stressant de nos jours ont causé un mode de vie nocif ; le diabète est une maladie non-contagieuse à croissance rapide qui pose un énorme fardeau économique sur les dépenses médicales mondiales.

Glucose concentration (mmol/L)

Diagnose/Criteria	Capillary	Whole blood Venous	Capillary	Plasma Venous
IFG				
Fasting concentration	5.6 - 6.0	5.6 - 6.0	6.1 - 6.9	6.1 - 6.9
2h after glucose intake	< 7.8	< 6.7	< 8.9	< 7.8
IGT				
Fasting concentration	< 6.1	< 6.1	< 7.0	< 7.0
2h after glucose intake	7.8 - 11.0	6.7 - 9.9	8.9 - 12.1	7.8 - 11.0
DM				
Fasting concentration	≥ 6.1	≥ 6.1	≥ 7.0	≥ 7.0
2h after glucose intake	≥ 11.1	≥ 10.0	≥ 12.2	≥ 11.1

Table 1: Valeurs de glycémie pour le diagnostic du diabète et des autres formes d'hyperglycémie (adapté de (Zimmet et al., 2001))

À la fin de l'année 2000, le nombre de patients atteints de DM était de 171 millions et, selon les estimations, il atteindrait 366 millions de cas en moins de quinze ans, de plus, les femmes étaient plus nombreuses que leurs homologues masculin (Wild, Sarah et al., 2004). Cette estimation a été dépassée puisqu'il y avait 382 millions d'adultes diabétiques en 2013 (Nachar et al., 2015).

1.1 Le diabète

La signalisation compromise de l'insuline ou une altération de la production d'insuline entraînent une élévation de la glycémie, qui est la définition standard du DM (Ozougwu et al., 2013). Selon l'inventaire des soins auto-administrés des symptômes du diabète (DSSCI), l'hyperglycémie, les étourdissements, la polyurie, la polydipsie, la vision floue, la cicatrisation retardée, les céphalées fréquentes, les étourdissements, et ainsi de suite, sont les principaux symptômes du diabète (García, 2005). Le diabète de type 1 (DT1) et le diabète de type 2 (DT2) sont les principaux types de DM. Comme indiqué précédemment, le DT1 se manifeste par un défaut de production d'insuline principalement causé par des cellules bêta pancréatiques altérées par l'auto-immunité, tandis que le DT2 est caractérisé par la résistance à l'insuline (RI) (Forbes and Cooper, 2013). Sans prise en charge appropriée, la RI et/ou une carence en insuline augmenterait encore le taux de glucose dans le sang, entraînant divers troubles du métabolisme vital (Shrivastava et al., 2013). De plus, outre le trouble du métabolisme, des complications graves se développeraient et pourraient être classées comme maladies micro- et macro-vasculaires selon le site d'apparition, la première survient sur les petits vaisseaux tandis que la seconde sur les gros vaisseaux (Li et al., 2016).

1.1.1 Classification diabétique

Parfois, les normes de diagnostic ne s'appliquent pas à certains patients ; dans ce cas-là d'autres facteurs peuvent être pris en considération, tels que la glycémie persistante ou temporairement élevée chez la femme enceinte, et parfois l'administration externe de stéroïdes entraînerait un statut diabétique temporel, les thiazidiques peuvent aggraver le DT2, et ainsi de suite (American Diabetes, 2004).

1.1.1.1 Le DT1

1.1.1.1.1 Le diabète à médiation immunitaire

Moins de 10% des patients diabétiques appartiennent au DT1 qui était aussi connu sous le nom de diabète juvénile (American Diabetes, 2010). Les cellules bêta pancréatiques altérées par l'auto-immunité représentent l'étiologie du DT1 (American Diabetes, 2012). Une série de marqueurs de destruction immunitaire a été découverte, notamment l'acide glutamique décarboxylase (GAD) 65, des auto-anticorps de cellules des îlots, des auto-anticorps anti-insuline, et ainsi de suite (American Diabetes, 2012). Des études ont montré que la plupart des patients atteints de DT1 portaient de tels anticorps (American Diabetes, 2014). En plus, les gènes DQA et DQB sont étroitement liés au DT1 via les antigènes des leucocytes humains (HLA), d'autres études étant nécessaires pour déterminer si ces allèles suggèrent une protection ou une prédisposition (American Diabetes, 2014).

1.1.1.1.2 Le diabète idiopathique

Il n'y a pas d'étiologie claire pour certains types de DT1. Il a été officiellement rapporté en 1987 (Winter et al., 1987) qu'un diabète rarement observé a été remarqué qui ne pouvait être classé, ni comme DT1 ni comme DT2, en raison de la propriété du phénotype DT2 mais sans auto-immunité des îlots (Pinero-Pilona and Raskin, 2001). Il a ainsi été appelé diabète atypique (Pinero-Pilona and Raskin, 2001).

1.1.1.2 Le DT2

Plus de 90% des cas de diabète appartient largement au domaine du DT2, ce qui était également de concert avec la prévalence aux États-Unis (Deshpande et al., 2008). Les statistiques suggèrent que le vieillissement prédispose les gens au diabète, en particulier à partir de l'âge de 65 ans

(Skyler and Oddo, 2002). Il existe plusieurs complications classiques associées au DT2, notamment, mais sans s'y limiter, les maladies cardiovasculaires, les lésions des vaisseaux sanguins, les maladies rénales, la rétinopathie, la néphropathie, la neuropathie et ainsi de suite (Lin and Sun, 2010). Il est de notoriété publique que l'inactivité physique produit un effet négatif sur la santé à long terme, de nombreuses études ayant souligné qu'elle contribuait grandement au développement du DT2 et de l'obésité (Hu, 2003). Cependant, il reste à démontrer la façon par laquelle un mode de vie sédentaire affecte le DT2. Les activités sédentaires les plus fréquentes sont le travail de bureau, les loisirs après le travail, notamment regarder la télévision, jouer à des jeux vidéo, s'entretenir avec des amis, et ainsi de suite. Certaines études ont été faites pour élucider la relation entre le mode de vie sédentaire et le DT2 en étudiant l'impact négatif de l'augmentation du temps passé devant un poste de télévision, constatant que le DT2 et l'obésité étaient fortement corrélés avec le temps de visionnage prolongé devant la télévision; notamment il y aurait une sensibilité considérablement accrue au DT2 si on regarde plus de 40 heures par semaine (Hu, 2003). Afin de compenser les effets indésirables causés par le mode de vie sédentaire, une activité de faible intensité a été recommandée, ce qui est bénéfique pour améliorer l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie (Hamilton et al., 2014).

En plus du mode de vie sédentaire, l'obésité était considérée comme le principal moteur du DT2, qui était également la cible principale de la prévention et du traitement. L'obésité signifie littéralement une accumulation excessive de dépôts graisseux dans les cellules, les tissus, les organes, et ainsi de suite. La prévalence de l'obésité est plus répandue dans les pays développés que dans les pays en développement compte tenu de la suralimentation. L'obésité participe également à la pathogenèse de nombreuses autres maladies métaboliques, et elle est en train de devenir un problème croissant dans le monde entier (Al-Goblan et al., 2014). Une bonne gestion est donc indispensable, de sorte que les impacts sociaux négatifs ainsi que les frais médicaux pourraient être minimisés, améliorant ainsi éventuellement la qualité de vie (Al-Goblan et al., 2014). Selon plusieurs études de haut niveau issues de bases de données historiques (PubMed et EconLit), l'obésité a créé un lourd fardeau pour l'économie nationale américaine avec 1723 dollars de frais médicaux pour chaque patient, alors que l'obésité et le surpoids ont coûté 113.9 milliards de dollars, soit près de 10% du budget total des soins de santé (Tsai et al., 2011).

Certaines études ont également indiqué que la progression du DT2 était liée à l'interaction entre le métabolisme de l'hôte et la composition microbienne intestinale des mammifères (Musso et

al., 2011). La vitamine D avait été signalée comme étant bénéfique dans la gestion du DT2, une étude ayant montré que l'hyperglycémie était plus fréquemment observée en hiver et était associée à un état d'hypovitaminose, ce qui pourrait impliquer une corrélation avec le DT2 (Wu et al., 2014). La vitamine K, également connue sous le nom de phylloquinone, possède apparemment aussi un effet d'hémostase du glucose, qui fonctionnerait ainsi comme un rival de l'hyperglycémie (Yoshida et al., 2008).

De nombreuses complications sont présentes avec le développement du DT2. Une étude clinique axée sur la rétinopathie diabétique (RD) a révélé qu'un retard de diagnostic de 4 à 7 ans existe pour le début de la RD tandis qu'il est de 9 à 12 ans pour le DM (Harris et al., 1992). Diverses méthodes de dépistage du T2D ont été développées au fil du temps, telles que des questionnaires précoces, des tests basés sur la protéomique, et ainsi de suite (Cox and Edelman, 2009; Engelgau et al., 2000; Kolberg et al., 2009; Maynard et al., 2007; Sacks et al., 2002). Selon les critères cliniques actuels, seulement deux normes sont acceptées pour le diagnostic qui mesurent soit la protéine glyquée, soit la glycémie (Cox and Edelman, 2009). Lors de la mesure de la glycémie diabétique, plusieurs options sont disponibles : les patients peuvent choisir entre le test oral de tolérance au glucose (OGTT), le *random plasma glucose* (RPG), le *fasting blood glucose* (FBG), le *fasting plasma glucose* (FPG), alors que l'hémoglobine glyquée (HbA1c) reste une autre référence importante (Adepoyibi et al., 2013; WHO, 1999, 2011).

1.1.1.3 Le diabète gestationnel

Au cours de la grossesse, le diabète gestationnel (GDM) a été signalé comme la condition médicale la plus fréquente, ce qui pourrait nuire au nouveau-né et/ou à la mère en raison de la toxicité de l'hyperglycémie (Alfadhli, 2015). Des études ont montré qu'avant l'apparition de GDM, la RI peut survenir elle joue un rôle déterminant pour GDM (Barbour et al., 2007). GDM est une condition médicale temporaire et disparaît après l'accouchement. La prévalence varie selon différents critères, tels que 3.2% selon le critère classique, alors que 5.0% selon les critères modifiés de Carpenter et Coustan (Bevier et al., 1995; Carpenter and Coustan, 1982). Le critère du test de tolérance au glucose pour la grossesse a été mis à point en 1964, Il a été nommé test de Somogyi-Nelson qui mesurait les valeurs de jeûne allant de 1 à 3 heures (O'Sullivan and Mahan, 1964; Sacks et al., 1989). Le *National Diabetes Data Group* (NDDG), Carpenter et Coustan, de même que Sacks et collaborateurs ont proposé plusieurs critères de diagnostic

utiles au cours des années suivantes (Carpenter and Coustan, 1982; NDDG, 1979; Sacks et al., 1989).

De nouveaux critères plus appropriés ont été proposés par l'*International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups* (IADPSG) ; ils ont remis en question la nécessité de tester l'OGTT avant la grossesse, suggérant plutôt de considérer le niveau de FPG de 5.1 mmol/l (92 mg/dL) comme seuil pour le diagnostic de GDM au début de la gestation (IADPSG, 2010). En plus du niveau de FPG, un test OGTT de 75g est également une mesure fiable pour le diagnostic de GDM avec le seuil de 10.0 mmol/l (180 mg/dL) 1 heure après et 8.5 mmol/l (153 mg/dL) 2 heures après la charge glycémique (IADPSG, 2010).

Bien que le mécanisme n'ait pas été entièrement compris, on a appris que la grossesse prédisposait les tissus maternels à la RI en raison, du moins en partie, de l'obésité gestationnelle, des hormones placentaires, et ainsi de suite (Kampmann et al., 2015). Une étude *in vivo* a tenté d'élucider la relation entre la RI et le GDM, découvrant que la grossesse présentait un impact négatif sur la transcription génétique du récepteur de l'insuline ainsi que sur la signalisation de l'insuline, tout en notant que les niveaux d'estradiol et de progestérone étaient aussi des composants importants de tels événements (Gonzalez et al., 2002). GDM se produirait en raison de la RI si l'homéostasie susmentionnée est interrompue. Une étude comprenant 76 femmes enceintes a été utilisée pour identifier les facteurs de risque associés au GDM, divers candidats ont été découverts, y compris les antécédents familiaux de DM, l'indice de masse corporelle (IMC), l'hypertension artérielle, le mode de vie sédentaire, l'obésité, l'âge, et ainsi de suite (Pons et al., 2015).

1.1.1.4 D'autres types particuliers de diabète

Outre les types susmentionnés, selon l'*American Diabetes Association*, certains autres types de diabète pourraient être caractérisés comme suit : des défauts monogénétiques des cellules β pancréatiques, la mutation ponctuelle au niveau de l'acide désoxyribonucléique (ADN) mitochondrial, un mutant de l'insuline moléculaire et/ou de son récepteur, des endocrinopathies, la maladie exocrine du pancréas, des médicaments et des produits chimiques, des tumeurs, des virus, des maladies immunitaires, des syndromes génétiques, et ainsi de suite (American Diabetes, 2009).

Des défauts monogénétiques ou une maladie monogénétique dans le contexte du diabète indiquent soit une réduction de la fonction ou du nombre de cellules bêta pancréatiques ; les deux entraînant une production d'insuline moindre (Schwitzgebel, 2014).

Une étude a montré que le métabolisme était grandement affecté par la mutation ponctuelle de l'A3243G au niveau mitochondrial, se manifestant par une oxydation du glucose altérée, une augmentation du taux glycolytique et de la production de lactate, et autres, mais, plus important, une production d'insuline altérée était liée au diabète (de Andrade et al., 2006).

Une mutation moléculaire de l'insuline résultant d'une mutation génétique entraînerait des troubles physiologiques via une activité de liaison altérée et une demi-vie prolongée, se manifestant par une hyperglycémie et/ou une hyperinsulinémie, conduisant encore au DM (Nishi and Nanjo, 2011). Trois mutants de l'insuline ont été signalés, à savoir l'insuline Chicago, l'insuline Los Angeles et l'insuline Wakayama, et ils étaient tous causés par une mutation ponctuelle (Sanke and Nanjo, 1994). Les sites de mutation respectifs et l'acide aminé de remplacement pour les 3 mutants d'insuline étaient les suivants : insuline Chicago (survenue à B25 avec phénylalanine remplacée par leucine), insuline Los Angeles (survenue à B24 avec phénylalanine remplacée par sérine) et insuline Wakayama (survenue à A3 avec valine remplacée par la leucine), respectivement (Huang et al., 2007). Des preuves issues d'études animales ont suggéré que l'hyperglycémie diabétique était induite par une mutation autosomique dominante via la pro-insuline mutante, qui est une mutation ponctuelle de la cystéine, causant l'accumulation et le métabolisme de l'insuline à l'intérieur du réticulum endoplasmique et participant à l'étiologie de l'altération des cellules bêta pancréatiques (Wang et al., 1999).

Un type rare de diabète peut affecter les patients atteints de pancréatite. Dans ce phénotype, les cellules β et polypeptidiques alpha pancréatiques ont été endommagées, alors que la production d'incrétine a été réduite (Piciucchi et al., 2015).

Le diabète pourrait également être induit par des médicaments via des cellules β dommageables, comme le rodenticide Vacor, l'alloxan et la streptozotocine, et via une production d'insuline altérée, comme le diazoxide, les diurétiques thiazidiques, certains bloqueurs des canaux Ca^+ , la pentamidine, et ainsi de suite (Ferner, 1992).

Plusieurs formes de tumeurs peuvent également participer à l'étiologie du diabète, comme les somatostatинomes et les aldostéronomes, qui provoqueraient une hypokaliémie grave et entraîneraient une réduction de la production d'insuline (Karalliedde and Gnudi, 2014).

L'auto-immunité causée par les auto-anticorps est l'une des principales raisons qui expliquent le DM ; le mécanisme sous-jacent étant que ces anticorps attaquent les cellules des îlots pancréatiques via l'antigène correspondant (Onodera et al., 1982). Certaines infections virales sont soupçonnées d'induire une insulite humaine, une étude animale ayant révélé que la polyendocrine et les auto-anticorps anti-insuline étaient induits par le réovirus de type 1, entraînant en outre un DM (Onodera et al., 1981).

1.1.2 La pathogenèse du diabète

1.1.2.1 La résistance à l'insuline

L'insuline est l'une des hormones endocriniennes importantes qui régit le métabolisme des lipides, des glucides et des protéines dans le corps. Plusieurs autres hormones sont des antagonistes de l'insuline, comme le glucagon, le cortisol, les catécholamines, et ainsi de suite ; ainsi la RI serait induite aussi par une surproduction de ces hormones (Wilcox, 2005). Une altération de la signalisation en aval de la liaison de l'insuline à son récepteur serait la principale forme de la RI survenue au niveau cellulaire (Wilcox, 2005). Le mécanisme sous-jacent peut comprendre une altération de la fonction du transporteur de glucose de type 4 (GLUT4), une dérégulation de la phosphorylation de la tyrosine au niveau récepteur de l'insuline et de la phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate (PIP3) kinase, et ainsi de suite (Wheatcroft et al., 2003; Wilcox, 2005).

Pathophysiology of T1D

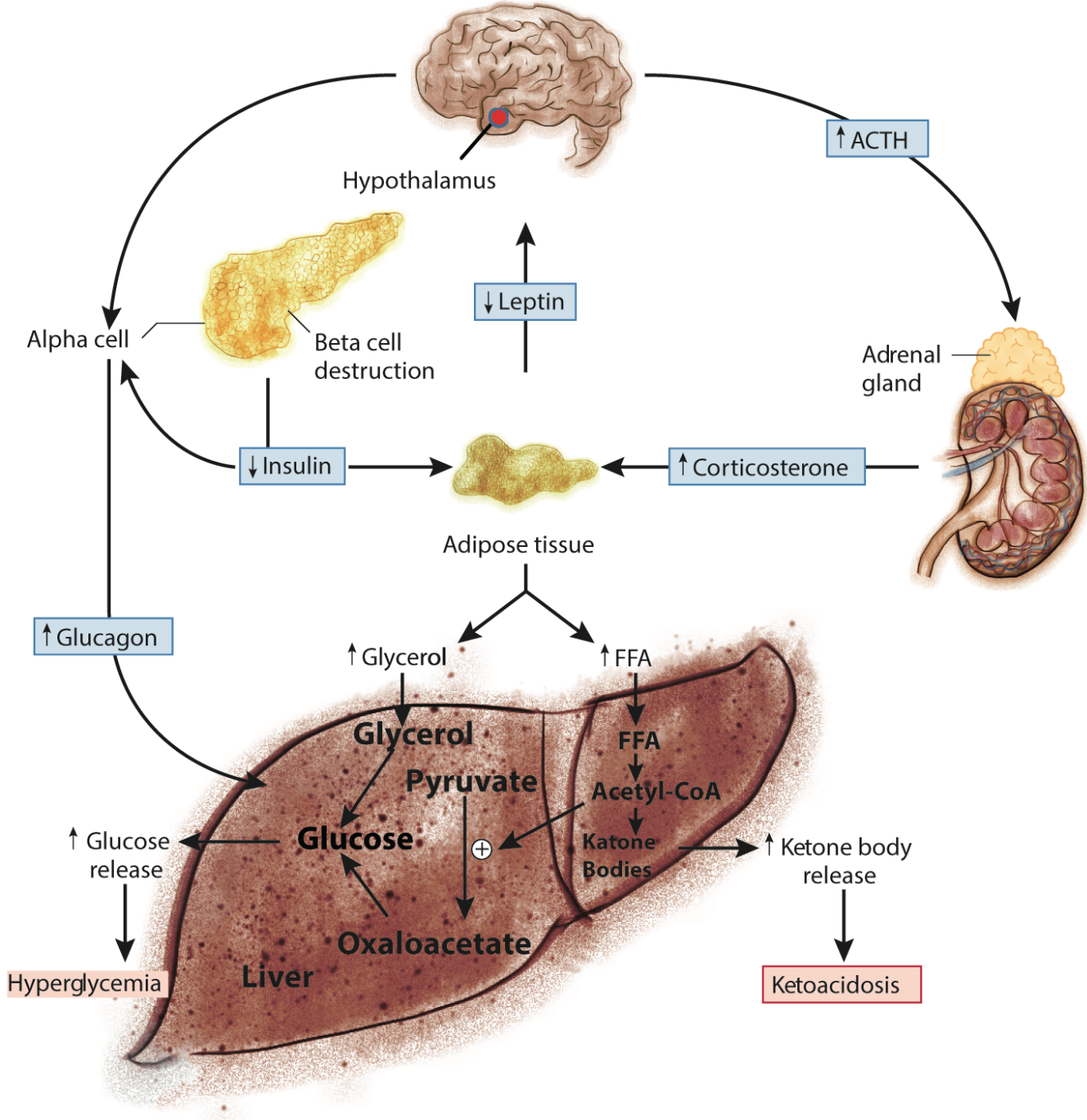


Figure 1: La pathologie détaillée du diabète de type 1 (adapté de (Mittendorfer and Klein, 2014)).

La diminution de la production de GLUT4 entraîne une diminution du transporteur de glucose intracellulaire, ce qui réduit l'utilisation et le métabolisme du glucose dans les muscles squelettiques et les adipocytes, ce qui pourrait éventuellement conduire à la RI (Hunter and Garvey, 1998). Les adipocytes utilisent moins de triglycérides dérivés des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) en raison de l'activité réduite/altérée de la lipoprotéine lipase causée par la RI, entraînant une hypertriglycémie (Krauss and Siri, 2004; Wilcox, 2005). Plusieurs cytokines produites par les adipocytes, comme l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1), l'interleukine 6 (IL-6), l'angiotensinogène, la leptine et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), auraient un effet synergique avec la RI, tandis que l'adiponectine inhibe la RI (Devaraj et al., 2004).

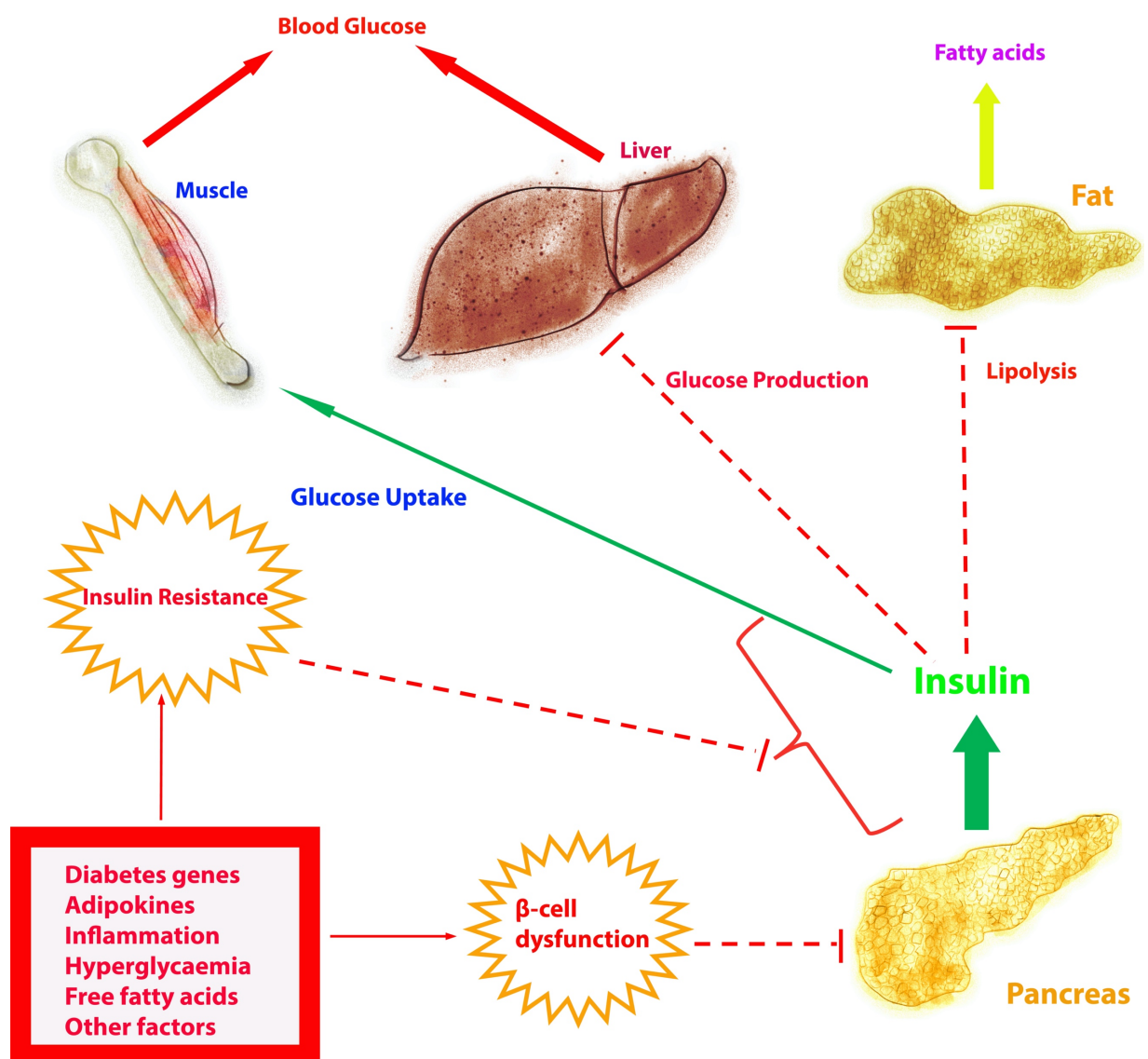


Figure 2: Pathophysiologie de l'hyperglycémie et de l'élévation des taux circulants des FFA dans le DT2 (adapté de (Stumvoll et al., 2005)).

Comme mentionné ci-dessus, puisque la suppression de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse est diminuée sous la RI, donc davantage de glucose serait produit par le foie.

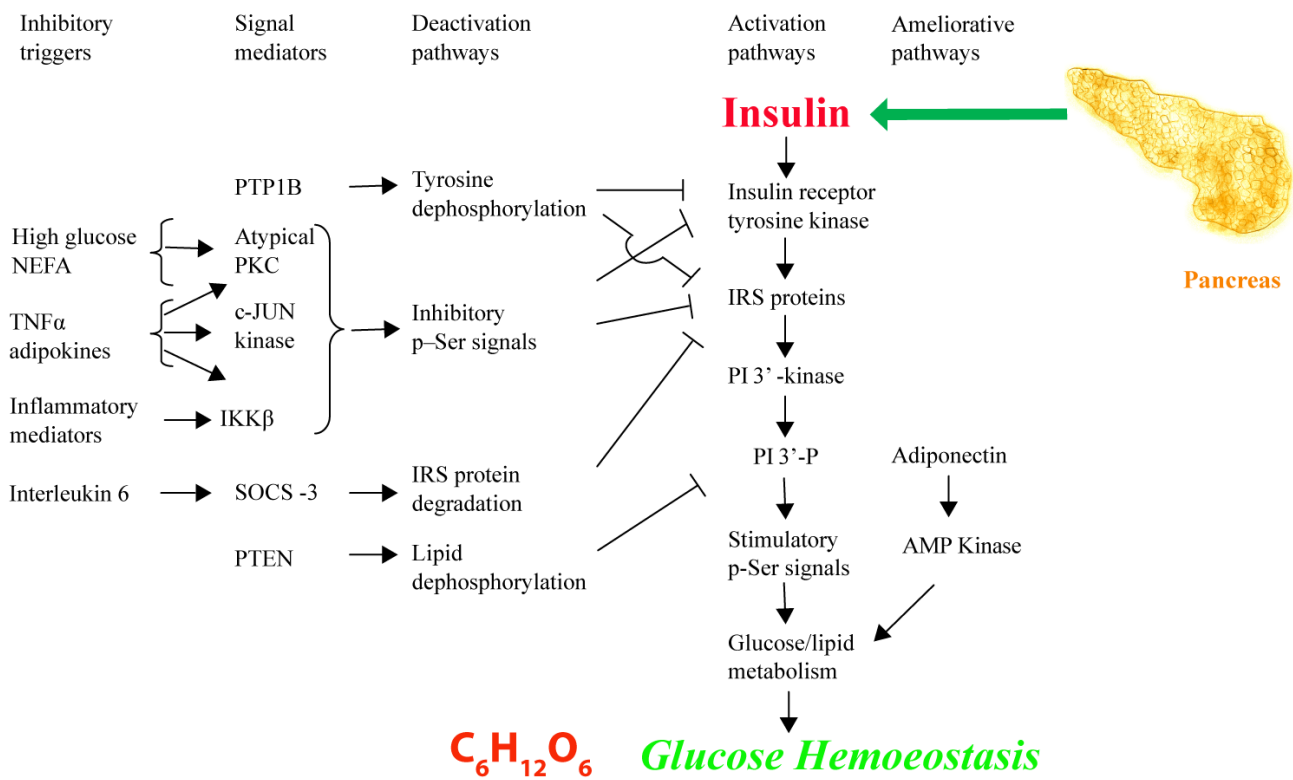


Figure 3: Signalisation du récepteur à l'insuline et résistance à l'insuline (adapté de (Stumvoll et al., 2005)).

1.1.2.2 L'Obésité

Un lien intrinsèque a été observé entre l'obésité et le diabète. Baum et al. ont signalé que la suralimentation peut induire l'obésité infantile et entraîner un diabète infantile plus tard dans la vie, suggérant des signes précoces d'hyperinsulinisme (Baum et al., 1975).

L'hypothèse de l'accélérateur affirmait que la RI était induite par une prise de poids (on parle de plus en plus d'IMC) (Wilkin, 2001). Par la suite, une hyperglycémie se manifesterait, ce qui exacerbe davantage le trouble métabolique en provoquant l'apoptose des cellules β pancréatiques et en favorisant ses immunogènes (Wilkin, 2001).

Comme nous l'avons déjà souligné, l'obésité et le diabète sont tous les deux corrélés à la RI. Des études ont suggéré que la RI est positivement corrélé à l'obésité, en particulier celle au niveau viscéral et ectopique, à l'incapacité à réduire le poids ainsi qu'à l'accumulation de graisse intramyocellulaire due à la réduction du métabolisme des graisses (Golay and Ybarra, 2005). La RI pourrait être causée par une prise de poids et des produits du tissu adipeux tels que le glycérol, les cytokines pro-inflammatoires, les acides gras non estérifiés, et autres, alors que la défaillance des cellules bêta pancréatiques induirait certainement une hyperglycémie (Kahn et al., 2006).

1.1.2.3 Étiologie et pathogenèse du DT1

Comme mentionné ci-dessus, la carence absolue en insuline est la caractéristique clé du DT1 qui est acquis à partir de cellules β pancréatiques altérées. L'auto-immunité causée par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ au niveau des cellules β pancréatiques (qui sont responsables de la production d'insuline) ainsi que par les macrophages infiltrant les îlots sont le mécanisme de développement du DT1 (Al Homsy MF, 1992; Baynest, 2015). Ainsi, les anticorps des cellules des îlots (principalement ciblés envers GAD) et les auto-anticorps anti-insuline ont été détectés chez la plupart des patients atteints de DT1 (Baynest, 2015; Raju SM, 2010).

Les facteurs génétiques contribuent aussi au DT1. Le HLA sur le chromosome 6 semble avoir une responsabilité principale sur la prédisposition génétique au DT1, de plus, les membres HLA les plus importants à cet égard sont DQ8, HLA-DR4 et HLA-DR3-DQ2 (Palicka, 2002).

Dans des conditions physiologiques normales, un niveau d'insuline circulant adéquat inhibe la production hépatique de glucose en réduisant la gluconéogenèse et la glycogénolyse, facilite l'absorption du glucose par les muscles et les tissus périphériques, et favorise la lipogenèse et en prévenant la lipolyse (Krentz and Bailey, 2005). Dans le contexte du DT1, l'hémostase du

glucose est perturbée en raison d'une carence absolue en insuline, ce qui entraînerait une série d'actions dépendantes, notamment une augmentation de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse, une réduction de l'absorption et de l'utilisation intramyocellulaires du glucose, une production accrue des acides gras libres (*free fatty acids* ; FFA), et ainsi de suite (Krentz and Bailey, 2005; Newton and Raskin, 2004). Ensemble, ces facteurs contribuent à l'hyperglycémie (Krentz and Bailey, 2005; Newton and Raskin, 2004).

1.1.2.4 Étiologie et pathogenèse du DT2

La pathogenèse du DT1 est en déficit absolu en insuline, alors qu'elle est assez différente pour le DT2. Le DT2 n'est pas associé à un manque d'insuline, mais il comprend deux autres défauts : soit la RI et la résistance aux sécrétagogues circulants qui se produit au niveau des cellules bêta pancréatiques (Kahn et al., 2014; Perley and Kipnis, 1966). En raison de la RI, l'hémostase du glucose est altérée, l'utilisation du glucose et le métabolisme étant considérablement réduits dans les muscles squelettiques et les tissus adipeux (DeFronzo, 2004; Eid et al., 2015; Landau et al., 1996). Pendant ce temps, comme la gluconéogenèse et la glycogénolyse ne sont pas inhibées dans les tissus hépatiques, plus de glucose est produit dans la circulation provoquant une hyperglycémie (Eid et al., 2015). Il importe aussi de noter que les FFA et les cytokines pro-inflammatoires générées par le tissu adipeux jouent un rôle important pour le développement de la RI (DeFronzo, 2004; Eid et al., 2015; Landau et al., 1996).

À ce jour, la pathogenèse sous-jacente du DT2 est élucidée comme mentionné ci-dessus. Normalement, l'insuline est libérée après les hausses de la glycémie perçues par les cellules pancréatiques. Par la suite, sous l'assistance de l'insuline, le glucose circulant est absorbée par le foie, le muscle squelettique et les tissus adipeux, alors que des métabolismes correspondants ont lieu en aval (Krentz and Bailey, 2005). Un message de rétroaction est transmis de ces tissus au pancréas, indiquant si une insuline supplémentaire est nécessaire ; si la RI existe alors plus d'insuline est libérée, l'hyperglycémie se produisant au moment où la demande d'insuline des tissus dépasse l'offre d'insuline des cellules β pancréatiques (Kahn et al., 2014).

	Encoded protein	Function of protein	Rare variant (allele/genotype)	Diabetes risk, odds ratio for rare allele (p)	Putative mechanism
CAPN10	Calpain-10	Cystein protease	Intronic SNP43, G	1.15 (p=0.002)	Unclear, possibly pleiotropic
			Intronic SNP44, C	1.17 (P=0.0003)	
PPARGC1	PPAR γ -coactivator-1	Transcriptional cofactor	Ser482	1.21 (p<0.001)	Unclear, possibly pleiotropic
SLC2A1	Glucose transporter 1	Facilitated transport	6.2 kB allele (Xbal)	1.76 (P<0.05)	Unclear
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor γ	Nuclear receptor (transcription factor)	Ala12	0.79 (p<0.0001)	Insulin resistance
GYS1	Glycogen synthase	Enzyme	A2 (Xbal)	0.60 (P=0.02)	Alteration of glycogen storage
IRS1	Insulin receptor substrate 1	Docking protein (insulin signaling)	Arg972	1.27(p=0.005)	Probably β -cell dysfunction
INS	Proinsulin	Hormone	class III VNTR	1.21 (P=0.01)	β -cell dysfunction
KCJN11	Potassium-inward rectifier 6.2	Potassium channel	Lys23	1.12 (p=0.002)	β -cell or α -cell dysfunction
ABCC8	Sulfonylurea receptor 1	Potassium channel (subunit)	T761 (exon 18)	2.28 (p<0.05)	Probably β -cell dysfunction

Table 2: Gènes candidats et polymorphismes génétiques associés au DT2 (adapté de (Stumvoll et al., 2005)).

1.2 Le Traitement diabétique

Le principe du traitement du diabète est de bien gérer le taux de glucose dans le sang, ce qui aiderait à améliorer l'état du DM, et à prévenir l'aggravation de l'état de santé actuel et/ou le développement de nouvelles complications. Outre les médicaments comme nous en discuterons plus bas, arrêter de fumer, abaisser la pression artérielle, éduquer sur le diabète, changer le mode de vie et contrôler le poids sont les approches naturelles qui contribuent à l'amélioration du DM (Sherman, 2005).

Il existe plusieurs médicaments classiques utilisés pour traiter le DM, comme suit.

1.2.1 L'insuline

L'insuline est produite par les cellules bêta pancréatiques des îlots de Langerhans. Son effet physiologique est de réguler les niveaux de glucose sanguin en circulation, en maintenant l'homéostasie métabolique. Lorsque le diabète se présente, le corps manque d'insuline et/ou fait face à la RI (Li et al., 2016). Par conséquent, l'application d'insuline exogène serait l'une des options de traitement, en particulier pour le DT1. Au fil des ans, les fournisseurs de dispositifs médicaux ont toujours cherché à remplacer la pompe à insuline encombrante par une conception plus petite et portable (McCall and Farhy, 2013). Ces nouvelles pompes sont arrivées sur le marché à la fin du siècle dernier et, avec la popularité qu'elles ont reçue, elles sont progressivement devenues la référence (McCall and Farhy, 2013). L'insuline est un médicament naturel et sûr à la fois pour le DT1 et le DT2 ; son efficacité ayant été largement prouvée qu'elle soit utilisée en monothérapie ou en association avec un adjuvant. Actuellement, il existe plusieurs façons de délivrer de l'insuline, notamment par voie orale, par inhalation, par injection, et ainsi de suite. La biodisponibilité de l'insuline est assez faible lorsqu'elle était administrée par voie orale pour les raisons suivantes : d'une part, l'environnement extrêmement acide de l'estomac détruira la structure, la protéolyse survenue au niveau de la voie intestinale réduirait les quantités d'insuline, et enfin, il y a toujours une perte lors de la transmission de la voie intestinale à la circulation sanguine (Carino and Mathiowitz, 1999; Fonte et al., 2013).

Les médicaments à base d'insuline inhalée sont théoriquement favorables car ils sont sûrs et sans injection. Diverses études ont montré que l'insuline inhalée pouvait atteindre le même effet qu'une autre injection à court terme. Cependant, il n'y a qu'un seul produit appelé insuline

Technosphere (®) présentement à l'essai (Santos Cavaiola and Edelman, 2014). En raison des performances de vente médiocres, le précédent médicament à base d'insuline Exubera®, approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA), a été retiré du marché (Santos Cavaiola and Edelman, 2014).

L'injection est la méthode la plus fréquemment utilisée, car elle atteint rapidement les tissus cibles avec une perte minimale. Comme indiqué précédemment, la méthode d'administration d'insuline affecte également les attentes de traitement ; des études ayant montré que l'administration intrapéritonéale donne de meilleurs résultats que l'administration sous-cutanée en raison de l'efficacité de l'administration et de la susceptibilité moindre de provoquer un incident d'hypoglycémie (Mudaliar and Edelman, 2001).

1.2.2 L'analogue de l'insuline

Les codes génétiques de l'insuline pourraient être restructurés à l'aide de la biologie moléculaire pour produire un analogue qui possède des caractéristiques physiologiques améliorées, telles qu'une meilleure absorption, distribution, métabolisme et excrétion (Wikipedia).

Les analogues de l'insuline pouvaient être classés en deux classes selon leurs propriétés physiologiques, l'analogue basal diffusant lentement dans le corps afin d'obtenir une longue durée tandis que l'analogue prandial était administré par injection et absorbé plus rapidement par rapport à l'insuline naturelle (Wikipedia).

Le premier analogue de l'insuline disponible sur le marché était Lispro, mais les enfants du premier cycle du secondaire n'étaient pas autorisés à utiliser de tels médicaments aux États-Unis (Puttagunta and Toth, 1998). Le Lispro a une structure conservatrice avec une transposition de seulement 2 acides aminés par rapport à l'insuline naturelle ; il est utilisé avec les repas car son action est rapide et s'atténue rapidement (Simpson et al., 2007). Des études cliniques ont montré que l'insuline naturelle était inférieure à Lispro en termes de réduction de l'HbA1c, tandis que la sécurité de Lispro avait été largement prouvée (Uy et al., 2012).

Outre le Lispro, il existe deux autres analogues de l'insuline qui appartiennent à l'analogue prandial, il s'agit respectivement d'Aspart produit par Nova Nordisk et de Glulisine produit par Sanofi-Aventis (Senesh et al., 2010). Il existe 3 analogues de longue durée, l'insuline Detemir

de Nova Nordisk, l'insuline Degludec de Nova Nordisk et l'insuline Glargine de Sanofi-Aventis (Pandeyarajan and Weiss, 2012).

Les patients DT1 et DT2 peuvent utiliser Detemir (Levemir®) comme thérapie basale ; en outre, l'auto-association et la forte affinité pour l'albumine étant la raison de la longue durée de Detemir (Keating, 2012). Detemir se lie à l'albumine par le biais d'une chaîne d'acides gras, l'absorption étant alors réduite, ce qui explique l'effet de plus longue durée et l'avantage notable de prévenir l'hypoglycémie nocturne (Philips and Scheen, 2006). Le métabolisme de l'insuline Degludec prend un temps assez long dans le corps (42 h), une dose par jour est réalisable en raison de cette caractéristique (Kalra and Gupta, 2015). Une étude avait indiqué que l'insuline Degludec ne possédait qu'une variabilité d'environ 25% de la capacité anti-hyperglycémiant par rapport à l'insuline Glargine, sur une base quotidienne, indiquant donc un effet plus stable (Heise et al., 2012).

Semblable à l'insuline Degludec, l'insuline Glarine pourrait aussi fournir un effet à long terme avec peu de risque d'hypoglycémie (Sharplin et al., 2009). En plus de cela, l'avantage de Glarine par rapport à l'insuline isophane était dû à sa plus grande capacité à réduire l'hyperglycémie (Sharplin et al., 2009). La FDA avait annoncé que le premier analogue à long terme de l'insuline était la Glargine (Goykhman et al., 2009). Sa pharmacodynamique et sa pharmacocinétique ont assuré sa popularité aux États-Unis, mais le résultat n'était pas idéal lorsqu'elle était administrée après le repas (Goykhman et al., 2009).

1.2.3 Les sécrétagogues d'insuline

La production d'insuline peut être induite par une classe de médicaments connue sous le nom de sécrétagogues de l'insuline dont les effets sont substantiés par des études cliniques dans le cadre du DT2 (Luna et al., 1999). Il existe deux classes de sécrétagogues, à savoir les sulfonylurées et les glinides.

Il y a environ un demi-siècle, les sulfonylurées sont entrées sur le marché des médicaments avec, comme avantages, un prix abordable, un potentiel favorable contre le diabète et une compatibilité avec la metformine (Sola et al., 2015). Le mécanisme sous-jacent de la propriété anti-diabète des sulfonylurées est lié aux canaux potassiques sensibles à l'adénosine triphosphate (ATP). Tout d'abord, les sulfonylurées administrées se lient au récepteur des sulfonylurées (SUR)

qui est une protéine membranaire associée au canal potassique, le canal K_{ATP} (Rendell, 2004). L'action des sulfonyles est la fermeture de ce canal, conduisant à la dépolarisation membranaire et à l'ouverture de canaux Ca^{2+} dépendant du voltage, ce qui entraîne finalement la libération d'insuline (Rendell, 2004). Parmi tous les hypoglycémisants oraux, les sulfonyles sont le membre le plus ancien, le tolbutamide et le chlorpropamide faisant partie de la première génération de sulfonyles (Gerich, 1985; Kalra et al., 2015). Par la suite, des secondes générations ont continuellement émergé sur le marché, tels que le glipizide, la gliquidone, le glibenclamide, et ainsi de suite. Présentement, une troisième génération a vu le jour dont le médicament représentatif est le glimépiride (Gerich, 1985; Kalra et al., 2015).

La première génération de sulfonyles avait entraîné de graves effets secondaires, notamment des maladies cardiovasculaires et l'hypoglycémie (Sola et al., 2015). Par contre, le glimépiride, issu de la troisième génération de la famille des sulfonyles, démontre une innocuité qui est largement testée et reconnue. Outre ses caractéristiques bien connues, comme le prix abordable, le contrôle optimal de la glycémie, le maintien d'un bon niveau de l'HbA1c, il ne nuit pas au préconditionnement ischémique et peut donc être sans danger pour le système cardiovasculaire (Basit et al., 2012).

L'interaction entre l'action des sulfonyles et le polymorphisme génétique a aussi été étudiée. Les gènes scrutés étaient liés à la prédisposition de DT2, au métabolisme et aux propriétés insulinothèques. Cependant, en raison de nombreux inconvénients, ces études de pharmacogénomique n'ont pas réussi à conseiller le régime thérapeutique actuel (Aquilante, 2010).

Le canal potassique situé au niveau des cellules bêta pancréatiques peut également être induit par les méglitinides (glinides) pour provoquer l'exocytose de l'insuline. La glycémie postprandiale serait donc régulée, et son potentiel est comparable aux sulfonyles en termes de réduction de l'HbA1c (Blickle, 2006). Étant donné que l'activité de liaison est plus faible que celle des sulfonyles, les méglitinides suivent donc un schéma d'action rapide et de courte durée (Wikipedia). L'amélioration de la RI et le contrôle de la glycémie postprandiale sont les mérites des méglitinides (Parhofer and Goke, 2002).

À notre connaissance, il existe plusieurs cibles pour le traitement du DT2, notamment la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), le récepteur de sulfonyle et le *peroxisome proliferator-activated receptor- γ* (PPAR γ). Outre la propriété insulinothèque, Scarsi et al. ont dévoilé l'autre

potentiel des sulfonylurées et des méglitinides, qui était l'agonisme au niveau de PPAR γ , et qui avait été prouvé dans certaines études *in vitro* (Scarsi et al., 2007). Ils avaient testé plusieurs composés choisis parmi les sulfamides hypoglycémiants et la classe des méglitinides, le médicament le plus performant étant la gliquidone. Cette étude était préliminaire et aucune étude *in vivo* n'a été réalisée. Malgré cela, elle a mis en lumière le développement d'un nouveau médicament diabétique à double cible, qui sont le PPAR γ et le récepteur des canaux potassiques des cellules bêta pancréatiques (Scarsi et al., 2007).

La classe des glinides comprend plusieurs médicaments célèbres, tels que le répaglinide, le natéglinide et lemitiglinide. Des études cliniques ont révélé que le traitement combiné du répaglinide et de la metformine obtenait de meilleurs résultats par rapport à l'un ou l'autre traitement seul, en termes de contrôle de la glycémie et d'abaissement de l'HbA1c, ce qui donne un aperçu de la stratégie médicale moins complexe avec un résultat optimal (Richard and Raskin, 2011).

Un niveau favorable de glycémie et de l'HbA1c a été atteint avec le traitement par natéglinide, notamment en post-prandial, alors que la production d'insuline a été améliorée par la monothérapie au nateglinide chez les patients prédiabétiques (Tentolouris et al., 2007). Selon Saloranta et al., la sécurité et le potentiel du natéglinide étaient avantageux. Dans une étude randomisée, en double aveugle et de 24 semaines comprenant 675 patients avec le DT2, la tolérance de natéglinide était acceptable avec 5.3% d'incidents d'hypoglycémie contre 1.2% pour le groupe placebo ($p < 0.05$) (Saloranta et al., 2002).

Le mitiglinide était moins favorable sur le marché des médicaments que le natéglinide et le repaglinide (Phillippe and Wargo, 2013). Les plus gros inconvénients étaient le prix, peu de données cliniques et la nécessité répétée d'administration, et le mérite était la durée plus longue et une meilleure affinité envers les cellules bêta, avec moins d'incidents d'hypoglycémie (Phillippe and Wargo, 2013).

1.2.4 Les biguanides

À ce jour, il existe trois composés appartenant à la famille des biguanides, à savoir la metformine, la phénformine et la buformine. La metformine est parmi les composés les plus puissants contre le DT2 attribués à sa bonne efficacité anti-hyperglycémiant. Par souci cardiovasculaire et

d'acidose lactique, le marché des médicaments a éliminé la buformine et la phénformine, de sorte que la metformine est non seulement le biguanide le plus performant mais aussi le plus sûr pour le traitement du DM (Foretz et al., 2014).

Comme mentionné ci-dessus, la metformine est le meilleur médicament dans la famille des biguanides pour le traitement du DT2, les patients avec le DT2 pourraient s'attendre à des avantages allant de la diminution de la RI, à la réduction de la production de glucose par le foie, la perte de poids, l'inhibition de l'absorption du glucose, la facilitation du transport relié au GLUT4, la bonne tolérance et la sécurité en termes d'hypoglycémie, et ainsi de suite (Collier et al., 2006; Olokoba et al., 2012).

Il existe un système complexe pour que la metformine exerce son effet anti-hyperglycémiant (Viollet et al., 2012). Tout d'abord, le complexe respiratoire-chaîne 1 des mitochondries est désactivé par la metformine dans le tissu hépatique (Viollet et al., 2012). Ensuite, avec la privation d'énergie transitoire, la voie AMPK est déclenchée, ce qui atténuerait la gluconéogenèse, résultant en moins de glucose produit par le tissu hépatique (Viollet et al., 2012). En plus de l'activité susmentionnée dans le foie, la metformine favorise également l'absorption et l'oxydation du glucose dans les tissus adipeux et les muscles squelettiques, tout en favorisant la glycogénèse et l'inhibition de l'oxydation des FFA dans les muscles squelettiques (Krentz and Bailey, 2005). En plus de cela, Viollet et al. ont également spéculé qu'il pourrait exister un autre mécanisme en parallèle avec l'AMPK basé sur les preuves d'une étude animale, suggérant en outre que la magie de la metformine repose sur la privation d'énergie dans le tissu hépatique (Viollet et al., 2012). La RI étant très pertinente avec les graisses ectopiques intramusculaires, l'inhibition de l'oxydation des FFA exacerberait donc la condition, ce qui explique pourquoi l'activation de l'AMPK pourrait améliorer la RI (Collier et al., 2006). La thérapie combinée d'insuline et de metformine pour le DT1 a été examinée, résultant en moins de demande de dose d'insuline, mais d'autres avantages et effets à long terme ne sont pas encore connus (Vella et al., 2010).

La metformine peut non seulement bénéficier au diabète, mais possède également un potentiel vasoprotecteur, comme celui d'inhiber les complications vasculaires, de maintenir la fonction endothéliale du système vasculaire, de prévenir les incidents thrombotiques, et ainsi de suite (Bailey, 2008).

Il convient de noter que l'hypoglycémie est rare avec la metformine et que les symptômes gastro-intestinaux temporellement modérés semblent être son effet secondaire le plus commun, tandis que le respect des contre-indications et des précautions pourrait minimiser le risque d'acidose lactique, qui reste déjà peu courant (Strack, 2008).

1.2.5 Les glitazones

Les glitazones, également appelées thiazolidinediones (TZD), sont utilisées pour traiter le DT2. Outre les effets secondaires graves, tels que l'hépatite, l'œdème, les maladies coronariennes, et autres, leur efficacité est comparable à celle de la metformine (Wikipedia).

Les TZD appartiennent à la famille des agonistes de PPAR γ . L'activation de PPAR γ régule diverses activités de transcription génétique, qui à leur tour affectent la bioactivité en aval, comme le métabolisme des glucides, l'inflammation, l'angiogenèse, le métabolisme des graisses, et ainsi de suite (Salomone, 2011). On sait que le tissu adipeux est le plus riche en PPAR γ , indiquant le site principal pour l'action des TZD (Heikkinen et al., 2007). Les hétérodimères avec le récepteur X de rétinoïdes (RXR) sont assemblés après l'activation de PPAR γ déclenchée par les TZD (Cariou et al., 2012). Par la suite, la transcription des gènes correspondante est activée via la transactivation (Cariou et al., 2012). On apprend que les principaux sites d'action du TZD sont le tissu adipeux, en particulier le tissu adipeux blanc (Chao et al., 2000). En outre, une étude animale avec des souris A-ZIP/F transgéniques -1 a révélé que l'oxydation des acides gras et l'élimination des triglycérides pouvaient avoir lieu indépendamment des tissus adipeux blancs (Chao et al., 2000). Dans une étude animale avec des souris transgéniques ap2/DTA, la RI a été améliorée après le traitement par la troglitazone (Burant et al., 1997). Ceci suggère que le muscle squelettique, en plus du tissu adipeux, pourrait également être un site de l'action antidiabétique des TZD, un tel mécanisme impliquant une amélioration du métabolisme des graisses et une meilleure élimination du glucose (Burant et al., 1997). Une étude a montré que, après le traitement des TZD, la gluconéogenèse peut être supprimée via PPAR γ 1 activé dans le foie (Wu et al., 1998). Le niveau de PPAR γ dans les muscles squelettiques peut aussi être régulé à la hausse, alors que la transduction du signal d'insuline dans le muscle squelettique et le tissu hépatique peut être modulée par des cytokines adipeuses dont la production est induite par PPAR γ (Wu et al., 1998). Une étude *in vitro* a indiqué que l'activité de la glycogène synthase I

était régulée à la hausse sous le traitement de la troglitazone dans les cellules de la lignée *human hepatoma* G2 (HepG2) et les cellules musculaires (BC3H-1), alors que la troglitazone inhibait significativement la gluconéogenèse chez les HepG2 (Ciaraldi et al., 1990). Cela pourrait être le mécanisme expliquant comment les TZD améliorent la RI du tissu hépatique et du muscle squelettique. Les preuves ont montré que l'oxydation des acides gras, la gluconéogenèse et la génération de glucose dans le tissu hépatique (via l'alanine ou le lactate/pyruvate) étaient supprimées à la fois par la troglitazone et la pioglitazone (Fulgencio et al., 1996). La RI pourrait également être attribuée à une altération de la synthèse du glycogène dans le muscle squelettique, qui pourrait se produire à tous ou une partie des stades de contrôle des fonctions, y compris l'hexokinase, la glycogène synthase et GLUT4 (Petersen and Shulman, 2002). De plus, la RI étant causée par les acides gras musculaires par le biais de la voie de la cascade de la sérine kinase, les voies musculaires et hépatiques peuvent être redirigées vers les adipocytes sous le traitement des TZD, entraînant une réduction de la RI (Petersen and Shulman, 2002). Les TZD peuvent exercer leur potentiel antidiabétique en stimulant les adipocytes à libérer des cytokines qui régulent le métabolisme dans le foie et les muscles squelettiques, comme la gluconéogenèse, le transport et l'utilisation du glucose, tout en diminuant l'expression des FFA et du TNF- α (Hauner, 2002).

Comme mentionné ci-dessus, les TZD peuvent présenter des effets secondaires graves, et ceci explique que plusieurs d'entre eux ne sont plus en service, y compris la troglitazone (hépatotoxicité) et la rosiglitazone (risque cardiovasculaire) (Wikipedia).

1.2.6 Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase

Une autre option pour le traitement du DM se concentre sur la réduction de l'absorption postprandiale du glucose. Avec le développement de la microbiologie, des α -glucosidases ont été découvertes à partir d'eucaryotes et de bactéries (Gabrisko, 2013). La nature de l' α -glucosidase est une enzyme hydrolysant les glucides qui modifierait la nourriture pour libérer le D-glucose (Kumar et al., 2011). Par conséquent, le ciblage des α -glucosidases serait une option pour le traitement du DM, car l'inhibition de cette enzyme entraînerait une diminution du glucose libéré par les aliments, ce qui contribuerait à son tour à une amélioration de la glycémie (Kumar et al., 2011).

Diverses α -glucosidases ont été découvertes dans la nature, allant de différentes espèces, notamment *Thermotoga maritima*, *Thermococcus sp.*, *Pyrococcus furiosus*, *Sulfolobus solfataricus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus sp.*, *Thermotoga maritima*, et ainsi de suite (Angelov et al., 2006; Costantino et al., 1990; Maruyama et al., 1994; Nakajima et al., 2003; Piller et al., 1996; Rivera-Marrero et al., 2001; Rolfsmeier and Blum, 1995).

L'acarbose est le principal médicament agissant comme inhibiteur de la α -glucosidases (AGI). Les patients atteints de DM peuvent s'attendre à un bénéfice supplémentaire de l'inhibition de l' α -glucosidase, comme la réduction de l'HbA1c et des cytokines inflammatoires, stabilisation de la plaque carotidienne et la réduction du risque de maladie cardiaque (Chiasson et al., 2003; Derosa and Maffioli, 2012; Osonoi et al., 2010).

Avec les progrès de l'exploration, les chercheurs ont découvert divers phyto-AGI, y compris les alcaloïdes, les composés phénoliques, les anthocyanes, les terpénoïdes, les flavonoïdes, et autres ; la conception d'aliments ou d'analogues de médicaments s'appuyant sur ces résultats (Kumar et al., 2011). L'innocuité des AGI est bien établie et peu d'incidents ont été signalés, les troubles gastro-intestinaux étant le seul problème remarqué, alors que l'observance des contre-indications en réduirait l'occurrence (Godbout and Chiasson, 2007).

1.2.7 Les incrétines

L'intestin grêle produit deux types d'hormones en réponse à la prise de nourriture, à savoir le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et le Glucose-dépendant Insulinotropic Polypeptide (GIP), qui permettent à plus d'insuline d'être sécrétée par les cellules bêta pancréatiques (Deacon and Ahrén, 2011).

Induire la libération d'insuline et inhiber la production de glucagon sont la fonction principale du GLP-1, alors que la compréhension de l'interaction entre le GLP-1 et son récepteur a contribué au développement d'analogues non peptidiques (Donnelly, 2012). Par ailleurs, la dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) décomposerait rapidement une quantité substantielle de GLP-1, conduisant à une faible concentration dans la circulation sanguine et l'action des peptides neuro-intestinaux sur le récepteur hépatique semble être la voie de signalisation principale, résultant en un contrôle efficace de la glycémie (Holst, 2007). En plus, la motilité gastro-intestinale est également régulée par le GLP-1 dans le côlon et l'intestin grêle, réduisant la digestion et

l'absorption, qui semble être un mécanisme important pour réduire le niveau de glucose dans la circulation (Marathe et al., 2011). La bioactivité hyperactivée dans la zone cérébrale qui régit la récompense et l'appétit a été réduite sous l'action de l'agoniste des récepteurs du GLP-1, suggérant une autre voie par laquelle le GLP-1 régule la glycémie en inhibant l'appétit (van Bloemendaal et al., 2014).

Les cellules K entéroendocrines sécrètent une autre hormone peptidique nommée GIP, qui est composée de 42 acides aminés et possède une structure hautement conservée chez les mammifères (McIntosh et al., 2009). Semblable au GLP-1, les bioactivités principale du GIP sont de stimuler la sécrétion d'insuline, alors que le ciblage multiple est possible en raison de la large distribution du GIP, comme dans les tumeurs neuroendocrines bronchiques, iléales, pancréatiques, et autres (Waser et al., 2012). L'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) dans les cellules bêta pancréatiques augmenterait à la suite de l'activation des récepteurs (couplés aux protéines G) du GIP et du GLP-1, ce qui conduirait à la production d'insuline, alors que l'apoptose des mêmes cellules pourrait être réprimée par le GIP et le GLP-1 (Seino et al., 2010). Le gène pro-apoptotique *bax* pourrait être inhibé par le GIP via la phosphorylation de la *Forkhead box protein O1* (Foxo1), tandis que l'expression du *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) est augmentée par le traitement GIP, entraînant une apoptose réduite et une prolifération améliorée au sein des cellules bêta pancréatiques (Kim et al., 2005).

Outre la propriété insulino trope commune, la potentialisation de la réserve d'énergie dans les tissus adipeux et la promotion de la formation osseuse sont la propriété exclusive de GIP par rapport au GLP-1 (Baggio and Drucker, 2007).

Compte tenu de l'innocuité et de l'efficacité des incrélines ainsi que de leur sensibilité au processus protéolytique, la demande d'analogue est nécessaire. Une demi-vie plus longue et des analogues d'incrétine tolérants au DPP4 sont disponibles sur le marché (Holscher, 2010). En plus de bénéficier aux patients diabétiques, ils peuvent également offrir une protection aux neurones cérébraux. Effectivement, la plasticité synaptique et la mémoire ont été préservées dans une étude *in vivo* de la maladie d'Alzheimer traitée avec des analogues du GLP-1 (val (8)), l'analogue représentatif disponible sur le marché actuel sont les analogues du GLP-1 exendin-4 (Exenatide, Byetta) et le liraglutide (Victoza) (Holscher, 2010).

1.2.8 Les inhibiteurs SGLT-2

Les inhibiteurs du cotransporteur sodium/glucose de type 2 (SGLT2) est une autre classe d'hypoglycémiant oraux utilisés pour traiter le DT2. La plupart du glucose en circulation est filtré au niveau glomérulaire et réabsorbé par le SGLT2 dans le tissu rénal (Ghosh et al., 2012). Avec l'interférence des inhibiteurs du SGLT2, plus de glucose est évacué par les voies urinaires au lieu d'être réabsorbé, entraînant une diminution de la glycémie, qui n'est pas affectée par l'insuline (Ghosh et al., 2012). À ce jour, trois inhibiteurs du SGLT2 se trouvent sur le marché pharmaceutique américain, à savoir la canagliflozine, l'empagliflozine (EMPA) et la dapagliflozine, et ont été approuvés par la FDA des États-Unis en 2013, 2014 et 2014, respectivement (Food and Administration, 2015; Grempler et al., 2012; Shubrook et al., 2015). En outre, l'EMPA a également fourni une amélioration supplémentaire de l'obésité, de la micro-albuminurie et de l'hypertension (Food and Administration, 2015; Grempler et al., 2012; Shubrook et al., 2015). D'autres avantages des inhibiteurs du SGLT2 incluent l'amélioration de l'obésité et de l'hypertension, mais les patients souffrant de maladie rénale ne bénéficieraient pas de l'inhibiteur du SGLT2, car la fonction tubulaire glomérulaire rénale est altérée (Kalra, 2014).

L'inhibiteur du SGLT2 est considéré comme un médicament sûr avec une légère perte de poids, une diminution de la pression artérielle et peu d'incidents d'hypoglycémie, mais l'infection des voies urinaires inférieures a été signalé comme un effet secondaire grave (Nauck, 2014). Le traitement de deuxième ou de troisième ligne du T2D inclurait des inhibiteurs de SGLT2. Effectivement, la thérapie combinée avec des inhibiteurs de SGLT2, comme l'ajout de sulfonilurée et de metformine ou de metformine seule, a été recommandée et le résultat était favorable (Cefalu and Riddle, 2015). L'étude du DT1 a montré que la demande d'insuline était diminuée, tandis que l'hyperfiltration glomérulaire était améliorée suivant le traitement avec l'inhibiteur de SGLT2, malgré le fait que ce dernier comporte un risque probable d'acidocétose (Rajeev and Wilding, 2015).

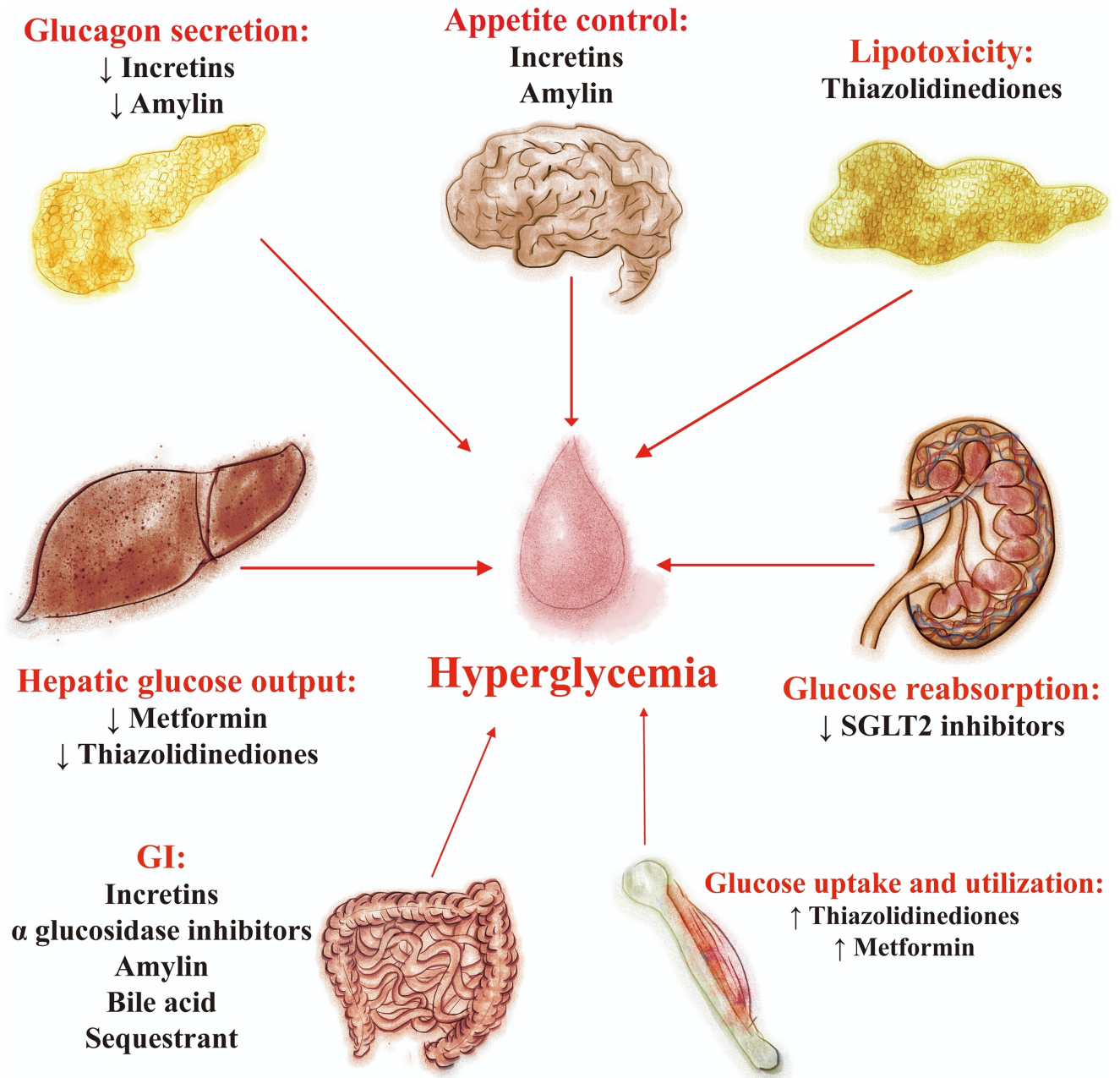


Figure 4: Sites d'action des thérapies pharmacologiques pour le traitement du DT2 (adapté de (Feingold, 2000)).

³ 1.2.9 Autres traitements et médicaments complémentaires et alternatifs

1.2.9.1 Autres traitements

Ce qui précède répertorie les principales catégories contemporaines de médicaments utilisés pour traiter le DT2, mais il existe également plusieurs autres traitements complémentaires, tels que les agonistes partiels du PPAR γ , la thérapie génique (Yamaoka, 2001), l'aspirine, les statines, le rimonabant, l'orlistat, les modulateurs sélectifs PPAR α/γ , et ainsi de suite.

1.2.9.2 Approches complémentaires et alternatifs

Les populations autochtones sont affectées de façon notable et disproportionnée par le DM en raison des changements environnementaux rapides combinée à d'une prédisposition génétique à la conservation des calories (Ekoe et al., 1990; Hegele et al., 1999; Nachar et al., 2013; Neel, 1962; Young et al., 2000). Par exemple, la prévalence de DT2 ajustée selon l'âge dans les populations Cris d'Eeyou Istchee (CEI - région de l'est de la Baie James au Québec, Canada) était en moyenne de 29% en 2009 (Kuzmina et al., 2010; Nachar et al., 2013). Les communautés criées souffrent également d'une prévalence plus élevée de complications diabétiques, notamment de néphropathie diabétique (ND). Cela est dû au moins en partie à l'inadéquation culturelle des traitements médicamenteux modernes (Garriguet, 2008; Hanley et al., 2005).

Dans les pays occidentaux, l'*end-stage renal disease* (ESRD) est principalement causée par la ND (Ritz and Orth, 1999). Le développement de la protéinurie, considérée comme la caractéristique clé de la ND, est lié à la baisse de la filtration glomérulaire, conduisant éventuellement à une perte progressive de la fonction rénale (Fineberg et al., 2013). L'hypertension et un mauvais contrôle glycémique sont généralement associés à la ND (Adler et al., 2000; Stratton et al., 2000). Enfin, il est bien établi que l'apoptose des cellules tubulaires rénales contribue au développement de la ND, conduisant à une perte progressive de masse rénale (Habib, 2013; Kumar et al., 2004; Sanchez-Nino et al., 2010).

L'Équipe de recherche des instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) sur les médecines autochtones antidiabétiques (IRSC-TAAM) a été créée en 2003 dans le but de trouver des approches complémentaires et alternatives culturellement pertinentes à la prévention et à la

³ Cette page a été traduite à partir d'extraits des articles 1, 2 et 3 de la thèse en cours.

gestion du DT2 pour les diabétiques autochtones canadiens. ⁴Dix-sept espèces végétales issues de la pharmacopée traditionnelle crie de la Baie James ont été identifiées par des enquêtes ethnobotaniques et testées à l'aide d'une plateforme complète d'essais biologiques et de modèles animaux d'obésité et de diabète pour identifier la capacité des plantes à améliorer le contrôle glycémique (Fraser et al., 2007; Haddad et al., 2012; Harbilas et al., 2009; Harris et al., 2012; Nachar et al., 2013; Spoor et al., 2006).

Dans la présente thèse, nous avons cherché à déterminer l'activité des 17 mêmes extraits de plantes pour offrir une protection rénale et, par conséquent, leur potentiel pour atténuer la ND. Pour ce faire, nous avons développé un essai biologique basé sur des cellules bien connues MDCK, une cellule rénale d'origine tubulaire distale, que nous avons stressé avec un milieu hypertonique (Erkan et al., 2005; Hizoh and Haller, 2002; Horio et al., 2001; Terada et al., 2001; Yoshida et al., 2002; Zhang et al., 1995). Nous avons ensuite utilisé la cytométrie en flux et les réactifs de coloration pour l'apoptose (AnnV) et la nécrose (PI). Enfin, nous avons évalué le rôle de plusieurs caspases pour commencer à comprendre les mécanismes sous-jacents à l'activité protectrice rénale de certaines espèces végétales.

Rhododendron groenlandicum L. (Ericaceae), communément appelé thé du Labrador, est l'une des plantes antidiabétiques les plus prometteuses utilisées traditionnellement par les Cris de l'Est de la Baie James (Eid and Haddad, 2014). *In vitro*, des essais biologiques ont suggéré que *R. groenlandicum* agit comme la metformine dans le muscle squelettique (Martineau et al., 2010) et comme les thiazolidinediones (également appelés glitazones) dans le tissu adipeux (Spoor et al., 2006). Dans une récente étude *in vivo*, l'extrait de plante a été bénéfique pour restaurer les mécanismes homéostatiques du glucose chez des souris nourries avec une DG (Ouchfoun et al., 2015). Notamment, *R. groenlandicum* a réduit la glycémie et l'insuline tout en améliorant la réponse à un test de tolérance à un OGTT. Dans la présente étude, les effets de la DG sur l'intégrité rénale ont été évalués en présence ou en l'absence de la plante. Nous rapportons que le traitement à *R. groenlandicum* a tendance à améliorer la micro-albuminurie et à réduire de manière significative la fibrose rénale, la stéatose rénale et la coloration du Bmf.

Notre équipe a récemment achevé une nouvelle étude de dépistage de la protection rénale de 17 plantes médicinales antidiabétiques identifiées précédemment (Eid and Haddad, 2014; Harris et

⁴ Cette page a été traduite à partir d'extraits des articles 1, 2 et 3 de la thèse en cours.

al., 2012)⁵ afin de répondre au souhait de nos partenaires du CEI (Li et al., 2016). *A. balsamea* s'est révélé posséder le potentiel de protection rénale et anti-apoptotique le plus puissant parmi ces 17 plantes médicinales crie, exerçant ses effets bénéfiques principalement en inhibant la voie apoptotique mitochondriale. Nos travaux antérieurs avec des extraits d'*A. balsamea* ont démontré qu'ils peuvent améliorer de manière significative l'absorption de glucose basale et celle stimulée par l'insuline dans les cellules musculaires squelettiques et les adipocytes en culture (Spoor et al., 2006). La plante était également la plus puissante des espèces crie pour atténuer les mécanismes de production de glucose des cellules hépatiques *in vitro* par des mécanismes insulino-dépendants et indépendants de l'insuline (Eid and Haddad, 2014). De plus, une autre étude de dépistage *in vitro* dans notre laboratoire utilisant les mêmes 17 plantes a montré qu'*A. balsamea* était remarquable pour maintenir l'homéostasie du glucose dans le foie en inhibant l'activité de la glucose 6-phosphatase (G6Pase) et en activant la glutamine synthétase (GS) (Nachar et al., 2013).

1.3 Complications diabétiques

Avec le développement du DM, une série de complications se présenterait ; les maladies macrovasculaires et microvasculaires étant les principaux types (Li et al., 2016). Les principales complications diabétiques comprennent la ND, les maladies cardiovasculaires, la neuropathie diabétique, la RD, et ainsi de suite (Li et al., 2016). Les preuves indiquent que le stress oxydatif est dominant dans la pathogenèse des complications diabétiques, alors que la signalisation affaiblie de l'insuline y contribue également, attirant davantage l'attention sur ces complications de nos jours (Giacco and Brownlee, 2010; Hage Hassan et al., 2014; Papatheodorou et al., 2015). Bien que les complications diabétiques soient le résultat direct de l'hyperglycémie causée par les troubles métaboliques, Maghbooli et collaborateurs mette de l'avant que la raison fondamentale est attribuable à l'effet d'interaction entre les facteurs génétiques et les problèmes environnementaux (Maghbooli et al., 2014). Des études sur les mécanismes moléculaires des complications diabétiques ont suggéré que l'hyperglycémie chronique provoquait un déséquilibre entre les facteurs/événements vasculaires bénéfiques, y compris le facteur de

⁵ Cette page du début à la section 1.3 (Complications diabétiques) a été traduite à partir d'extraits des articles 1, 2 et 3 de la thèse en cours.

croissance dérivé des plaquettes, l'insuline, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), la protéine C activée et des facteurs toxiques vasculaires tels que les produits finaux de glycation avancés (AGEs), la voie diacylglycérol/protéine kinase C, la voie hexosamine, la voie polyol, le stress oxydatif, et ainsi de suite (Kitada et al., 2010).

1.3.1 La rétinopathie

La RD est une maladie pathologique qui survient au niveau du tissu rétinien et qui pourrait conduire à la cécité. Elle peut également être détectée avant le diagnostic clinique, des changements graduellement subtils pouvant indiquer le début, tels que l'adhésion leucocytaire, le micro-anévrisme, l'œdème maculaire, la dégénérescence capillaire (Al-Shabrawey et al., 2015). Environ 5% des 50 millions de cas de cécité dans le monde sont causées par la RD qui mérite l'attention avec les autres étiologies (Viswanath and McGavin, 2003).

Le mécanisme moléculaire de l'apparition de la RD a clarifié que divers incidents, tels que l'inflammation, les lésions vasculaires, le stress du réticulum endoplasmique, et autres, ainsi que plusieurs voies de signalisation, le polyol, la protéine kinase C, le peroxy-nitrite, et autres, étaient impliqués (Coucha et al., 2015). La thérapie anti-VEGF est un traitement approuvé par la FDA pour la RD, le succès clinique de l'anti-VEGF s'étant également révélé être une option pour la RD proliférative et l'œdème maculaire diabétique (Cheung et al., 2014; Cornel et al., 2015). En plus de cela, la chirurgie de la vitrectomie est une autre option thérapeutique pour les patients RD, les patients RD devant cependant être informés du risque d'une hémorragie vitréenne prolongée (Shah and Chen, 2011). Il convient de noter que l'on a appliqué la photocoagulation au laser comme traitement primaire pour la RD depuis le milieu du siècle dernier (Yun and Adelman, 2015). Bien que le mécanisme n'a pas encore été prouvé, l'hypothèse a suggéré l'implication de la fermeture du microanévrisme fuyant, de la stimulation de l'épithélium pigmentaire rétinien et de l'induction de la prolifération des cellules endothéliales (Yun and Adelman, 2015).

1.3.2 La neuropathie

La principale caractéristique de la neuropathie diabétique est la dysfonction nerveuse périphérique, la pathogenèse pouvant impliquer des troubles métaboliques et ischémiques

(Bansal et al., 2006). La polyneuropathie distale symétrique avec de nombreuses douleurs était le symptôme le plus rapporté, et le traitement coûteux comprend des hypoglycémifiants oraux, des anticonvulsivants et des antidépresseurs (Callaghan et al., 2012). Bien que la gestion de la douleur soit la principale préoccupation en ce qui concerne le traitement, les facteurs de risque doivent être étroitement surveillés, tels que l'hypertension artérielle, le contrôle de la glycémie, l'hyperlipidémie, et ainsi de suite (Russell and Zilliox, 2014). L'amputation non traumatique d'un membre pourrait être causée par une polyneuropathie distale symétrique, le mécanisme moléculaire indiquant que les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) pourraient jouer le rôle clé dans cette neuropathie diabétique autonome (Edwards et al., 2008).

Javed et collaborateurs ont résumé que les patients n'ont que deux options de traitement après la confirmation du diagnostic ; ils peuvent choisir, soit d'améliorer les symptômes, soit de cibler la pathogenèse (Javed et al., 2015). Une série de cibles de pathogenèse ont été identifiées, telles que la dysfonction vasculaire, la génération élevée des DRO, l'activation du flux de la voie polyol, l'hyperlipidémie, l'augmentation de l'hyponémie endoneurale, la diminution du flux sanguin du nerf, l'augmentation de la formation des AGEs, et ainsi de suite (Javed et al., 2015). On pensait que la sensibilisation, le système nerveux sympathique, les canaux sodiques et la potentialisation à long terme étaient impliqués dans le mécanisme concernant la douleur neuropathique diabétique (Kaur et al., 2011). Une étude clinique a montré que la douleur de la neuropathie diabétique pouvait être atténuée par les analgésiques opioïdes, un des médicaments représentatifs étant l'oxycodone (Watson et al., 2003). Le score à la *visual analog scale* (VAS, utilisé pour mesurer la douleur) a été significativement réduit par l'oxycodone sous de multiples aspects, par exemple, une douleur quotidienne moyenne largement réduite (21.8 +/- 20.7 contre 48.6 +/- 26.6 mm VAS, P = 0.0001), suggérant une valeur clinique et entraînant une amélioration de la qualité de vie des patients (Watson et al., 2003).

1.3.3 Les maladies cardiovasculaires

Les décès liés au diabète sont principalement attribués aux maladies cardiovasculaires, dont la pathogenèse comprend plusieurs troubles métaboliques, notamment la dysfonction diastolique causée par le stress oxydatif et l'inflammation, les troubles endothéliaux induits par la neuropathie autonome diabétique et la biodisponibilité réduite de l'oxyde nitrique (Dokken,

2008). De plus, l'hyperglycémie est considérée comme un facteur important contribuant aux maladies cardiovasculaires via les dommages à l'endothélium vasculaire, alors que la pénurie d'insuline ou la RI agirait de concert avec l'hyperglycémie, entraînant une altération de la fonction endothéliale (Punthakee et al., 2007).

Des études ont révélé que le diabète prédisposait les patients à plus de 2 fois le risque de mortalité causée par les maladies cardiovasculaires, alors que la survenue additionnelle d'un infarctus aigu du myocarde était susceptible de provoquer des décès importants en moins d'un an (Laakso, 2010; Miettinen et al., 1998). Les femmes diabétiques sont plus prédisposées aux maladies coronariennes que les hommes diabétiques dans un suivi de 13 ans basé sur une étude de grande envergure composée de plus de 2000 participants, qui était due, au moins en partie, à un niveau de facteur de risque élevé, tel qu'un niveau plus élevé de dyslipidémie athérogène, de tension artérielle, de glycémie élevée, et ainsi de suite (Juutilainen et al., 2004).

Le régime de traitement était axé sur la détection précoce, la gestion de l'hyperglycémie diabétique, de l'hyperlipémie, de l'hypertension par des interventions médicamenteuses, nonobstant, l'importance d'apporter une attention particulière à l'adaptation du mode de vie (Lorber, 2014). Deux principaux types de médicaments contre les maladies cardiovasculaires sont disponibles sur le marché : ceux visant à améliorer l'hyperlipidémie, tels que Certriad et Darapladib, ainsi que les médicaments antithrombotiques, notamment le Ticagrelor, le Rivaroxaban, le SCH530348 et le Dabigatran (Stern and Lebowitz, 2010).

1.3.4 La néphropathie diabétique

La micro-albuminurie est le signe précoce typique de la ND, d'autres caractéristiques pouvant également indiquer le début, telles que la diminution de la filtration glomérulaire et les lésions glomérulaires, alors que la population âgée est plus sujette à l'ESRD causée par la ND (Lim, 2014). La mortalité due aux maladies cardiovasculaires est principalement causée par la ND, de plus, la micro-albuminurie et la macro-albuminurie sont deux sous-classes de la ND selon la gravité (Zelmanovitz et al., 2009). De plus, des changements pathologiques comme l'hyperperfusion, une perméabilité capillaire accrue aux macromolécules et une hyperfiltration sont présents au stade précoce de la ND (Rahimi, 2012; Raptis and Viberti, 2001). La ND est également corrélée positivement avec le polymorphisme d'insertion/suppression du gène de

l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et il convient de noter que le facteur ethnique peut être impliqué dans un tel effet de polymorphisme (Rahimi, 2012; Raptis and Viberti, 2001). Le facteur de risque de la ND peut être classé en deux catégories, le facteur génétique appartient à la catégorie non modifiable, tandis que l'hyperlipémie, le tabagisme, la filtration glomérulaire, l'hypertension artérielle et la glycémie élevée chronique sont des facteurs qui peuvent être modifiés (Krolewski et al., 1985; Ossman, 2006). Schena et al. ont résumé le mécanisme pathologique de la ND, qui est l'expression régulée à la hausse du diacylglycérol et des AGEs, et l'activation de la protéine kinase C, en parallèle avec des changements pathologiques hémodynamiques tels que le stress de cisaillement, la micro-albuminurie et l'hyperfiltration glomérulaire, et autres, à la suite d'une élévation chronique de la glycémie (Schena and Gesualdo, 2005). À la suite de ces anomalies, le *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) est libéré par les reins, causant une série de bio-activités qui entraînent une expansion mésangiale et un épaississement de la membrane basale glomérulaire (Schena and Gesualdo, 2005).

L'amélioration de la glycémie et la réduction de l'hypertension sont les thérapies traditionnelles pour la ND, mais le résultat n'était pas satisfaisant car plusieurs patients étaient encore soumis à l'hémodialyse ; ainsi le nouveau régime thérapeutique repose sur l'inhibition des AGEs et du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), qui peuvent obtenir des résultats favorables en améliorant les lésions rénales (Fukami et al., 2008).

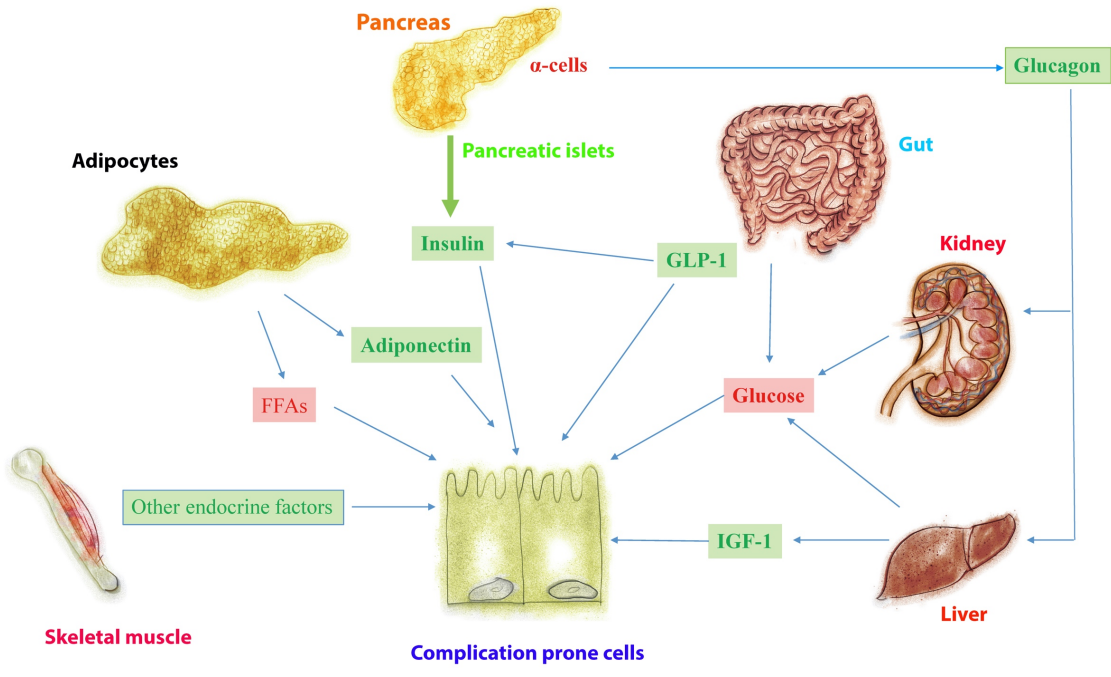


Figure 5: Interactions entre les voies homéostatiques du glucose et les cellules cibles sensibles aux complications du diabète. (adapté de (Forbes and Cooper, 2013)).

1.4 La néphropathie diabétique et l'apoptose

L'apoptose a été observée dans le DM, et il existe plusieurs mécanismes sous-jacents, comme p53, l'activation de la voie de la caspase-3 activée par le cytochrome c, le stress oxydatif via les espèces azotées et les DRO causés par l'hyperglycémie (Adeghate, 2004). Une autre étude a remarqué que le CD36 était impliqué dans les événements apoptotiques survenus au niveau de l'épithélium tubulaire proximal lors d'une étude clinique sur des patients ND, et un modèle en deux étapes a été créé pour expliquer la dégénérescence épithéliale tubulaire pour ND (Susztak et al., 2005).

Le test TUNEL ainsi que la microscopie électronique ont prouvé l'existence d'une apoptose dans les cellules endothéliales, les tubules proximaux, les cellules interstitielles et les tubules distaux via des échantillons de biopsie humaine, mais il s'agissait d'une étude préliminaire incluant seulement 5 patients ND (Kumar et al., 2004). Une étude *in vitro* avec des cellules épithéliales tubulaires proximales a également montré que la production de peroxy-nitrite (ONOO-) serait induite par un taux élevé de glucose, entraînant une apoptose via la voie de la caspase, indiquant le changement pathologique de la ND (Allen et al., 2003; Kumar et al., 2004). Une étude *in vitro* a révélé que les DRO étaient générés à la suite des stimuli élevés de glucose et ensuite impliqués dans l'apoptose induite par l'hyperglycémie, l'événement pivot pouvant être une diminution de l'expression de la protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X (XIAP) qui possède un potentiel anti-apoptotique (Verzola et al., 2004).

Simone et al. ont également révélé que la protéine kinase B était activée par la génération des DRO intracellulaires induite par l'hyperglycémie, qui a ensuite phosphorylé la tubérine, entraînant une expression réduite de la 8-oxoguanine glycosylase (une enzyme pour réparer l'ADN), contribuant au mécanisme moléculaire de l'apoptose pendant la ND (Simone et al., 2008).

La protéine pro-apoptotique Bmf comprend uniquement le domaine BH-3 et les études *in vitro* ont indiqué que dans les cellules des *rat renal proximal tubules cells* (RPTC), l'expression du Bmf était régulée à la hausse en réponse à une augmentation du taux de DRO et de TGF- β 1 causée par un milieu avec un contenu de glucose élevé, entraînant une augmentation de l'événement apoptotique (Grespi et al., 2010; Lau et al., 2012). Une étude *in vivo* avec des souris diabétiques et des échantillons de patients diabétiques issus d'une étude clinique agissent de

concert avec une étude *in vitro*, pour suggérer le potentiel du Bmf sur l'atrophie tubulaire diabétique et l'apoptose au sein du RPTC, ces résultats étant conformes aux études chez les humains (Lau et al., 2012).

La *mammalian target of rapamycin* (mTOR) est activée en raison du stimulus chronique de l'hyperglycémie diabétique, par conséquent, la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est désactivée et davantage de cytochrome c est sécrété (Velagapudi et al., 2011). Par la suite, la caspase 3 est clivée en réponse à l'augmentation du cytochrome c, finalement, le *transcriptional regulator Yin Yang 1* (YY1) pourrait pénétrer dans le noyau et provoquer l'apoptose, un tel mécanisme pouvant être un élément important du ND (Velagapudi et al., 2011).

1.5 Objectif de cette étude⁶

Tel que mentionné plus haut et discuté plus en détail dans les chapitres suivants, les populations autochtones à travers le monde souffrent d'une manière disproportionnée du diabète et des complications qui en découlent (Kuzmina et al., 2010). Une des raisons avancées est que la médecine moderne ne soit pas bien adaptée à la culture autochtone, ainsi les autochtones peuvent ne pas suivre adéquatement leurs prescriptions médicamenteuses lorsqu'il survient des effets secondaires ou lorsqu'ils se sentent mieux, ce qui est conforme aux préceptes de leur médecine traditionnelle (Garriguet, 2008; Hanley et al., 2005). Dans une tentative de trouver des traitements complémentaires et alternatifs, culturellement pertinents, notre équipe a donc testé le potentiel antidiabétique de plantes sélectionnées, utilisées comme remèdes traditionnels pour plusieurs symptômes du diabète dans les communautés des Cris de la Baie James orientale (Harris et al., 2012). Des études antérieures ont porté sur 17 extraits de plantes prometteuses identifiées au moyen d'enquêtes ethnobotaniques (Fraser et al., 2007; Leduc et al., 2006). Ces plantes ont été testées en utilisant une plate-forme complète de tests biologiques et des modèles animaux de l'obésité et du diabète dans le but d'identifier la capacité des plantes pour améliorer le contrôle glycémique (Fraser et al., 2007; Haddad et al., 2012; Harbilas et al., 2009; Harris et al., 2012; Nachar et al., 2013; Spoor et al., 2006). Tel que mentionné précédemment, les diabétiques Cris souffrent de manière disproportionnée des complications du DT2, notamment

⁶ Cette page à partir de 'Objectif de cette étude' en cours a été traduite à partir d'extraits des articles 1, 2 et 3 de la thèse en cours.

de la ND. Par conséquent, les communautés Cris nous ont demandé de vérifier le potentiel⁷ de leurs plantes médicinales à protéger le rein.

⁷ Cette page a été traduite à partir d'extraits des articles 1, 2 et 3 de la thèse en cours

Ethnobotanical

Species	Common name	Cree name	Family	Plant part	Source	Ranking
<i>Sorbus decora</i> (Sarg.) C.K. Schneid.	Showy mountain ash	Maskumanaatikw	Rosaceae	Inner bark	M, W	7
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	Mountain cranberry	Wiishichimanaanh	Ericaceae	Berries	M, W	12
<i>Sarracenia purpurea</i> L.	Pitcher plant	Ayikataas	Sarraceniaceae	Whole plant	M	13
<i>Populus balsamifera</i> L.	Balsam poplar	Mash-mitush	Salicaceae	Inner bark	M	16
<i>Rhododendron groenlandicum</i> (Oeder) Kron and Judd	Labrador tea	Kaachepukw	Ericaceae	Leaves	M, W	2
<i>Rhododendron tomentosum</i> (Stokes) Harmaja subsp. <i>subarcticum</i> (Harmaja) G. Wallace	Northern Labrador tea	Wiisichipukw	Ericaceae	Leaves	W	1
<i>Salix planifolia</i> Pursh	Tealeaf willow	Piyeuwaatikw	Salicaceae	Inner Bark	M, W	10
<i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.	Balsam fir	Inaast	Pinaceae	Inner bark	M	8

<i>Picea mariana</i> (P. Mill.) BSP	Black spruce	Iinaatikw	Pinaceae	Cones	M, W	5
<i>Pinus banksiana</i> Lamb.	Jack pine	Uschisk	Pinaceae	Cones	M, W	14
<i>Alnus incana subsp. rugosa</i> (Du Roi) R.T. Clausen	Speckled alder	Atuuspiih	Betulaceae	Inner bark	M	11
<i>Larix laricina</i> Du Roi (K. Koch)	Tamarack	Waatinaakan	Pinaceae	Inner bark	M, W	3
<i>Juniperus communis</i> L.	Ground Juniper	Kaakaachuminatuk	Cupressaceae	Berries	W	4
<i>Kalmia angustifolia</i> L.	Sheep laurel	Uischichipukw	Ericaceae	Leaves	M, W	9
<i>Gaultheria hispidula</i> (L.) Muhl.	Creeping snowberry	Piyeumanaan	Ericaceae	Leaves ^a	M	17
<i>Lycopodium clavatum</i> L.	Common clubmoss	Pastinaakwaakin	Lycopodiaceae	Whole plant	M	15
<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	White spruce	Minhiikw	Pinaceae	Needles	M, W	6

Le classement ethnobotanique combiné des 17 espèces est basé sur les valeurs d'importance syndromiques, calculée selon Leduc et al., 2006.

Les ^abaies ne sont pas disponibles.

Table 3: Liste des espèces de plantes médicinales CEI utilisées dans le traitement des symptômes du diabète (adaptation de (Harbilas et al., 2009)).

Dans le premier chapitre de la thèse, nous explorons donc le potentiel protecteur rénal du thé du Labrador dans un modèle de souris soumises à une DG pour induire l'obésité, la RI et un état diabétique léger. Les effets de la DG sur l'intégrité rénale ont été évalués en présence ou en l'absence de la plante. Nous rapportons que le traitement avec *R. groenlandicum* tend à améliorer la micro-albuminurie et réduit de façon significative la fibrose rénale, la stéatose rénale et l'expression de Bmf.

Dans l'étude qui suit, nous avons cherché à déterminer l'activité des mêmes 17 extraits de plantes pour assurer une protection rénale et, par conséquent, leur potentiel pour atténuer la néphropathie diabétique. Pour ce faire, nous avons développé un test biologique basé sur des cellules de la célèbre lignée MDCK, une cellule du rein d'origine tubulaire distale que nous avons mise à l'épreuve avec un milieu hypertonique (Erkan et al., 2005; Hizoh and Haller, 2002; Horio et al., 2001; Terada et al., 2001; Yoshida et al., 2002; Zhang et al., 1995). Nous avons ensuite utilisé la cytométrie en flux et des réactifs de coloration pour l'apoptose (AnnV) et la nécrose (PI). Enfin, nous avons évalué le rôle de plusieurs caspases pour commencer à comprendre les mécanismes sous-jacents de l'activité de protection rénale de certaines espèces végétales.

Selon cette deuxième étude, *A. balsamea* se distinguait comme l'une des plus puissantes plantes de protection rénale chez les Cris qui montrait des activités anti-apoptotiques importantes, en particulier au niveau des caspases 3 et 9. Puisque la *A. balsamea* est une espèce végétale qui se compose de milliers de composés, nous avons eu pour but, dans une troisième étude, d'identifier le/les principe/s actif/s le/s plus puissant/s. Dans le futur, nous aimerions analyser plus profondément les mécanismes impliqués en commençant par les caspases, ainsi que les facteurs pro- ou anti-apoptotiques tels que Bmf, BAD, BAX, et ainsi de suite.⁸

⁸ Cette page a été traduite à partir d'extraits des articles 1, 2 et 3 de la thèse en cours.

Chapitre 2 : Article 1

Publié dans le Journal Pharmaceutical Biology 2016 26 février : 1-9.

Contribution de chaque co-auteur

J'avais conçu le projet, effectué tous les travaux expérimentaux, analysé les données et rédigé l'article.

Antoine Brault a contribué au traitement des animaux.

Mayra Luz Sanchez Villavicencio a contribué au traitement des animaux.

Alaa Badawi a contribué à la revision du manuscrit.

Dr John Arnason a préparé les extraits de plante et a révisé le manuscrit.

Dr Pierre S. Haddad est mon directeur de recherche qui m'a supervisé tout le long de ma période d'étude. Il a initié le cadre conceptuel du projet, aidé dans l'interprétation des données et corrigé l'article.

***Rhododendron groenlandicum* (Labrador tea), an antidiabetic plant from the traditional pharmacopoeia of the Canadian Eastern James Bay Cree, improves renal integrity in the diet-induced obese mouse model**

Auteurs

Shilin Li^{1,2}, Antoine Brault^{1,2}, Mayra Luz Sanchez Villavicencio^{1,2}, Pierre S. Haddad^{1,2*}.

Affiliation

¹Natural Health Products and Metabolic Diseases Laboratory, CIHR Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines, Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Canada, H3C 3J7.

²Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, Montreal, Canada.

* Author to whom correspondence should be addressed:

Pierre S. Haddad, PhD

Department of Pharmacology

Université de Montréal

P.O. Box 6128, Downtown Postal Station

Montreal (Quebec)

Canada H3C 3J7

Abstract

Content Our team has identified Labrador tea [*Rhododendron groenlandicum* L. (Ericaceae)] as a potential antidiabetic plant from the traditional pharmacopoeia of the Eastern James Bay Cree. In a previous *in vivo* study, the plant extract was tested in a high-fat diet (HFD)-induced obese model using C57BL/6 mice and it improved glycaemia, insulinaemia and glucose tolerance.

Objective In the present study, we assessed the plant's potential renoprotective effects.

Materials and methods *Rhododendron groenlandicum* was administered at 250 mg/kg/d to mice fed HFD for 8 weeks to induce obesity and mild diabetes. Histological (periodic acid–Schiff (PAS), Masson and Oil Red O staining), immunohistochemical (IHC) and biochemical parameters were assessed to evaluate the renoprotective potential of *R. groenlandicum* treatment for an additional 8 weeks.

Results Microalbuminuria and renal fibrosis were developed in HFD-fed mice. Meanwhile, there was a tendency for *R. groenlandicum* to improve microalbuminuria, with the values of albumin-creatinine ratio (ACR) reducing from 0.69 to 0.53. Renal fibrosis value was originally 4.85 arbitrary units (AU) in HFD-fed mice, dropped to 3.27 AU after receiving *R. groenlandicum* treatment. *Rhododendron groenlandicum* reduced renal steatosis by nearly one-half, whereas the expression of Bcl-2-modifying factor (BMF) diminished from 13.96 AU to 9.43 AU.

Discussion and conclusions Taken altogether, the results suggest that *R. groenlandicum* treatment can improve renal function impaired by HFD.

Key words: BMF, fibrosis, HFD, microalbuminuria, vacuoles

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases in which a person has high blood glucose. Several symptoms are associated with diabetes, including hyperglycaemia, polyuria, polydipsia and hyperphagia (Coffman et al. 2012). Diabetes is due to either the pancreas not

producing enough insulin (Type 1 diabetes) or cells of the body do not respond properly to the insulin that is produced (Type 2 diabetes, T2D) (Forbes & Cooper 2013).

If untreated, diabetes can cause many complications, which can be attributed to two main categories: microvascular disease (damage to small blood vessels) and macrovascular disease (damage to larger arteries). Acute complications include diabetic ketoacidosis and non-ketotic hyperosmolar coma, whereas serious long-term complications include heart disease, kidney failure and damage to the eyes.

T2D is characterized by insulin resistance in major target organs such as liver, muscle and adipose tissues; however, decreased insulin secretion by the β pancreatic cells is also involved (Cheng et al. 2009). So far, around 370 million people in the world have been suffering from diabetes, among which more than 9 million are Canadian. More importantly, the risk of suffering T2D diabetes in Aboriginal population is three to five times higher than the general Canadian population (Ekoe et al. 1990; Nachar et al. 2013). For instance, data from 2009 indicated that the age-adjusted prevalence of T2D in the Cree populations of Eeyou Istchee (Eastern James Bay area of Quebec, Canada) was 29% on an average (Kuzmina et al. 2010). These communities also suffer from higher prevalence of diabetic complications, notably nephropathy. This is due, in part, to the cultural inappropriateness of modern drug treatments (Hanley et al. 2005; Garriguet 2008).

In an attempt to find culturally relevant complementary and alternative treatments, our team has been testing the antidiabetic potential of selected plants used as traditional medication for several diabetic symptoms in these Cree communities (Haddad et al. 2012). Previous studies have focused on 17 promising plant extracts identified through ethnobotanical surveys (Leduc et al. 2006; Fraser et al. 2007). These plants have been tested using a comprehensive platform of bioassays and animal models of obesity and diabetes in order to identify the plants' capacity to improve glycaemic control (Spoor et al. 2006; Fraser et al. 2007; Harbilas et al. 2009; Haddad et al. 2012; Nachar et al. 2013).

Rhododendron groenlandicum L. (Ericaceae), commonly known as Labrador tea, is one of the most promising antidiabetic plants used traditionally by the Eastern James Bay Cree (Eid & Haddad 2014). *In vitro*, bioassays suggested that *R. groenlandicum* acts like metformin in skeletal muscle (Martineau et al. 2010) and as thiazolidinedione drugs (also known as glitazones) in adipose tissue (Spoor et al. 2006). In a recent *in vivo* study, the plant extract was beneficial

in restoring glucose homeostatic mechanisms in mice fed with a high-fat diet (HFD) (Ouchfoun et al. 2015). Notably, *R. groenlandicum* reduced blood glucose and insulin while improving the response to an oral glucose tolerance test (OGTT). In the current study, the effects of the HFD on renal integrity were assessed in the presence or absence of the plant. We report that *R. groenlandicum* treatment tends to improve microalbuminuria and significantly reduces renal fibrosis, renal steatosis and Bcl-2-modifying factor (BMF) staining.

Materials and methods

Plant materials

The leaves of *R. groenlandicum* were harvested in 2006 in the Eeyou Istchee territory, QC, Canada, according to instructions of Cree Elders and healer. They were dried and kept in dry cool conditions until use. The botanical identity of this plant was confirmed by taxonomist Dr. A. Cuerrier and voucher specimens were deposited at the Marie-Victorin Herbarium of the Montreal Botanic Garden (Spoor et al. 2006). The 80% ethanol extract was prepared according to previously published articles (Spoor et al. 2006; Harbilas et al. 2009). The yield was 31%, total phenolics amounted to 188 mg/g dry weight and major compounds identified included chlorogenic acid, catechins, procyanidins and quercetin glycosides (Harbilas et al. 2009).

Animals

Male non-diabetic C57BL/6 mice on a pure genetic background were obtained from Charles River Laboratories (Saint-Constant, QC, Canada). All mice were housed individually in cages with hardwood chip bedding and maintained on a 12 h light/dark cycle in a temperature-controlled animal room (22 °C). All animals were allowed *ad libitum* access to solid food and water. The animal experimentation ethics committee of the University of Montreal approved all experimental protocols that were carried out in full respect of the guidelines from the Canadian Council for the Protection of Animals.

Evaluation of antidiabetic potential of *R. groenlandicum*

Four-week-old C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: mice fed with Charles River chow (Charles River rodent chow #5075) that served as non-obese control group ($n = 12$); mice fed with HFD (Bio-Serv, Flemington, NJ, #F3282) that served as the obese control group

($n = 10$); mice fed with HFD into which 250 mg/kg/d *R. groenlandicum* was incorporated for the last 8 weeks of the 16-week HFD regimen that served as the treatment group ($n = 12$) (Ouchfoun et al. 2015). Fresh test diet was prepared every 2 d (frequency of food renewal for the animals) by incorporating *R. groenlandicum* powder into the HFD and the preparation kept in the fridge (4 °C) to ensure stability. Baseline measurements of fed blood glucose levels, body weight, food intake and water consumption were taken every 2 d at 11 am. The non-fasting blood glucose concentration was measured using an Accu-Chek glucose meter (Roche, Montreal, QC, Canada) by collecting blood from the tip of the tail vein. At the 8th and 15th week of experiments, an oral glucose tolerance test (OGTT) was performed. Briefly, mice were fasted for 5.5 h and then given 2 g/kg glucose by gavage through a gastric tube. Tail vein glucose readings were taken at 0, 15, 30, 60 and 120 min after glucose administration. After the 16th week, the mice were anaesthetized with an intraperitoneal injection of 50 mg/kg pentobarbital, killed by exsanguination, and samples such as the liver, muscle (right femoral muscle), kidney, epididymal fat pad, abdominal fat pad and dorsal fat pad were immediately removed and weighed (Vuong et al. 2009; Harbilas et al. 2013). Urine was also collected. All samples were stored at -80 °C.

Biochemical assays

At the end of experiments, blood samples were collected from renal artery during exsanguinations carried out under anaesthesia using heparinized tools. The samples were centrifuged at 3000 g for 10 min at 41 °C. The plasma samples were used for the analyses of biochemical parameters of glucose homeostasis.

Physiological studies

Urine and kidneys were immediately weighted and stored at -80 °C. Urine was assayed for albumin and creatinine (ELISA; Albuwell and Creatinine Companion; Exocell, Philadelphia, PA) (Sachetelli et al. 2006; Brezniceanu et al. 2008; Liu et al. 2008, 2009; Godin et al. 2010). The kidneys were removed, decapsulated and weighed. The kidneys were processed for histology and immunostaining study as described (Godin et al. 2010).

Histology

Kidneys collected in Tissue-Tek cassettes (VWR Canlab, Montreal, Quebec, Canada) were dipped immediately in ice-cold 4% paraformaldehyde, fixed for 24 h at 4 °C and then processed by the Center Hospitalier de l'Universite de Montreal Pathology Department. Tissue samples counterstained with periodic acid-Schiff (PAS) or Masson's Trichrome staining (Sachetelli et al. 2006; Brezniceanu et al. 2008; Liu et al. 2008, 2009; Godin et al. 2010) were examined visually under a light microscope by an observer unaware of the treatments. The collected images were analyzed and quantified using NIH ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

Oil Red O stain

Kidneys collected in Tissue-Tek cassettes (VWR Canlab, Montreal, Quebec, Canada) pre-embedded with optimal cutting temperature (OCT) compound (Sakura Finetek, Torrance, CA), were cut into 8- μ m sections using a cryostat microtome (model HM505N; Microm International, Walldorf, Germany) at -20 °C. Sections were placed on gelatin-coated slides and air-dried overnight at 37 °C, then stained by Oil Red O.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining for BMF was performed by the standard avidin-biotin-peroxidase complex method (ABC Staining System, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) as previously described (Brezniceanu et al. 2008; Liu et al. 2008; Godin et al. 2010).

Statistical analysis

Statistical significance between the experimental groups was analyzed by one-way ANOVA and the Bonferroni or the Tukey test as appropriate. The data are expressed as means \pm SEM. The *p* values < 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Diet-induced-obesity (DIO) and pre-diabetic model

In order to create obesity and a pre-diabetic state, mice were fed with HFD for 16 weeks. As described in Table 1, HFD mice had a significantly greater body weight as compared with the chow-fed group (49.1 \pm 1.85 g versus 34.7 \pm 1.41 g, respectively; *p* < 0.001). Similarly,

significant increases in liver, WAT (retroperitoneal fat pad, $p < 0.001$) and brown adipose tissue weights ($p < 0.001$) were noticed. In parallel, average of both kidneys' weight remained unchanged among the three experimental groups. These results confirmed those obtained in a previous study where increased baseline glycaemia and insulin resistance were also observed (Ouchfoun et al. 2015). Such phenomenon occurred without any change in food intake between the HFD and chow groups (data not illustrated).

Effects of HFD on renal parameters in the presence or absence of *R. groenlandicum*

Microalbuminuria

Microalbuminuria (urine albumin) occurs when there is an abnormally high permeability for albumin in the renal glomerulus (Parving et al. 2015). Clinically, the albumin/creatinine ratio (ACR) is used to evaluate microalbuminuria and renal function (Bakker 1999; Tesar 2008; Currie et al. 2014). Statistically significant increases in urinary ACR were detectable in mice fed HFD for 16 weeks as compared with chow-fed mice (HFD-fed mice: ACR = 0.69; chow-fed mice = 0.23; $p < 0.05$, Figure 1), which revealed serious renal functional damage. In animals treated with *R. groenlandicum*, the ACR value at week 16 was reduced by 23% when compared with HFD controls, albeit not in a statistically significant manner ($p = 0.70$). However, this ACR was also statistically similar to that of chow controls ($p = 0.31$). These results indicate that *R. groenlandicum* may possess the potential to prevent the progression of albuminuria in our experimental mice.

Renal fibrosis

Histological analysis was then carried out to further investigate the damage to renal tissue. We first applied Masson's trichrome stain to detect collagen deposits as a sign of fibrosis. Enhanced expression of collagenous components (stained with blue) was detected in the glomerulotubular area of renal tissues of HFD-fed mice compared with that in chow-fed mice (Figure 2a). This visual distinction was confirmed by quantification of Masson stain (HFD-fed mice 4.85 AU compared with 3.27 AU for chow-fed mice; $p < 0.001$, Figure 2b). Meanwhile, results of quantification also indicated that fibrosis was normalized after *R. groenlandicum* treatment (N.S. versus the chow group; $p < 0.05$ versus the HFD group; Figure 2b). This result clearly revealed that *R. groenlandicum* effectively prevented interstitial fibrosis.

Morphological abnormalities in PAS stain.

Unlike chow controls, HFD-fed mice exhibited renal structural damage (Figure 3). Glomeruli and RPTs appeared to be hypertrophic in HFD-fed mice compared with their chow-fed controls (Figure 3). *Rhododendron groenlandicum* treatment reversed the glomerular and RPT hypertrophy against HFD (Figure 3).

PAS staining also revealed the presence of abundant vacuoles in renal tissues of both HFD-fed mice and HFD plus *R. groenlandicum*-treated mice (Figure 4a). In order to clarify the nature of those vacuoles, Oil Red O stain was applied and their lipid nature was confirmed (not illustrated). Quantification of these vacuoles suggested that mice receiving *R. groenlandicum* treatment had significantly improved renal steatosis compared with HFD-fed mice (90.7 AU for HFD versus 46.3 AU for HFD plus *R. groenlandicum* treatment, $p < 0.01$; Figure 4b). Steatosis was limited in the renal tissues of chow-fed mice (Figure 4).

BMF expression in renal tissues.

Immunohistochemistry was carried out using an antibody against BMF, a known proapoptotic protein. Results clearly demonstrated elevated BMF staining in renal tissues of HFD-fed mice when compared with chow-fed controls (Figure 5a). In contrast, the difference in BMF expression between chow-fed mice and *R. groenlandicum*-treated mice was not as important. Quantification confirmed this interpretation. Indeed, HFD induced significant BMF expression as compared with chow-fed mice ($p < 0.001$, Figure 5b). Applying *R. groenlandicum* treatment effectively inhibited HFD-induced increased BMF expression ($p < 0.05$ versus HFD-fed animals, N.S. versus chow controls; Figure 5b). This suggests that *R. groenlandicum* can reduce apoptotic stimuli occurring when mice are fed with HFD.

Discussion

As previously mentioned, *R. groenlandicum* is one of the most promising antidiabetic plants used traditionally by the Eastern James Bay Cree (Canada) with several actions observed in *in vitro* bioassays (Spoor et al. 2006; Martineau et al. 2010; Nachar et al. 2013) as well as *in vivo* (Ouchfoun et al. 2015). In the present studies, we sought to determine if *R. groenlandicum* could be beneficial against diabetic nephropathy (DN). As done previously

(Harbilas et al. 2012a,b, 2013), we used a diet-induced obesity model in mice to study the effect of *R. groenlandicum* in a mild diabetic state (Ouchfoun et al. 2015). Such studies indeed demonstrated that those 16 weeks of HFD feeding result in a significantly elevated blood glucose level as compared with chow-fed controls (data not illustrated). Under these conditions, *R. groenlandicum* treatment significantly reduced baseline glycaemia as well as the response to a glucose tolerance test (OGTT) (Ouchfoun et al. 2015).

Since elevated blood glucose is the main cause of pathologic manifestations of DN, we hypothesized that HFD-fed mice from this previous study were suffering from DN. A common feature of DN is microalbuminuria whereby the abnormal kidney leaks more serum albumin than normal in the urine (Parving et al. 2015). We, therefore, initially examined urine albumin level and HFD-fed mice indeed showed clear signs of microalbuminuria. Aside from such glomerular dysfunction, tubular atrophy and tubulointerstitial fibrosis are associated with the gradual decline of renal function in the later stages of DN (Nangaku 2004). Indeed, tubular atrophy and tubulointerstitial fibrosis were proven to be better predictors of late-stage renal disease progression over glomerular pathology (Gilbert & Cooper 1999; Marcussen 2000; Drummond & Mauer 2002; Beyenbach 2004). Although mechanisms underlying tubular atrophy are incompletely elucidated, recent findings indicate that renal proximal tubule cell apoptosis may be an initial mechanism for tubular atrophy in T2DM (Lau et al. 2012). Next, we thus used renal histology to assess kidney integrity. HFD-fed animals showed signs of hypertrophy of both glomerular and proximal tubular areas as assessed with the PAS stain. Collagen deposition, as assessed with the Masson stain, was significantly augmented in HFD animals, indicating signs of interstitial fibrosis. We also observed a large number of vacuoles that appeared to be lipidic in nature, suggesting the presence of steatosis. Finally, we used immunohistochemistry to quantify BMF, a pro-apoptotic protein. Indeed, BMF has been clearly demonstrated to play an important role in mediating renal proximal tubule cell apoptosis in the diabetic mouse kidney *in vivo* (Brezniceanu et al. 2008; Lau et al. 2012). As seen in the *db/db* mice used in these previous studies, HFD-fed animals also demonstrated a significant increase in BMF expression. All these elements confirmed that HFD-fed animals exhibited signs of kidney damage, albeit not late-stage DN.

We then wanted to determine if *R. groenlandicum* treatment could be beneficial in such conditions. The results of the present study clearly demonstrate that this is the case. At first,

treatment with the plant extract showed a tendency to return microalbuminuria toward values observed in the chow group, albeit not in a statistically significant manner. Similarly, the hypertrophy of both glomerular and proximal tubular areas observed in HFD-fed mice by PAS stain appeared to be improved by *R. groenlandicum* treatment. Hence, our results suggest that *R. groenlandicum* extract may have a beneficial impact on glomerular integrity, but the effect is modest. Further studies will be required to address this point.

In contrast, fibrotic collagen deposition was significantly reduced by *R. groenlandicum* treatment in the face of continuous HFD feeding for 16 weeks. As mentioned above, with PAS staining at low magnification, we observed abundant vacuoles present in renal tissues of HFD-fed mice. Applying Oil Red O stain of triglycerides, we confirmed that these vacuoles represented fat deposits. Quantification of these vacuoles in renal tissues of HFD-fed mice clearly demonstrated that *R. groenlandicum* treatment could reduce renal steatosis in a potent manner. Such results are consistent with the results of our previous study where the blood lipid profile reflected the high-fat intake. Indeed, LDL, HDL as well as total cholesterol were doubled in HFD-fed animals when compared with chow congeners. Although *R. groenlandicum* treatment did not significantly modify these blood lipid parameters, it did potently reduce hepatic steatosis (Ouchfoun et al. 2015). Our present results demonstrate that *R. groenlandicum* may also exert its protective role by significantly decreasing renal fibrosis and steatosis.

Finally, we also tested BMF expression in mice consuming Labrador tea extract. Treatment with *R. groenlandicum* succeeded in normalizing the expression of BMF. It was shown that BMF expression is a precursor of renal proximal tubule cell apoptosis and that this leads to renal dysfunction in diabetes (Lau et al. 2012). On the other hand, the significant reduction in BMF induced by Labrador tea treatment occurred in the face of apparently milder improvements in microalbuminuria and glomerular integrity. It is thus possible that the duration of the plant treatment was not sufficiently long for the latter effects to be fully expressed. Nonetheless, these results imply that the plant may exert an anti-apoptotic effect, albeit further studies are required to confirm this interpretation.

In summary, our study demonstrates that a prolonged intake of HFD, which is accompanied by disturbed glycaemic control (notably increased insulin resistance), can lead to measurable kidney damage (Boini et al. 2010; Lee et al. 2012; Zhang et al. 2012). Treatment with *R.*

groenlandicum, which improved insulin sensitivity in this diet-induced obesity model (Ouchfoun et al. 2015), also improves parameters of kidney integrity. The underlying renal protective mechanisms of *R. groenlandicum* appear to implicate a milder improvement in microalbuminuria and glomerular morphology, a significant reduction in renal fibrosis and steatosis and an important inhibition of BMF expression. Our observations raise the possibility that Labrador tea may possess potential in reversing the pathologic manifestations of DN, particularly tubular atrophy and interstitial fibrosis. The present studies lend further credence to the fact that Labrador tea is a promising antidiabetic plant that should, therefore, be tested clinically in order to be used as a culturally relevant complementary and alternative treatment for Cree diabetics.

Acknowledgements

The authors thank the laboratories of Drs. John Chan (notably, Ms. Isabelle Chenier) and Shao Ling Zhang for precious help with the biochemical measures of microalbuminuria and for histological and immunohistochemistry treatment and interpretation. Very special thanks are due to Cree Elders of Eeyou Istchee who kindly agreed to be interviewed. They made this paper possible by allowing us to use, for the purposes of this research, their knowledge relating to medicinal plants transmitted to them by their Elders. Their trust has also enabled a useful exchange between Indigenous knowledge and Western science.

Disclosure statement

The authors report that they have no conflicts of interest.

Funding information

A Team Grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines; CTP-79855) to Pierre S. Haddad funded these studies.

7. Tables

Table 1: Body and organ weights at the end of treatment.

	Chow	DIO control	<i>R. groenlandicum</i> (250 mg/kg)
<i>Body weight (g)</i>	34.68 ± 1.41	49.09 ± 1.85 ^{***}	46.90 ± 1.85 ^{***}
<i>Liver weight (g)</i>	3.63 ± 0.06	4.26 ± 0.09 ^{**}	3.85 ± 0.02
<i>Retroperitoneal fat pad (g)</i>	2.84 ± 0.05	3.93 ± 0.15 ^{***}	3.56 ± 0.17 ^{**}
<i>Kidney weight (g)</i>	0.46 ± 0.01	0.47 ± 0.00	0.45 ± 0.01
<i>Epididymal fat pad (g)</i>	3.38 ± 0.13	3.59 ± 0.11	3.43 ± 0.14
<i>Brown fat pad (g)</i>	2.32 ± 0.02	2.64 ± 0.04 ^{***}	2.56 ± 0.07 ^{**}

Data were analyzed using one-way ANOVA. Values (means ± S.E.M, n = 10–12 for each group) were taken at the end of the treatment day. * Indicates a p-value < 0.05, ** indicates a p-value < 0.01 and *** indicates a p-value < 0.001 significantly different from the Chow group.

8. Figure legends

Figure 1. Albumin/creatinine ratio (ACR) is elevated in HFD-fed mice at the 16th week of study. Values are the mean \pm SEM, n = 10–12 for each group. *p < 0.05. N.S., not significant.

Figure 2. Fibrosis developed severely in HFD-fed mice. (a) Masson's trichrome stain; (b) Quantification of Masson stain. Values are the mean \pm SEM, n = 10–12 for each group. **p < 0.01, ***p < 0.001. N.S., not significant.

Figure 3. Periodic acid–Schiff (PAS) staining, in mouse kidneys at week 16. Magnification is \times 600.

Figure 4. PAS staining and quantification of vacuoles in mouse kidneys at week 16. (a) PAS stain. Magnification is \times 200. (b) Quantification of vacuoles. Values are expressed in arbitrary units (AU) as the mean \pm SEM, n = 10–12 for each group. Significantly different from chow controls, **p < 0.01, ***p < 0.001. N.S., not significant.

Figure 5. BMF expression is elevated in renal tissues of HFD-fed mice. (a) BMF immunohistochemical (IHC) staining in kidney sections (original magnification \times 200). (b) Quantification of BMF IHC staining. Values are expressed in AU as the mean \pm SEM, n = 10–12 for each group. *p < 0.05; ***p < 0.001. N.S., not significant.

9. Figures

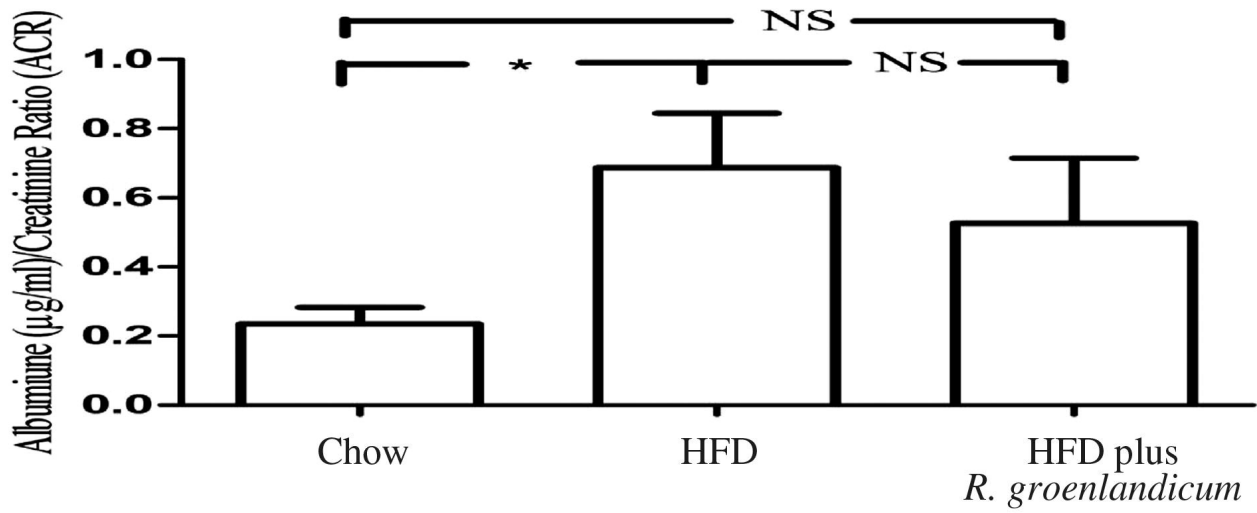


Figure 1. Albumin/creatinine ratio (ACR) is elevated in HFD-fed mice at the 16th week of study.

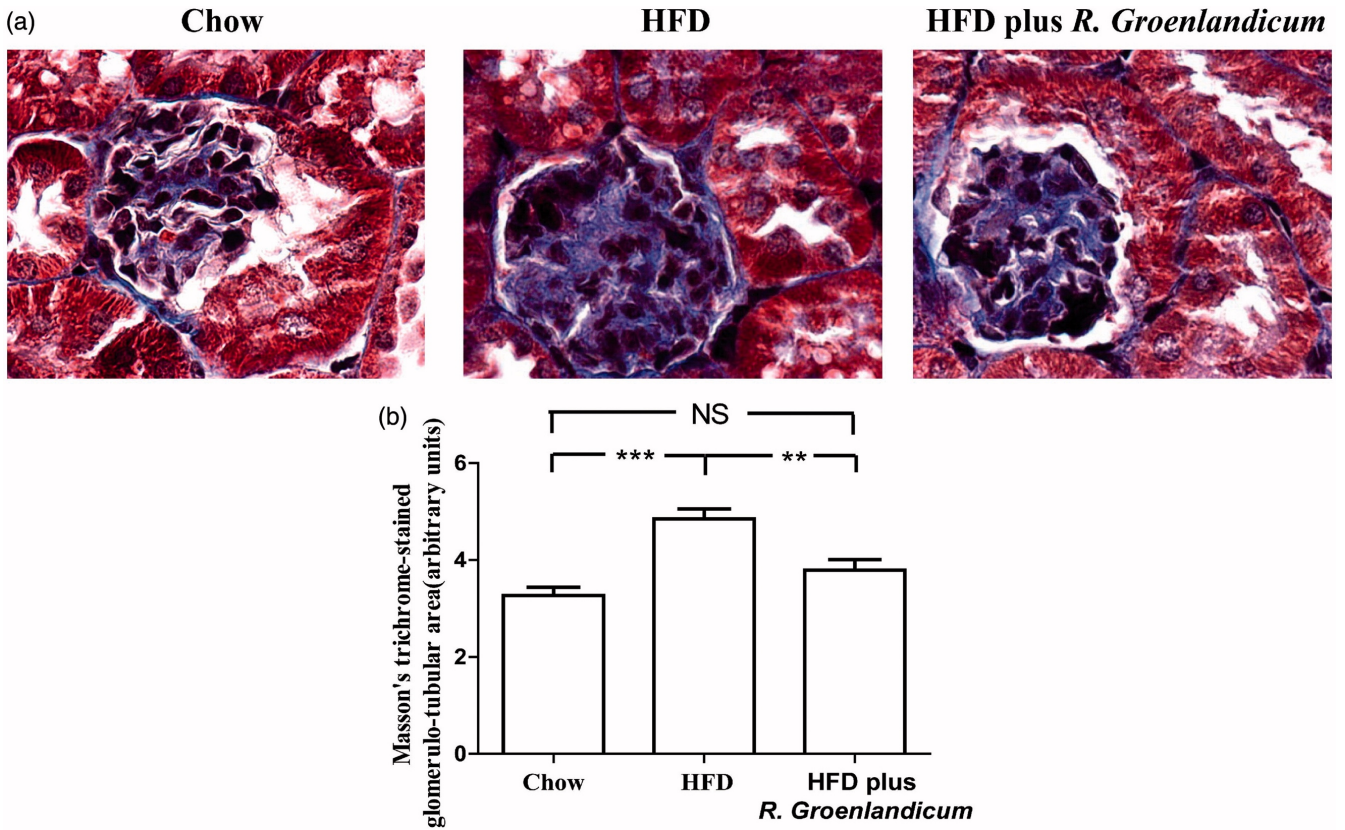


Figure 2: Fibrosis developed severely in HFD-fed mice.

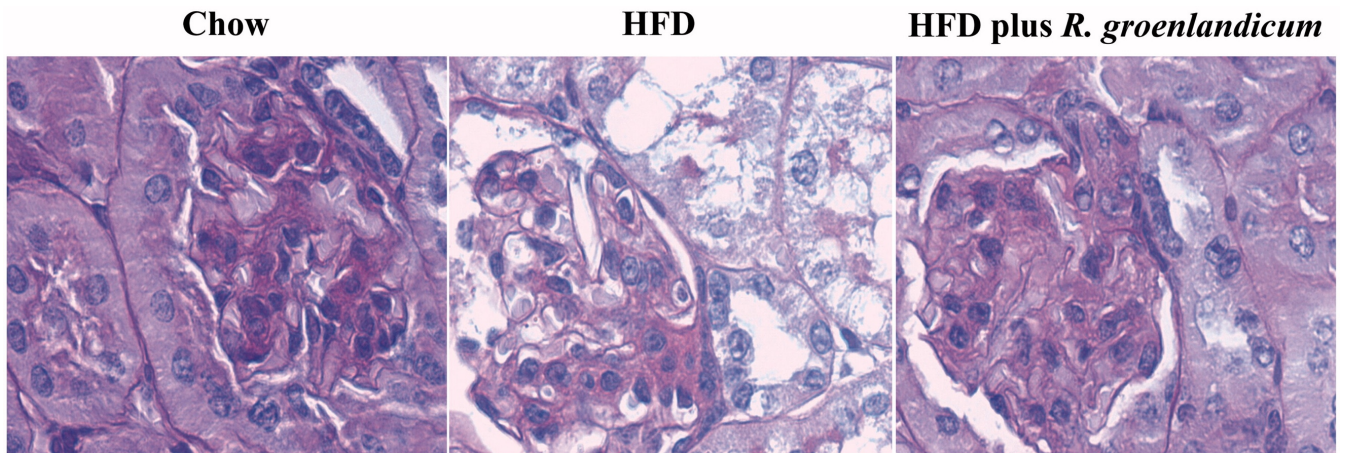


Figure 3: Periodic acid-Schiff (PAS) staining, in mouse kidneys at week 16. Magnification is $\times 600$.

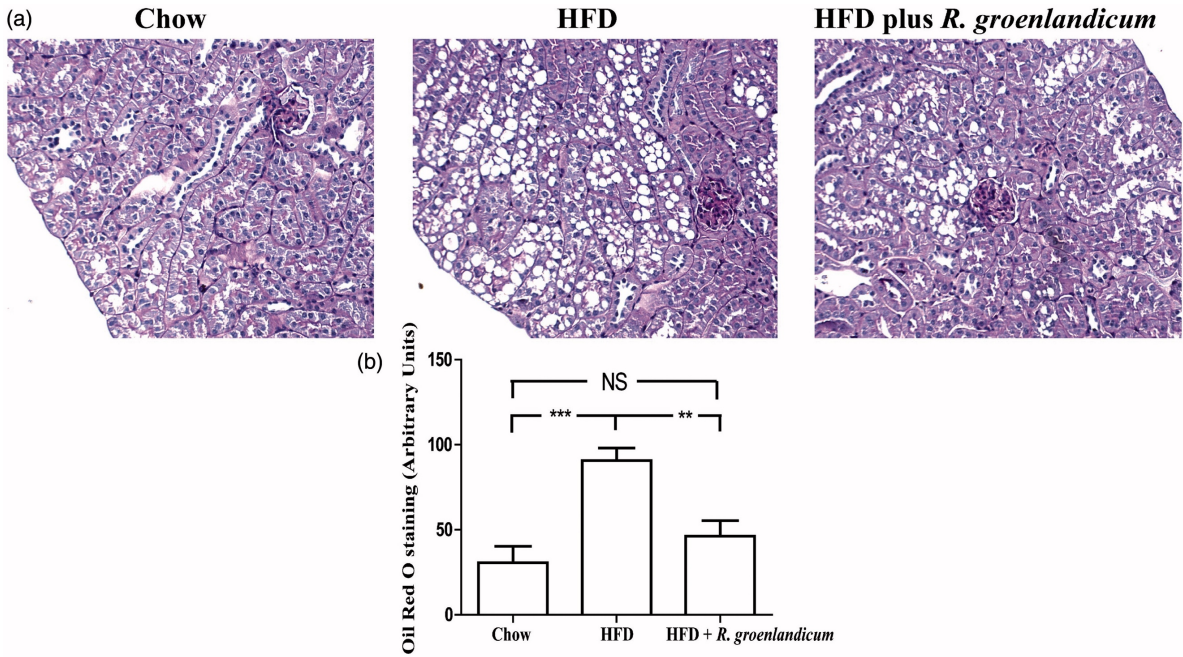


Figure 4: PAS staining and quantification of vacuoles in mouse kidneys at week 16.

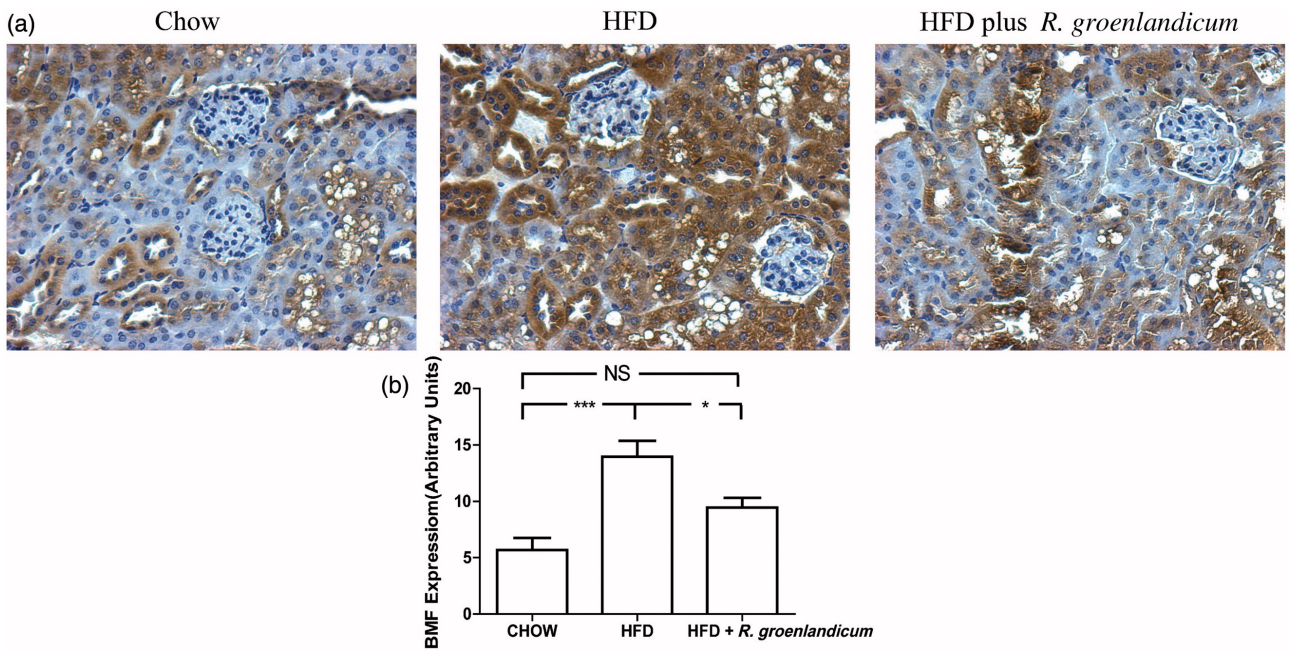


Figure 5. BMF expression is elevated in renal tissues of HFD-fed mice.

10. References

- Bakker AJ. 1999. Detection of microalbuminuria. Receiver operating characteristic curve analysis favors albumin-to-creatinine ratio over albumin concentration. *Diabetes Care*. 22:307–313.
- Beyenbach KW. 2004. Kidneys sans glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol*. 286:F811–F827.
- Boini KM, Zhang C, Xia M, Poklis JL, Li PL. 2010. Role of sphingolipid mediator ceramide in obesity and renal injury in mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther*. 334:839–846.
- Brezniceanu ML, Liu F, Wei CC, Chenier I, Godin N, Zhang SL, Filep JG, Ingelfinger JR, Chan JS. 2008. Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. *Diabetes*. 57:451–459.
- Cheng KK, Iglesias MA, Lam KS, Wang Y, Sweeney G, Zhu W, Vanhoutte PM, Kraegen EW, Xu A. 2009. APPL1 potentiates insulin-mediated inhibition of hepatic glucose production and alleviates diabetes via Akt activation in mice. *Cell Metab*. 9:417–427.
- Coffman MJ, Norton CK, Beene L. 2012. Diabetes symptoms, health literacy, and health care use in adult Latinos with diabetes risk factors. *J Cult Divers*. 19:4–9.
- Currie G, McKay G, Delles C. 2014. Biomarkers in diabetic nephropathy: present and future. *World J Diabetes*. 5:763–776.
- Drummond K, Mauer M. 2002. The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes. *Diabetes*. 51:1580–1587.
- Eid HM, Haddad PS. 2014. Mechanisms of action of indigenous antidiabetic plants from the Boreal Forest of Northeastern Canada. *Adv Endocrinol*. 2014: Article ID 272968, 11 pages.
- Ekoe JM, Thouez JP, Petitclerc C, Foggin PM, Ghadirian P. 1990. Epidemiology of obesity in relationship to some chronic medical conditions among Inuit and Cree Indian populations in new Quebec, Canada. *Diabetes Res Clin Pract*. 10(Suppl 1):S17–S27.
- Forbes JM, Cooper ME. 2013. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 93:137–188.
- Fraser MH, Cuerrier A, Haddad PS, Arnason JT, Owen PL, Johns T. 2007. Medicinal plants of Cree communities (Québec, Canada): antioxidant activity of plants used to treat type 2 diabetes symptoms. *Can J Physiol Pharmacol*. 85:1200–1214.
- Garriguet D. 2008. Obesity and the eating habits of the aboriginal population. *Health Rep*. 19:21–35.

Gilbert RE, Cooper ME. 1999. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? *Kidney Int.* 56:1627–1637.

Godin N, Liu F, Lau GJ, Brezniceanu ML, Chenier I, Filep JG, Ingelfinger JR, Zhang SL, Chan JS. 2010. Catalase overexpression prevents hypertension and tubular apoptosis in angiotensinogen transgenic mice. *Kidney Int.* 77:1086–1097.

Haddad PS, Musallam L, Martineau LC, Harris C, Lavoie L, Arnason JT, Foster B, Bennett S, Johns T, Cuerrier A, et al. 2012. Comprehensive evidence-based assessment and prioritization of potential antidiabetic medicinal plants: a case study from Canadian eastern James Bay Cree traditional medicine. *Evid Based. Complement Alternat Med.* 2012: Article ID 893426, 14 pages.

Hanley AJ, Harris SB, Mamakesick M, Goodwin K, Fiddler E, Hegele RA, Spence JD, House AA, Brown E, Schoales B, et al. 2005. Complications of type 2 diabetes among aboriginal Canadians: prevalence and associated risk factors. *Diabetes Care.* 28:2054–2057.

Harbilas D, Brault A, Vallerand D, Martineau LC, Saleem A, Arnason JT, Musallam L, Haddad PS. 2012a. *Populus balsamifera* L. (Salicaceae) mitigates the development of obesity and improves insulin sensitivity in a diet-induced obese mouse model. *J Ethnopharmacol.* 141:1012–1020.

Harbilas D, Martineau LC, Harris CS, Adeyiwola Spoor DC, Saleem A, Lambert J, Caves D, Johns T, Prentki M, Cuerrier A, et al. 2009. Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: part II. *Can J Physiol Pharmacol.* 87:479–492.

Harbilas D, Vallerand D, Brault A, Saleem A, Arnason JT, Musallam L, Haddad PS. 2012b. *Larix laricina*, an antidiabetic alternative treatment from the Cree of northern Quebec pharmacopoeia, decreases glycemia and improves insulin sensitivity in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012: Article ID 296432, 10 pages.

Harbilas D, Vallerand D, Brault A, Saleem A, Arnason JT, Musallam L, Haddad PS. 2013. *Populus balsamifera* extract and its active component salicortin reduce obesity and attenuate insulin resistance in a diet-induced obese mouse model. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013: Article ID 172537, 13 pages.

Kuzmina E, Lejeune P, Dannenbaum D, Torrie J. 2010. 2009 CDIS report. Public Health Report Series 3 on Diabetes Cree Board of Health and Social Services of James Bay.

Lau GJ, Godin N, Maachi H, Lo CS, Wu SJ, Zhu JX, Brezniceanu ML, Chenier I, Fragasso-Marquis J, Lattouf JB, et al. 2012. Bcl-2-modifying factor induces renal proximal tubular cell apoptosis in diabetic mice. *Diabetes*. 61:474–484.

Leduc C, Coonishish J, Haddad P, Cuerrier A. 2006. Plants used by the Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of diabetes: a novel approach in quantitative ethnobotany. *J Ethnopharmacol*. 105:55–63.

Lee W, Eom DW, Jung Y, Yamabe N, Lee S, Jeon Y, Hwang YR, Lee JH, Kim YK, Kang KS, et al. 2012. *Dendrobium moniliforme* attenuates high-fat diet-induced renal damage in mice through the regulation of lipid-induced oxidative stress. *Am J Chin Med*. 40:1217–1228.

Liu F, Brezniceanu ML, Wei CC, Chenier I, Sachetelli S, Zhang SL, Filep JG, Ingelfinger JR, Chan JS. 2008. Overexpression of angiotensinogen increases tubular apoptosis in diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 19:269–280.

Liu F, Wei CC, Wu SJ, Chenier I, Zhang SL, Filep JG, Ingelfinger JR, Chan JS. 2009. Apocynin attenuates tubular apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in transgenic mice independent of hypertension. *Kidney Int*. 75: 156–166.

Marcussen N. 2000. Tubulointerstitial damage leads to atubular glomeruli: significance and possible role in progression. *Nephrol Dial Transplant*. 15:74–75.

Martineau LC, Adeyiwola Spoor DC, Vallerand D, Afshar A, Arnason JT, Haddad PS. 2010. Enhancement of muscle cell glucose uptake by medicinal plant species of Canada's native populations is mediated by a common, metformin-like mechanism. *J Ethnopharmacol*. 127:396–406.

Nachar A, Vallerand D, Musallam L, Lavoie L, Badawi A, Arnason J, Haddad PS. 2013. The action of antidiabetic plants of the Canadian James Bay Cree traditional pharmacopeia on key enzymes of hepatic glucose homeostasis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013: Article ID 189819, 9 pages.

Nangaku M. 2004. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Intern Med*. 43:9–17.

Ouchfoun M, Eid HM, Musallam L, Brault A, Li S, Vallerand D, Arnason JT, Haddad PS. 2015. Labrador tea (*Rhododendron groenlandicum*) attenuates insulin resistance in a diet-induced obesity mouse model. *Eur J Nutr*. DOI 10.1007/s00394-015-0908-z

Parving HH, Persson F, Rossing P. 2015. Microalbuminuria: a parameter that has changed diabetes care. *Diabetes Res Clin Pract.* 107:1–8.

Sachetelli S, Liu Q, Zhang SL, Liu F, Hsieh TJ, Brezniceanu ML, Guo DF, Filep JG, Ingelfinger JR, Sigmund CD, et al. 2006. RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney. *Kidney Int.* 69:1016–1023.

Spoor DC, Martineau LC, Leduc C, Benhaddou-Andaloussi A, Meddah B, Harris C, Burt A, Fraser MH, Coonishish J, Joly E, et al. 2006. Selected plant species from the Cree pharmacopoeia of northern Quebec possess anti-diabetic potential. *Can J Physiol Pharmacol.* 84:847–858.

Tesar V. 2008. Examination of the kidneys in a diabetic patient. *Vnitr Lek.* 54:494–498.

Vuong T, Benhaddou-Andaloussi A, Brault A, Harbilas D, Martineau LC, Vallerand D, Ramassamy C, Matar C, Haddad PS. 2009. Antiobesity and antidiabetic effects of biotransformed blueberry juice in KKA(y) mice. *Int J Obes (Lond).* 33:1166–1173.

Zhang HM, Dang H, Kamat A, Yeh CK, Zhang BX. 2012. Geldanamycin derivative ameliorates high fat diet-induced renal failure in diabetes. *PLoS One.* 7:e32746.

Chapitre 3 : Article 2

Cet article va être soumis au BMC Complementary and Alternative Medicine.

Contribution de chaque co-auteur

J'avais conçu le projet, effectué tous les travaux expérimentaux, analysé les données et rédigé l'article.

Sarah Pasquin, sous la supervision du Dr Jean-François Gauchat, a contribué à la coloration par immunofluorescence et l'analyse en cytométrie en flux.

Hoda Eid et Shirley Campbell ont aidé à la résolution des problèmes au cours de l'expérience.

Dr Pierre S. Haddad est mon directeur de recherche qui m'a supervisé tout le long de ma période d'étude. Il a initié le cadre conceptuel du projet, aidé dans l'interprétation des données et corrigé l'article.

Anti-apoptotic potential of several antidiabetic medicinal plants of the eastern James Bay Cree pharmacopeia in cultured kidney cells

Auteurs

Shilin Li^{1,2}, Sara Pasquin¹, Hoda Eid^{1,2,3}, Jean-François Gauchat¹, Ammar Saleem⁴, Pierre S. Haddad^{1,2*}.

Affiliations

¹Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Canada, H3C 3J7.

²Natural Health Products and Metabolic Diseases Laboratory, CIHR Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines and Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, Montreal, Canada.

³Dept. of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Beni-Suef University, Beni-Suef, Egypt, 62514

⁴Center for Advanced Research in Environmental Genomics, University of Ottawa, Ottawa, K1N 6N5 Canada

* Author to whom correspondence should be addressed:

Pierre S. Haddad, PhD

Department of Pharmacology

Université de Montréal

P.O. Box 6128, Downtown Postal Station

Montreal (Quebec)

Canada H3C 3J7

Abstract

Background

Our team has identified 17 Boreal forest species from the traditional pharmacopeia of the Eastern James Bay Cree that presented promising *in vitro* and *in vivo* biological activities in the context of type 2 diabetes (T2D).

We now screened the 17 plants extracts for potential anti-apoptotic activity in cultured kidney cells and investigated the underlying mechanisms.

Methods

MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cell damage was induced by hypertonic medium (700 mOsm/L) in the presence or absence of maximal nontoxic concentrations of each of the 17 plant extracts. After 18 h' treatment, cells were stained with Annexin V (AnnV) and Propidium iodide (PI) and subjected to flow cytometry to assess the cytoprotective (AnnV⁻/PI⁻) and anti-apoptotic (AnnV⁺/PI⁻) potential of the 17 plant extracts. We then selected a representative subset of species (most cytoprotective, moderately so or neutral) to measure the activity of caspases 3, 8 and 9.

Results

Gaultheria hispidula and *Abies balsamea* are amongst the most powerful cytoprotective and anti-apoptotic plants and appear to exert their modulatory effect primarily by inhibiting caspase 9 in the mitochondrial apoptotic signaling pathway.

Conclusion

We conclude that several Cree antidiabetic plants exert anti-apoptotic activity that may be relevant in the context of diabetic nephropathy (DN) that affects a significant proportion of Cree diabetics.

Keywords

Aboriginal traditional medicine, Diabetic nephropathy, MDCK cells, Annexin V, Propidium iodide, Caspase

Background

Diabetes mellitus (DM), first officially recorded in ancient Egypt, was initially considered as a rare condition in which patient urinated excessively and lost weight [1]. Clinically, DM refers to a group of metabolic diseases in which there is a chronic hyperglycemic condition as a result of defects in insulin secretion, insulin action or both [2, 3]. Due to compromised insulin secretion or sensitivity, postprandial metabolism is disturbed, resulting in less efficient uptake and utilization of glucose by the targeted tissues, further leading to elevated blood glucose level, more utilization of proteins and fats [4].

The prevalence of DM is rapidly increasing worldwide as a result of sedentary lifestyle, obesity, ageing, smoking, high blood pressure, genetic predisposition, psychiatric disorder such as depression and so on [5]. DM is predicted to affect 366 million individuals by the year 2030 [5–8]. Notably, Aboriginal populations worldwide are disproportionately affected by T2D. This has been linked to rapid environmental changes and to potential genetic predisposition to higher conservation of food calories [9–13]. For instance, the age-adjusted prevalence of T2D in the Cree populations of Eeyou Istchee (CEI - Eastern James Bay area of Quebec, Canada) averaged 29% in 2009 [11, 14]. Cree communities also suffer from higher prevalence of diabetic complications, notably DN. This is due at least in part to the cultural inappropriateness of modern drug treatments [15, 16].

In western countries, end-stage renal disease (ESRD) is mainly caused by DN [17]. Development of proteinuria, considered as the key feature of DN, is related to the decline of glomerular filtration rate (GFR), eventually leading to a progressive loss of renal function [18]. Hypertension and poor glycaemic control are usually associated with DN [19, 20]. More importantly and according to numerous recent studies, it is well established that renal tubular cell apoptosis contributes to the development of DN, leading to gradual loss of renal mass [21–23]. In this context, different cell models can be used to study renal cell apoptosis, such as MDCK cells subjected to hypertonic stress [24].

The Canadian Institutes of Health Research Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines (CIHR-TAAM) was instated in 2003 in an effort to find culturally relevant complementary and alternative approaches to T2D prevention and management for Canadian Aboriginal diabetics. Seventeen plant species stemming from the James Bay Cree traditional pharmacopeia were identified through ethnobotanical surveys and tested using a comprehensive platform of

bioassays and animal models of obesity and diabetes to identify the plants' capacity to improve glycemic control [11, 25–28]. Cree community members also encouraged us to study the potential of the plants to protect kidney cells, since DN is quite prevalent in the James Bay area [15, 16].

In current study, we therefore sought to determine the activity of the same 17 plant extracts to afford renal protection and, hence, their potential to mitigate DN. To achieve this, we developed a bioassay based on well-known MDCK cells, a kidney cell of distal tubule origin, that we stressed with hypertonic medium to induce apoptosis [24, 29–33]. We then used flow cytometry and staining reagents for apoptosis (AnnV) and necrosis (PI). Finally, we assessed the role of several caspases in order to begin understanding mechanisms underlying the anti-apoptotic activity of certain plant species.

Methods

Cell culture

MDCK cells were generously provided by Dr. Josette Noël (Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal) and grown in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.5% antibiotics (PS: Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL) and equilibrated with 5% CO₂ 95% air at 37 °C. Upon reaching subconfluence, cells were gently detached using 0.25% trypsin.

Plant extract preparation

A total of 17 Cree medicinal plant species were the object of the current study (Table 1) and their respective maximal nontoxic concentrations (see below) used in MDCK cell line are listed in Table 2. Each species of the 17 plant samples were collected in CEI territory and prepared from air-dried and ground plant material according to previously published methods [27, 28]. Authorization for plant sample collection was obtained and managed by a comprehensive research agreement convened between the three Canadian universities involved (Université de Montréal, McGill University, University of Ottawa), the participating Cree First Nations and the Cree Board of Health and Social Services of James Bay [34]. Dr. Alain Cuerrier, a seasoned taxonomist, ascertained the botanical identity of the plant species and voucher specimens have been deposited at the herbarium of the Montreal Botanical Garden [11]. The collected plant

samples were extracted with a standard 80% aqueous ethanol protocol as previously described [27, 28]. All the plant extracts have been well characterized in terms of their phytochemical content in previous studies from our laboratory and that of others (shown in Table 1) [34–84]. All extracts were freeze-dried overnight using a Super Moudylo freeze-dryer (TheromFisher, Brockville, ON, Canada). They were then stored at 4 °C in amber containers in a dessicator, both of which were flushed free of oxygen. In such conditions, extracts maintained a stable phytochemical profile and biological activity for several years, as tested using HPLC analyses with different detection systems (e.g. diode array and mass spectrometer) and using several cell-based bioassays.

Stock solutions of each of the 17 plant extracts were prepared in DMSO with concentrations ranging from 5 to 200 mg/mL. They were diluted in culture medium to the working concentrations shown in Table 2 (the final concentration of DMSO was 0.1% for all the treatments).

Determination of maximal nontoxic plant extract concentrations

Before screening the plants, maximal nontoxic concentrations were determined by cytotoxicity test that reflects the level of lactate dehydrogenase (LDH) release (LDH Colorimetric kit; Roche, Mannheim, Germany). Cells were seeded at the density of 1.5×10^5 /well on 6-well plates. Medium was refreshed around 20 h later when 70% confluence was reached, followed by the addition of each of 17 plant extracts with a series of concentrations, respectively. The range of concentrations selected was based on our previous experience with the 17 plant extracts in other cell lines [11, 27, 28]. After 18 h' incubation, medium (contains released LDH) was collected on ice then the adherent cells (contains cellular LDH) were lysed by EMEM containing 1% Triton X-100 for 10 min at 37 °C, 5% CO₂. Subsequently, all samples were transferred to Eppendorf tubes followed by centrifugation at 250×g, 4 °C, 10 min. LDH in both medium and lysate buffer were quantified by a coupled enzymatic reaction in which a red formazan product was generated, the absorbance of which was measured at 490 nm. To calculate % cytotoxicity for each plant extracts we used the following equation:

$$\frac{\text{Released LDH}}{\text{Total LDH (Released LDH + Cellular LDH)}} \times 100\%$$

Results were analyzed and used to determine the optimal nontoxic concentration for each extract. Each experiment was repeated three times.

Hypertonic stress protocol

To screen the 17 plant extracts, cells were seeded in 6-well plates at the density of 1.5×10^5 /well. Around 20 h later, 70% subconfluence was reached. Cells were then switched for 18 h to 700 mOsm/L hypertonic (made by addition of 200 mM sodium chloride to EMEM culture medium) or isotonic EMEM medium without FBS [24], which contained or not each of the 17 plant extracts at their respective nontoxic maximum concentration. Z-VAD-FMK, a pan caspase inhibitor, was selected as cytoprotective positive control.

Flow cytometric analysis of AnnV/PI staining

Apoptosis assays were performed using AnnV-FITC (fluorescein isothiocyanate, BD Bioscience, Mississauga, ON) and PI (Thermo Fischer Scientific). 5 mL polystyrene tubes (BD Bioscience, Mississauga, ON)) placed in a laminar flow hood were labeled and preloaded with 500 μ L FBS prior to assay. After 18 h' treatment, medium was transferred and collected in prepared polystyrene tubes; adherent cells were washed once with 1 mL PBS then harvested with 250 μ L 0.25% trypsin followed by another 1 mL PBS wash; all polystyrene tubes were subjected to centrifugation at 250 g, 4 $^{\circ}$ C, 5 min. Subsequently, supernatant was discarded and cell pellets resuspended in 500 μ L of ice cold binding buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂). Cell suspensions were then mixed with 2 μ L of AnnV-FITC (AnnV) and 1 μ L of PI. After incubation on ice for 5 min in the dark, healthy and damaged cells were determined and analyzed using a FACSCanto II (BD, Biosciences, Bedford, MA, USA) flow cytometer and FlowJo software. Positive staining was confirmed under fluorescence microscopy. Each experiment was repeated three times. As illustrated in the Results section below, PI⁺ Quadrants Q1 and Q2 respectively represent necrosis and late stage

apoptosis/secondary necrosis; Q4 Quadrant represents viability (AnnV⁻/PI⁻); Q3 Quadrant (AnnV⁺/PI⁻) represents early stage apoptosis.

Flow cytometry analysis of caspase 3, 8, 9

As described in the Results section, we selected a subset of plant extracts to study potential underlying mechanisms of MDCK cell protection. Consequently, caspase 3, 8, 9 assays were performed according to manufacturer's protocol by using the CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase Staining Kit (eBioscience, San Diego, CA, USA). Briefly, cells were detached as described above for AnnV and PI staining before CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase staining was applied. After centrifugation at 250 g, 4 °C, 5 min, 300 µL EMEM containing 1 µL CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase was added to each tube, then transferred in a 37 °C incubator with 5% CO₂ for 45 min. Subsequently, cells were subjected three times to a course of wash and spin-down (centrifugation at 500 g, 5 min) at room temperature. Finally, all tubes were subjected to flow cytometry for analysis of respective caspase staining by FACSCanto II (BD, Biosciences, Bedford, MA, USA) flow cytometer and FlowJo software. This assay utilizes inhibitors specific for cleaved caspase-3, -8 and -9, respectively. They are directly conjugated to FITC for the detection system. These reagents are cell permeable, non-toxic and irreversibly bind to the cleaved caspase 3, 8, and 9, respectively. Detection of the labeled cells can be determined by flow cytometry.

Statistical analysis

Results are presented as mean ± SEM of 3 independent experiments with triplicate for each sample. Statistical comparisons between the experimental groups were analyzed by one-way ANOVA and the Bonferroni test as appropriate in software Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A *P* value below 0.05 was considered statistically significant.

Results

Determination of maximal nontoxic plant extract concentrations

MDCK cells were treated with 17 plant extracts at different concentrations, respectively. After an overnight incubation (18 h), LDH release was measured. Maximal nontoxic concentrations were determined and results are listed in Table 2. At concentrations listed, all plant extracts

exhibited LDH release values that did not exceed 5–10% beyond values obtained with DMSO alone.

***In vitro* screen of renal protective potential of 17 antidiabetic medicinal plant extracts and analysis by flow cytometry**

In order to identify the respective renal protective and anti-apoptotic potential of the 17 plant extracts *in vitro*, AnnV/PI double staining was performed. Examined by fluorescent-based flow cytometry and compared to isotonic EMEM (Fig. 1a), 700 mOsm/L hypertonic stress (Fig. 1b) induced substantial PI⁺(necrosis and late stage apoptosis/secondary necrosis, Q1 and Q2 Quadrants) as well as AnnV⁺/PI⁻ (early stage apoptosis, Q3 Quadrant) signals in MDCK cells. We also used Z-VAD-FMK as a positive cytoprotective control. It is a commonly recognized pan caspase inhibitor, exerting its protective role by irreversibly binding to the catalytic site of caspase proteases [85]. Accordingly, Z-VAD-FMK efficiently protected MDCK cells from the deleterious effects of hypertonic stress (Fig. 1c). In the presence of such 700 mOsm/L hypertonic stress (itself alone resulting in only 53.8% AnnV⁻/PI⁻ staining - viable cells), all plant extracts, except *S. purpurea* and *K. augustifolia*, variably yet significantly improved cell viability as assessed by the change in AnnV⁻/PI⁻ staining (Fig. 1d). Among the 17 plant extracts, *G. hispidula*, *S. planifolia* and *A. balsamea* were most active, respectively increasing AnnV⁻/PI⁻ staining (viable cells) by 33.5%, 27.7% and 26.6%, relative to hypertonic stress alone ($P < 0.0001$, Fig. 1d). In addition, the difference in AnnV⁻/PI⁻ staining observed in the *G. hispidula* group was statistically similar to that seen in the control (isotonic EMEM) and in the positive control Z-VAD-FMK group. On the other hand, *K. augustifolia* was the only plant extract to worsen cell viability under hypertonic stress; in fact, it further reduced AnnV⁻/PI⁻ staining (- 12.9% relative to hypertonic stress, $P < 0.001$, Fig. 1d).

Statistical analysis from Q3 Quadrant (AnnV⁺/PI⁻, Fig. 1e) indicated that hypertonic stress caused a considerable increase of early stage apoptosis (23.5%) compared to isotonic EMEM (0.3%, $P < 0.0001$). *A. balsamea*, *G. hispidula* and *L. laricina* were the most powerful plants protecting against early stage apoptosis, respectively reducing AnnV⁺/PI⁻ staining by 18.4%, 15.9% and 15.8% relative to hypertonic stress alone ($P < 0.0001$, Fig. 1e). Most importantly, *A. balsamea* extract yielded results that were statistically similar to that of the isotonic EMEM group (23.2% reduction in AnnV⁺/PI⁻ staining relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Fig. 1e)

and the Z-VAD-FMK group (22.8% reduction in AnnV⁺/PI⁻ staining relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Fig. 1e). Again, *K. augustifolia* exhibited its apparent renal toxic action by increasing AnnV⁺/PI⁻ staining relative to hypertonic stress by as much as 25.0% ($P < 0.0001$, Fig. 1e).

We then sought to carry out further analysis to begin understanding potential underlying mechanisms, notably in relation to renal cell apoptosis. Based on the results presented above, we therefore selected a subset of five species. We selected *G. hispidula* and *A. balsamea* as representatives of the best plant species to improve AnnV⁻/PI⁻ staining and reduce AnnV⁺/PI⁻ staining. *R. tomentosum* and *R. groenlandicum* were selected as species that had moderate effects and *S. purpurea* as one of the least effective plant species.

Mechanism investigation

Cleaved caspase 3 activity

The activity of cleaved (active) caspase 3 following various treatments was then assessed by flow cytometry analysis (Fig. 2, panels a-d). The proportion of cells exhibiting staining for active caspase 3, a hallmark of apoptosis, was significantly increased in the hypertonic stress treated group (Fig. 2b). In comparison, the isotonic EMEM group (Fig. 2a) had a proportion of caspase 3 positive cells that was 48.3% lower than hypertonic stress ($P < 0.01$, Fig. 2a–e). As a positive control, pan caspase inhibitor Z-VAD-FMK largely suppressed the hypertonically induced activity of cleaved caspase 3 (71.2% lower than hypertonic stress, $P < 0.001$, Fig. 2c and e), this effect reaching levels even lower than the isotonic EMEM group (Fig. 2e). Among the representative plant species selected from our primary screen, a statistically significant reduction in activity of cleaved caspase 3 was observed for *A. balsamea* (Fig. 2d and e) and *R. tomentosum* (59.8% and 42.3% lower than hypertonic stress, respectively, $P < 0.01$, Fig. 2e). *G. hispidula* and *R. groenlandicum* afforded weak protection against cleaved caspase 3 activation induced by hypertonic stress; their caspase 3 activity lying between isotonic EMEM and hypertonic stress group (N.S. versus either group, Fig. 2e). In contrast, *S. purpurea* exhibited more cleaved caspase 3 activity compared to hypertonic stress treated group (44.5% higher than hypertonic stress, $P < 0.001$, Fig. 2e). Aside from *R. tomentosum*, these results are in accordance with the rank order of cytoprotection observed in our primary screen.

Cleaved caspase 8 activity

Secondly, the activity of cleaved caspase 8, which indicates a death receptor signaling pathway, was also assessed (Fig. 3, panels d). After MDCK cells were stressed by hypertonic medium (700 mOsm/L) for 18 h, the level of cleaved caspase 8 became significantly higher (22.5%, Fig. 3b) compared to that of the isotonic EMEM group (8.5%, $P < 0.01$, Fig. 3a). The pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK (Fig. 3, panels c and e) significantly reduced the proportion of cleaved caspase 8 positive cells to 3.7%, slightly lower than isotonic EMEM values (Fig. 3, panels a and e). Except for Z-VAD-FMK, the rest of the selected plant species seemed ineffective at decreasing the proportion of cleaved caspase 8 in a statistically significant manner. In fact, *S. purpurea* and *R. groenlandicum* enhanced the proportion of cleaved caspase 8 positive cells (30.5% and 31.1%, respectively, $P < 0.0001$ Fig. 3e).

Cleaved caspase 9 activity

We finally analyzed the activity of cleaved caspase 9, indicative of the mitochondrial apoptotic pathway, using fluorescent staining and flow cytometry (Fig. 4, panels a-d). Compared to the value of 7.2% obtained in the isotonic EMEM group (Fig. 4, panels a and e), hypertonic stress enhanced the proportion of cleaved caspase 9 positive cells to 23.4% ($P < 0.0001$, Fig. 4, panels b and e). As expected the positive cytoprotective control Z-VAD-FMK reduced the effect of hypertonic stress on caspase 9 positive cells (6.9%, $P < 0.0001$ compared to hypertonic stress group, Fig. 4, panels c and e). In comparison, the effective Cree plant treatments were *A. balsamea*, *G. hispidula* and *R. tomentosum*, with corresponding percentage of cleaved caspase 9 at 6.8%, 9.4% and 10.6%, respectively ($P < 0.0001$ compared to hypertonic stress, Fig. 4, panels d and e). *R. groenlandicum* and *S. purpurea* were again not only ineffective at suppressing the production of cleaved caspase 9 but *S. purpurea* also significantly increased its expression ($P < 0.0001$, Fig. 4e).

Discussion

The aim of the current study was to begin evaluating the nephroprotective capacity of 17 Cree medicinal plants that were identified as having significant antidiabetic potential in several bioassays related to glucose and lipid homeostasis as well as in animal models of obesity and

diabetes [26, 86]. As mentioned, our CEI partners highlighted the fact that their population was suffering disproportionately from DN [34, 87] and wanted us to look into renal protection stemming from their traditional medicinal plants.

We therefore selected the MDCK cell line, which is a very well characterized renal tubular cell model that can serve to assess cytoprotection against various insults [24, 29–33]. We also selected hypertonic stress to cause cell death, notably involving apoptosis [24]. In preliminary experiments, we challenged MDCK cells with different medium osmolarities (including 300, 400, 500, 600, 700 and 800 mOsm/L hypertonic medium, data not illustrated) and found that 700 mOsm/L was the ideal concentration to induce substantial apoptosis, which could be used to test the anti-apoptotic potential of the 17 plant species. This also corresponded with the concentration used successfully by other researchers in the same cell line [24]. This is pertinent in the context of the present studies, since renal tubular apoptosis is recognized as a major contributor for the development of DN [21–23]. Our results with AnnV/PI double staining and flow cytometry clearly demonstrate that a 700 mOsm/L hypertonic stress resulted in significant increases in cell death (PI⁺ quadrants Q1 and Q2; respectively representing necrosis and late apoptosis). Hypertonic stress also significantly enhanced the proportion of cells with AnnV⁺/PI⁻ staining, indicative of early apoptotic cell damage.

Also, importantly, we chose the pan caspase inhibitor Z-VAD-FMK as a positive cytoprotective control introduced in the hypertonic medium. It was very efficient in returning the pattern of AnnV/PI staining to that seen in isotonic EMEM (no hypertonic stress). Thus, our MDCK cells provide an adequate model in which to screen for potential nephroprotective and anti-apoptotic activities of Cree antidiabetic medicinal plants.

When MDCK cells were treated with the various antidiabetic Cree plants, we obtained a wide range of effects; a number of plant extracts almost completely prevented the deleterious effects of hypertonic stress, several were moderately cytoprotective, a few were weakly so and one plant actually enhanced nephrotoxicity, namely *K. angustifolia*. Notably, *G. hispidula* and *A. balsamea* plant extracts were amongst the best performers in maintaining high viability and suppressing apoptosis, being as powerful as Z-VAD-FMK. As mentioned, Z-VAD-FMK is a pan-caspase inhibitor that acts against apoptosis by irreversibly binding to the catalytic site of caspase proteases. As also discussed, apoptosis is involved in cell damage caused by hypertonic

stress and is implicated in DN [21–24]. We therefore sought to determine the potential role that caspases could play in the variable cytoprotective activity that we observed for the Cree plants. Caspases (cysteine-aspartic proteases or cysteine-dependent aspartate-directed proteases) belong to a family called cysteine proteases. They play an essential role in cell apoptosis or programmed cell death and have thus been termed “executioner” proteins [88, 89]. Caspases are regulated at a post-translational level, which allows them to be activated rapidly. Caspases are synthesized as inactive preforms and are cleaved next to aspartate residues upon activation [90]. There are so-called initiator and effector caspases. Initiator caspases possessed specific domains not encountered in effector caspases, such as caspase activation and recruitment domains (CARDs) (e.g., caspase-2 and caspase-9) or a death effector domain (DED) (caspase-8 and caspase-10). These ensure that the caspases can interact with other molecules that regulate their activation. These regulating molecules receive signals from extracellular and intracellular stimuli and interact with initiator caspases, causing their clustering. Such clustering allows initiator caspases to auto-activate and to proceed to activate effector caspases, eventually leading to the amplification of caspase activity through a protease cascade [90], considered as a positive feedback [91]. As mentioned, the activation of caspases can be initiated from extracellular stimuli involving death receptors on the plasma membrane (receptor pathway) or through intracellular stimuli centered in mitochondria (mitochondrial pathway) [92].

Death receptor stimulation activates procaspase-8, whereas the mitochondrial pathway involves the release of cytochrome c and other factors that activate procaspase-9 [24, 92]. Both signaling pathways will eventually lead to downstream activation of caspase-3, which is a major effector in the caspase cascade. Since caspase-3 serves as a convergence point for different signaling pathways, it is therefore well suited as a read-out in an apoptosis assay. In the current studies, we used fluorescent substrates of these three major caspases to probe their activation by flow cytometry. Our results clearly show an increased activity of cleaved caspase 3, 8 and 9 activities in MDCK cells subjected to a 700 mOsm/L hypertonic stress for 18 h. Moreover, the proportion of caspase 8 and 9 “positive” cells was 22.5% and 23.4%, respectively, which indicates that the death receptor and mitochondrial pathways were similarly activated in cells challenged by hypertonic medium.

When we studied the five plant species that were selected to represent strong, medium and low cytoprotective potential in AnnV/PI assays, their rank order of inhibition of hypertonic stress-

induced cell damage was mostly maintained for cleaved caspases 3, 8 and 9, except for *G. hispidula* that was ineffective at reducing the activity of caspases 3 and 8, and *R. tomentosum* that was unexpectedly effective in reducing the activity of caspases 3 and 9.

Rather limited knowledge is available regarding *G. hispidula*. In previous studies from our group, the plant extract exerted some cytoprotective potential in preneuronal cells subjected to hyperglycemic stress [27] and moderately stimulated AMPK in cultured hepatocytes [11]. The current studies uncovered a strong cytoprotective potential for renal tubular cells as observed through improved viability (annV⁻/PI⁻ staining) and reduced early stage apoptosis (annV⁺/PI⁻ staining). However, as mentioned *G. hispidula* did not succeed in significantly modulating the activities of caspases 3 and 8 in hypertonically stressed MDCK cells. This suggests that the nephroprotective activity of the plant extract may occur principally through the mitochondrial pathway (significant reduction of cleaved caspase 9) or through pathways other than the classic apoptotic signaling pathways (death receptor or mitochondrial) [93].

Meanwhile, the non-cytoprotective plant *S. purpurea* actually enhanced the activity of all cleaved caspases in hypertonically stressed MDCK cells. Hence, despite the fact that *S. purpurea* previously exhibited a positive impact on muscle cell glucose uptake [34] and, notably, cytoprotection of pre-neuronal cells (potential benefit in diabetic neuropathy [37]), the plant appears to be potentially more harmful to renal cells. Indeed, Elders have cautioned us that the pitcher plant needed to be used carefully for it is considered very powerful.

Another of the weaker nephroprotective plants in our Ann V/PI assay, namely *R. groenlandicum*, appeared to increase the activation of caspase 8 compared to hypertonic stress whereas it had no apparent effect on cleaved caspase 3 and caspase 9 activities. This result is surprising since Labrador tea (*R. groenlandicum*) was previously observed by our group to exhibit several beneficial antidiabetic activities when tested in both *in vitro* bioassays [36, 94] and *in vivo* animal models of obesity and mild diabetes [95, 96]. Such antidiabetic activities would be expected to improve renal function (for instance, through reduction of glycemia and improvement of insulin resistance). In fact, we observed improved micro-albuminuria, reduced fibrosis and diminished expression of Bcl2-modulating factor (Bmf) in renal tissues of diet-induced obese mice treated with *R. groenlandicum* *in vivo* [95]. Interestingly, in the current studies, *R. tomentosum*, a close relative of *R. groenlandicum* also known as Northern Labrador tea, exhibited significant anti-apoptotic potential that was expressed more potently through the

suppression of the mitochondrial apoptotic pathway than that of the death receptor pathway. Further studies will thus be necessary to ascertain the complete impacts of Labrador or Northern Labrador tea consumption on the kidney.

In contrast, *A. balsamea* clearly stands out as one of the most powerful renal protective Cree plants that exhibited important anti-apoptotic activities, especially at the level of caspases 3 and 9. Our previous work with *A. balsamea* extracts demonstrated that they can significantly enhance basal and insulin stimulated glucose uptake in cultured skeletal muscle cells and adipocytes [28]. The plant was also the most powerful of Cree species to mitigate liver cell glucose production mechanisms *in vitro* through both insulin-dependent and insulin-independent mechanisms [86]. In skeletal muscle cells, *A. balsamea* exerted its action through a mechanism similar to that of metformin, involving the activation of AMPK secondary to metabolic stress induced by the disruption of mitochondrial energy transduction (energy depletion), albeit with only mild effects on cell pH or ATP levels [97]. It is interesting to speculate that *A. balsamea*'s effects on mitochondria can also result in triggering anti-apoptotic events but further studies will be necessary to address this point.

Lastly, it is acknowledged that our study provides a good assessment of the efficacy (maximal effect) of the various plant extracts, used at maximal non-toxic concentrations, but does not provide values of EC50 (improvement of cell viability) or IC50 (reduction of apoptosis and caspase activities) that can offer an indication of the relative potencies of the various plant extracts tested. This approach was selected to be consistent with our numerous previous screening studies with the same 17 plant species, carried out in various bioassays related to diabetes and/or its complications [11, 27, 28, 34, 97]. In addition, EC50 and IC50 values are usually applied to drugs and pure compounds acting on a defined target, generally a receptor, and are thus of limited interpretation when applied to complex mixtures such as crude plant extracts used herein.

Conclusion

In summary, this study demonstrates that *A. balsamea* and *G. hispidula* exhibit the greatest potential of all Cree antidiabetic plants tested to protect kidney cells against damage induced by tubular apoptosis. *A. balsamea* appears to do so by suppressing apoptosis, most likely through actions on the mitochondrial caspase signaling pathway, whereas *G. hispidula* may exert its

renal protective potential through mitochondrial and other pathways. In addition, the data generated in the current study suggest that this bioassay involving MDCK cells and flow cytometry may represent a useful and novel tool to screen for nephroprotective agents.

Finally, these findings may have clinical significance for the mitigation of DN that is affecting CEI communities. Indeed, Cree medicinal plant species may contain phytochemical components that can provide novel pharmacological avenues to improve DN treatment and management. More importantly, Cree traditional plant preparations hold promise as complementary therapies that are culturally adapted and respectful. As such, future clinical studies should be encouraged.

Acknowledgement

We thank Shirley Campbell for precious help with experimental troubleshooting. We are also indebted to Prof. John Thor Arnason for constant support and advice in this project. Very special thanks are due to Cree Elders of Eeyou Istchii who kindly agreed to be interviewed. They made this paper possible by allowing us to use, for the purposes of this research, their knowledge related to medicinal plants transmitted to them by their predecessors. Their trust has also enabled a useful exchange between Indigenous knowledge and Western science.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

Team Grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines; CTP-79855 and OP2-144645) to Pierre S. Haddad and collaborators funded these studies.

8. Tables

Table 1: Phytochemical characteristics of 17 Cree plant species (Continued)

Latin Name of Plant Species	Cree Name	Common Name	Plant Part	Major Constituents with Antidiabetic Potential	Other identified Phytochemicals
1. <i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.	Inaast	Balsam fir	Inner bark	Dehydroabietic acid	Limonene, Camphene, Trans-Zeatin, Dehydrojuvabione, Juvabione, (+)-Isojuvabiol, Abienol
2. <i>Alnus incana</i> subsp. <i>rugosa</i> (Du Roi) R.T. Clausen	Atuuspiih	Speckled alder	Inner bark	Oregonin	Taraxerol, Taraxerone
3. <i>Gaultheria hispidula</i> (L.) Muhl.	Piyeumanaan	Creeping snowberry	Leaves	Not determined	P-Coumaric acid, Myricetrin, Taxifolin glycoside, Rutin, Quercetin-3-galactoside, Quercetin-3-glucoside, Catechol

4. <i>Juniperus communis</i> L.	Kaakaachuminatuk	Ground Juniper	Berries	Not determined	Afzelechin, Sciadopitysin, Longifolene, Scutellarein 6-xyloside, Bilobetin, 6-Hydroxyluteolin 6-xyloside, Quercetin 3-O-L-rhamnoside, Epiafzelechin, Junionone, Junipercomnoside A, Junipercomnoside B, (+)-Isocupressic acid, Communic acid, (+)-Junenol, (+)-Sugiol, Elliotinol, 1-(1,4-Dimethyl-3-cyclohexen-1-yl) ethanone, Geijerone, Junicedral
5. <i>Kalmia angustifolia</i> L.	Uischichipukw	Sheep laurel	Leaves	Not determined	Asebotin, Procyanidin A2, Quercetin glycoside, Myricetin
6. <i>Larix laricina</i> Du Roi (K. Koch)	Waatinaakan	Tamarack	Inner bark	Awashishinic acid, 13-epitorulosol, Rhapontigenin, Reaponticin	Laricitrin 3-glucoside, Syringetin 3-glucoside

<p>7. <i>Lycopodium clavatum</i> L.</p>	<p>Pastinaakwaakin</p>	<p>Common clubmoss</p>	<p>Whole plant</p>	<p>Not determined</p>	<p>8-beta-Hydroxylycopodine, Alpha-Obscurine, O-Acetylfawcettiine, Beta-Dihydrolycopodine, Beta-Lofoline, Lycodoline</p>
<p>8. <i>Picea glauca</i> (Moench) Voss</p>	<p>Minhiikw</p>	<p>White spruce</p>	<p>Needles</p>	<p>Not determined</p>	<p>Astringin, Isorhapontigenin 3-O-beta-D-glucopyranoside, Piceatannol, Isorhapontigenin</p>
<p>9. <i>Picea mariana</i> (P. Mill.) BSP</p>	<p>Iinaatikw</p>	<p>Black spruce</p>	<p>Cones</p>	<p>Not determined</p>	<p>Astringin, Isorhapontigenin 3-O-beta-D-glucopyranoside, Piceatannol, Isorhapontigenin</p>

<p>10. <i>Pinus banksiana</i> Lamb.</p>	<p>Ushisk</p>	<p>Jack pine</p>	<p>Cones</p>	<p>Not determined</p>	<p>Pinobanksin, Cyanidin 3-O-glucoside, Pinosylvin, Pinosylvin methyl ether, Quercetin 3,3'-diglucoside, Kaempferol 3-O-beta-D- (6''-coumaroyl)-glucopyranoside, Helichryoside, Peonidin 3-O-beta-D-glucopyranoside, Delphinidin 3-O-beta-D-glucopyranoside, Petunidin 3-O-beta-D-glucopyranoside, Oenin, 13-Epimanoyl oxide, Torulosol</p>
<p>11. <i>Populus balsamifera</i> L.</p>	<p>Mash-mitush</p>	<p>Balsam poplar</p>	<p>Inner bark</p>	<p>Salicortin A and B</p>	<p>Acetophenone, (+)-alpha-Bisabolol, 2',4',6'-Trihydroxy dihydrochalcone, 2',6'-Dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone, 2',4',6'-Trihydroxy-4-methoxydihydrochalcone</p>

12. <i>Rhododendron groenlandicum</i> (Oeder) Kron and Judd	Kaachepukw	Labrador tea	Leaves	Catechin and epicatechin	Taxifolin, Procyanidin A, Dihydroquercetin, (2R,3R)-3,5,7,3',4',5'-Hexahydroxyflavanone, Pyrocatechuic acid, Grayanotoxin I, Procyanidin B2
13. <i>Rhododendron tomentosum</i> (Stokes) Harmaja subsp. <i>Subarcticum</i> (Harmaja) G. Wallace	Wiisichipukw	Northern Labrador tea	Leaves	Not determined	Taxifolin, Procyanidin A, Dihydroquercetin, (2R,3R)-3,5,7,3',4',5'-Hexahydroxyflavanone, Pyrocatechuic acid, Grayanotoxin I, Taxifolin glycoside
14. <i>Salix planifolia</i> Pursh	Piyeuwaatikw	Tealeaf willow	Inner bark	Not determined	Amentoflavone, Picein, Myrtillin, Catechin-(2' -> 2')-taxifolin, Catechin-(4alpha- > 6)-epicatechin- (4beta- > 8)-epicatechin, Epicatechin-(4beta- > 6)- epicatechin-(4beta- > 8)- catechin
15. <i>Sarracenia purpurea</i> L.	Ayikataas	Pitcher plant	Whole plant	Isorhamnetin-3-O – glucoside, Kaempferol-3-O-(6''- caffeoylglucoside), Quercetin-3-O-galactoside, Moroniside	Histamine

16. <i>Sorbus decora</i> (Sarg.) C.K. Schneid.	Maskumanaatikw	Showy mountain ash	Inner bark	23,28-dihydroxy-lup- 12- ene-3 β -caffeate	Aucuparin
17. <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	Wiishichimanaanh	Mountain cranberry	Berries	Quercetin, Quercetin- 3-O -glucoside, Quercetin-3-O – galactoside	Arbutin, Procyanidin A1, (+)-Catechin

Table 2: List of investigated plant species and the concentrations of the extracts tested in MDCK cells (continued).

Species	Abbreviations	Plant Part	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)
1. <i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.	<i>A. balsamea</i>	Inner bark	25
2. <i>Alnus incana subsp.</i> <i>rugosa</i> (Du Roi) R.T. Clausen	<i>A. incana</i>	Inner bark	100
3. <i>Gaultheria hispidula</i> (L.) Muhl.	<i>G. hispidula</i>	Leaves	100
4. <i>Juniperus communis</i> L.	<i>J. communis</i>	Berries	25

5. <i>Kalmia angustifolia</i> L.	<i>K. angustifolia</i>	Leaves	50
6. <i>Larix laricina</i> Du Roi (K.Koch)	<i>L. laricina</i>	Inner bark	25
7. <i>Lycopodium</i> <i>clavatum</i> L.	<i>L. clavatum</i>	Whole plant	100
8. <i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	<i>P. glauca</i>	Needles	150
9. <i>Picea mariana</i> (P. Mill.) BSP	<i>P. mariana</i>	Cones	5
10. <i>Pinus banksiana</i> Lamb.	<i>P. banksiana</i>	Cones	10
11. <i>Populus</i> <i>balsamifera</i> L.	<i>P. balsamifera</i>	Inner bark	100
12. <i>Rhododendron</i> <i>groenlandicum</i> (Oeder) Kron and Judd	<i>R. groenlandicum</i>	Leaves	50
13. <i>Rhododendron</i> <i>tomentosum</i> (Stokes) Harmaja subsp. <i>subarcticum</i> (Harmaja) G. Wallace	<i>R. tomentosum</i>	Leaves	100
14. <i>Salix planifolia</i> Pursh	<i>S. planifolia</i>	Inner bark	25

15. <i>Sarracenia purpurea</i> L.	<i>S. purpurea</i>	Whole plant	100
16. <i>Sorbus decora</i> (Sarg.) C.K. Schneid.	<i>S. decora</i>	Inner bark	25
17. <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	<i>V. vitis-idaea</i>	Berries	100

9. Figure legends

Figure 1. Renal protective potential of 17 antidiabetic medicinal plant extracts. AnnV/PI labeling was performed 18 h after plant extract treatment to assess viability and early stage apoptosis. **a-c** Representative pictures of flow cytometry. PI⁺ Quadrants Q1 and Q2 respectively represent necrosis and late stage apoptosis/secondary necrosis; AnnV⁻/PI⁻ Quadrant Q4 represents viable cells; AnnV⁺/PI⁻ Quadrant Q3 represents early stage apoptosis; (d) Histogram of change in AnnV⁻/PI⁻ signal (viable cells). Data are presented relative to 700 mOsm/L hypertonic stress to show the improvement in cell viability observed in control (isotonic EMEM), vehicle (0.1% DMSO in isotonic EMEM), positive control (Z-VAD-FMK in hypertonic EMEM) and plant extract treated (in hypertonic EMEM) cells; (e) Histogram of change in AnnV⁺/PI⁻ signal (apoptotic cells). Data are presented relative to 700 mOsm/L hypertonic stress to show the reduction in apoptotic cells observed in control (isotonic EMEM), vehicle (0.1% DMSO in isotonic EMEM), positive control (Z-VAD-FMK in hypertonic EMEM) and plant extract treated (in hypertonic EMEM) cells; Results (d and e) were expressed as means \pm SEM for 3 separate experiments. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) and **** ($P < 0.0001$) denotes other treatments significantly different from 700 mOsm/L hypertonic stress treatment, one-way ANOVA and Bonferroni test. ## ($P < 0.01$), ### ($P < 0.001$) and #### ($P < 0.0001$) denotes other treatments significantly different from isotonic EMEM, one-way ANOVA and Bonferroni test.

Figure 2.

Cleaved caspase 3 activity. Cleaved caspase 3 activity test was performed 18 h after the treatment with respective plant extracts. **(a-d)** Representative pictures of flow cytometry. Ordinate indicates cell count whereas abscissa represents fluorescence signal strength. From left to right, 1st peak indicates procaspase 3 and 2nd peak represents cleaved caspase 3 activity. **e** Histogram of percent cleaved caspase 3 positive cells. The percent cleaved caspase 3 activity was calculated as the area of 2nd peak/total area \times 100. Results were expressed as means \pm SEM for 3 separate experiments. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) and **** ($P < 0.0001$) denotes other treatments significantly different from 700 mOsm/L hypertonic

stress treatment, one-way ANOVA and Bonferroni test. ## ($P < 0.01$), ### ($P < 0.001$) and #### ($P < 0.0001$) denotes treatment groups significantly different from isotonic EMEM, one-way ANOVA and Bonferroni test.

Figure 3. Cleaved caspase 8 activity. Cleaved caspase 8 activity test was performed 18 h after the treatment with respective plant extracts. **a-d** Representative pictures of flow cytometry. Ordinate indicates cell count whereas abscissa represents fluorescence signal strength. From left to right, 1st peak indicates procaspase 8 and 2nd peak represents cleaved caspase 8 activity. **e** Histogram of percent cleaved caspase 8 positive cells. The percent cleaved caspase 8 activity was calculated as the area of 2nd peak/total area \times 100. Results were expressed as means \pm SEM for 3 separate experiments. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) and **** ($P < 0.0001$) denotes other treatments significantly different from 700 mOsm/L hypertonic stress treatment, one-way ANOVA and Bonferroni test. ## ($P < 0.01$), ### ($P < 0.001$) and #### ($P < 0.0001$) denotes treatment groups significantly different from isotonic EMEM, one-way ANOVA and Bonferroni test.

Figure 4. Cleaved caspase 9 activity. Cleaved caspase 9 activity. Cleaved caspase 9 activity test was performed 18 h after the treatment with respective plant extracts. **a-d** Representative pictures of flow cytometry. Ordinate indicates cell count whereas abscissa represents fluorescence signal strength. From left to right, 1st peak indicates procaspase 9 and 2nd peak represents cleaved caspase 9 activity. **e** Histogram of percent cleaved caspase 9 positive cells. The percent cleaved caspase 9 activity was calculated as the area of 2nd peak/total area \times 100. Results were expressed as means \pm SEM for 3 separate experiments. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$) and **** ($P < 0.0001$) denotes other treatments significantly different from 700 mOsm/L hypertonic stress treatment, one-way ANOVA and Bonferroni test. ## ($P < 0.01$), ### ($P < 0.001$) and #### ($P < 0.0001$) denotes treatment groups significantly different from isotonic EMEM, one-way ANOVA and Bonferroni test.

10. Figures

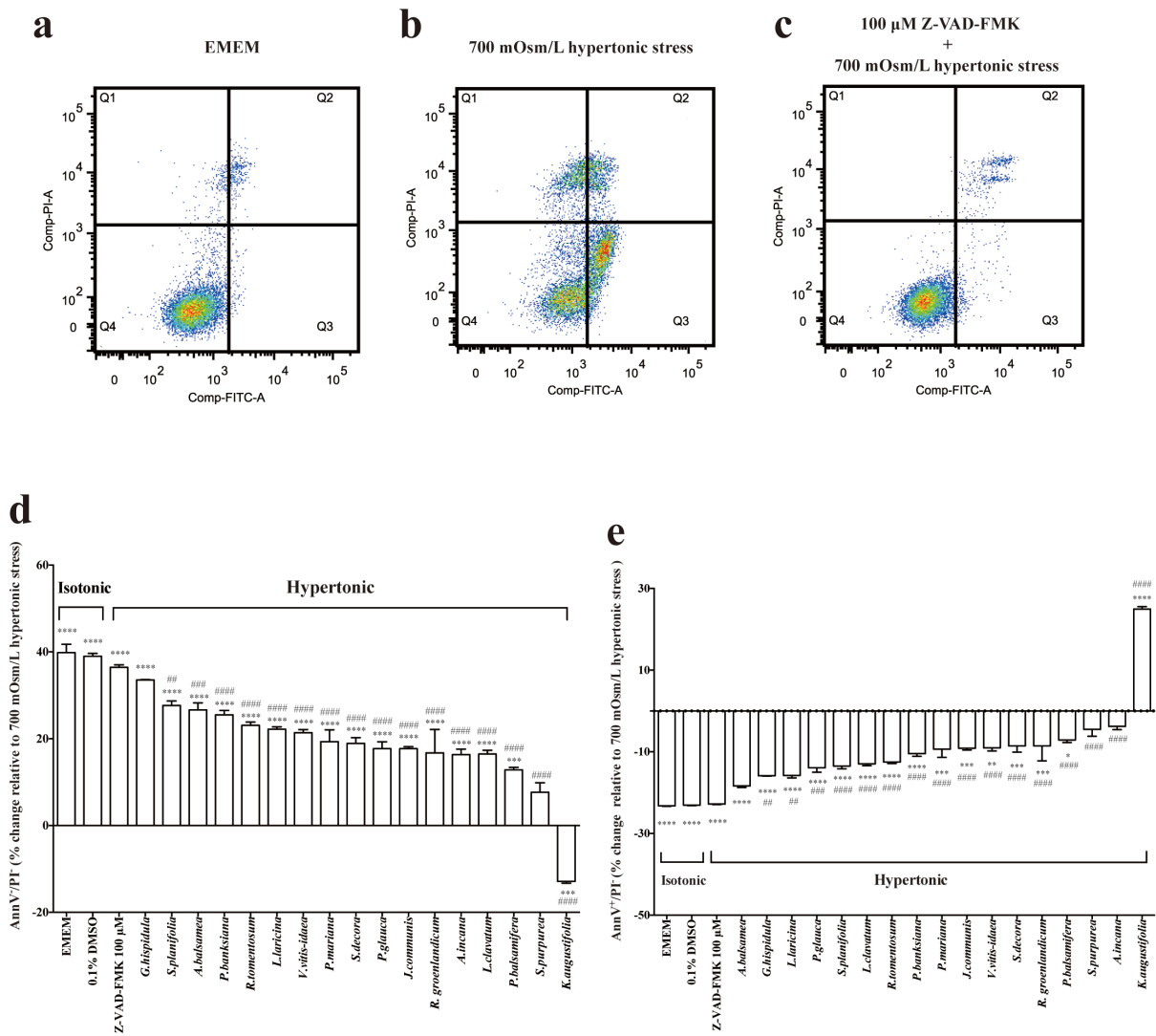


Figure 1: Renal protective potential of 17 anti-diabetic medicinal plant extracts.

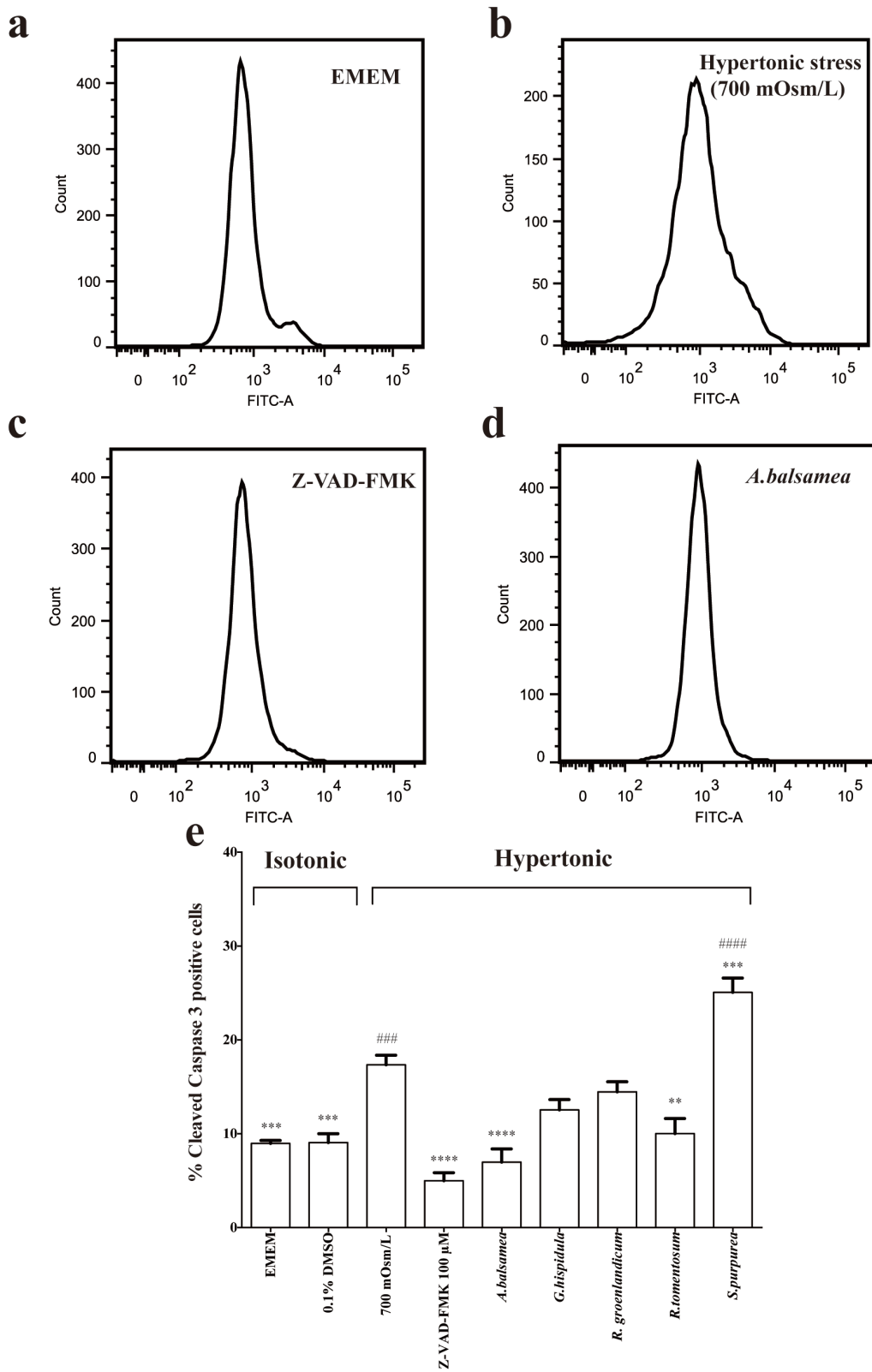


Figure 2: Cleaved caspase 3 activity.

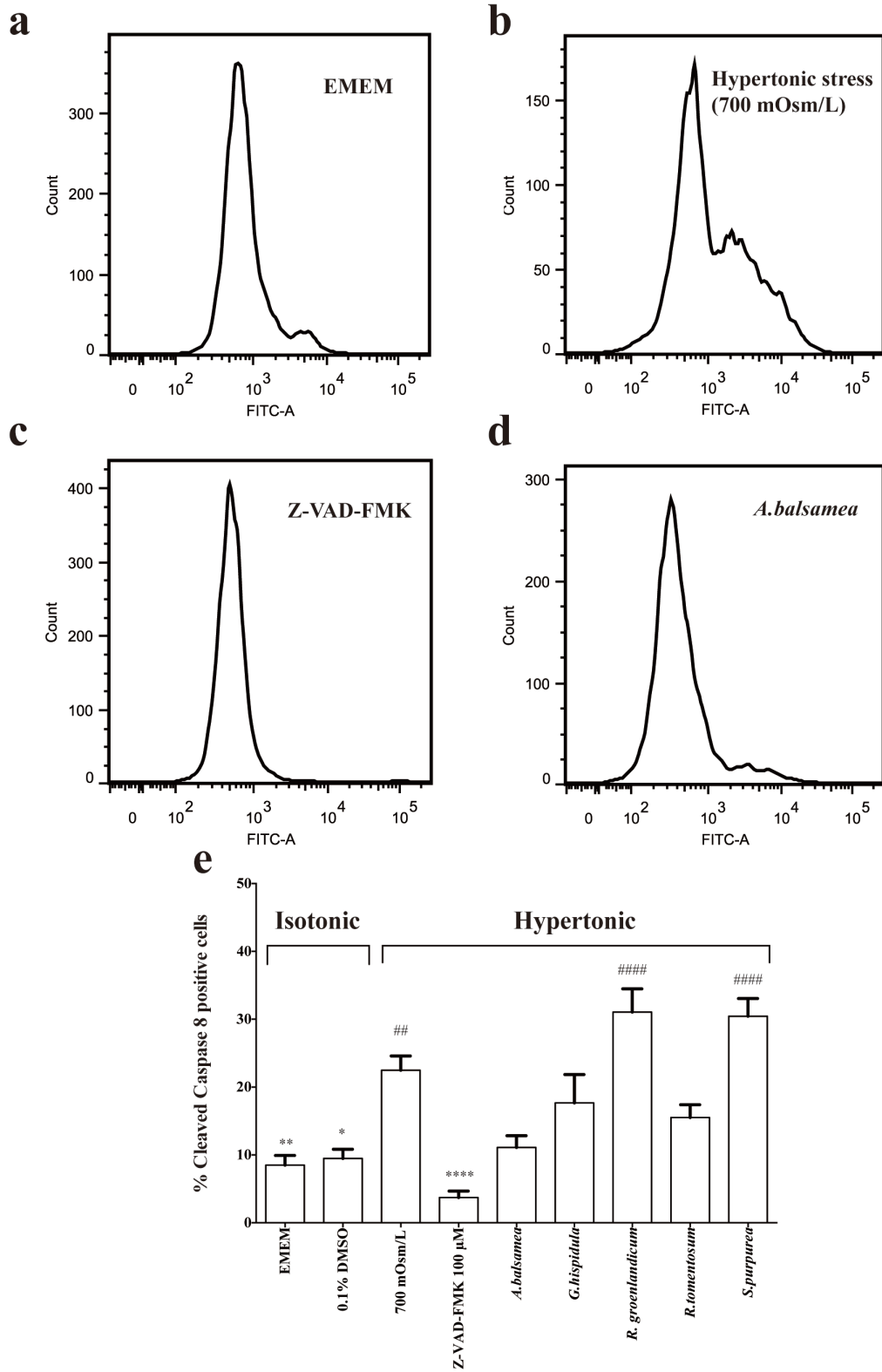


Figure 3: Cleaved caspase 8 activity.

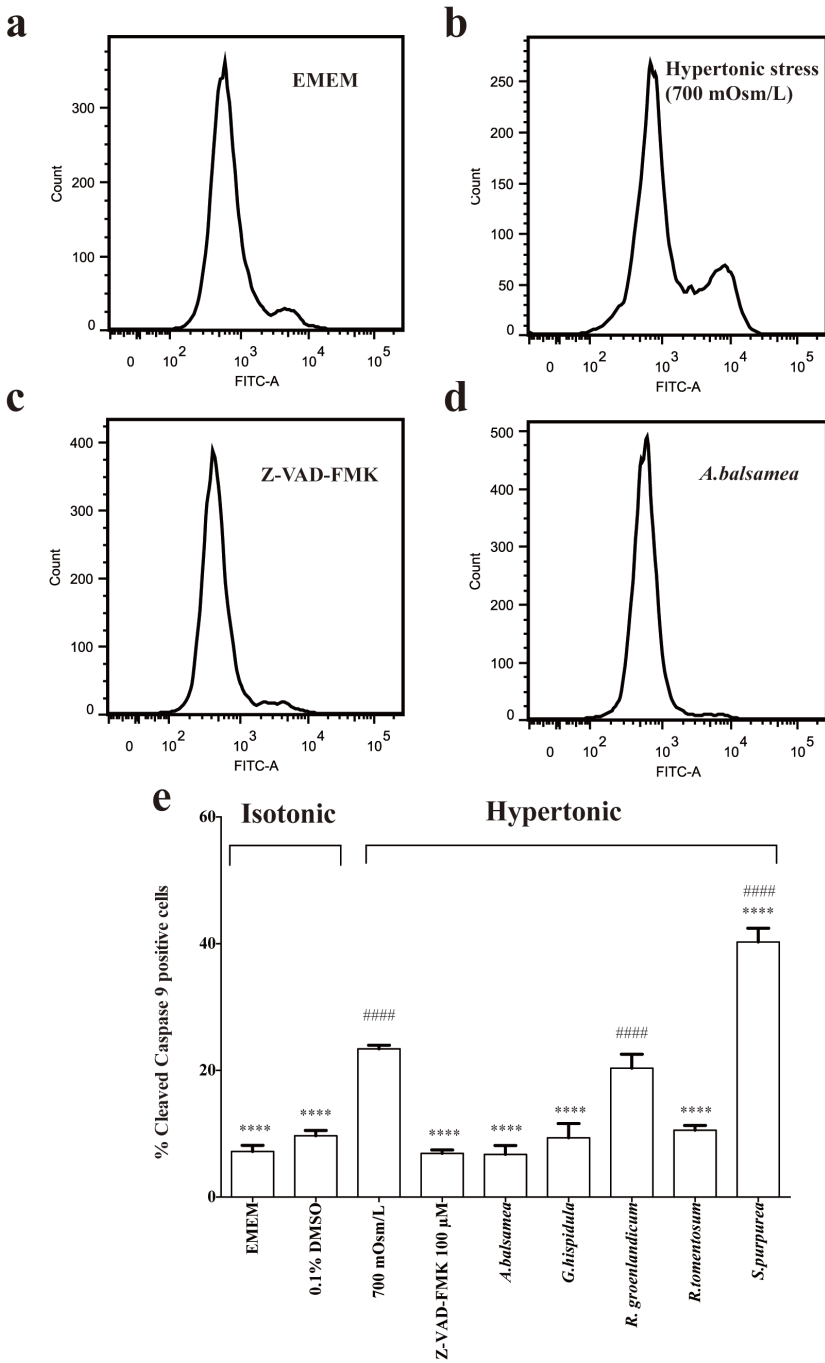


Figure 4: Cleaved caspase 9 activity.

11. References

1. Polonsky KS. The past 200 years in diabetes. *N Engl J Med.* 2012;367:1332–1340. doi: 10.1056/NEJMra1110560.
2. Ozougwu JC, Obimba KC, Belonwu CD, Unakalamba CB. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Pathophysiol.* 2013;4:46–57. doi: 10.5897/JPAP2013.0001.
3. Tan KT, Cheah JS. Pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Ann Acad Med Singap.* 1990;19:506–511.
4. Hall JE, Guyton AC. *Guyton and hall textbook of medical physiology.* 12. Philadelphia: Elsevier; 2011.
5. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004;27:1047–1053. doi: 10.2337/diacare.27.5.1047.
6. Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med.* 1997;14(Suppl 5):S1–85.
7. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care.* 1998;21:1414–1431. doi: 10.2337/diacare.21.9.1414.
8. King H, Rewers M. Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. WHO ad hoc diabetes reporting group. *Diabetes Care.* 1993;16:157–177. doi: 10.2337/diacare.16.1.157.
9. Ekoe JM, Thouez JP, Petitclerc C, Foggin PM, Ghadirian P. Epidemiology of obesity in relationship to some chronic medical conditions among Inuit and Cree Indian populations in new Quebec, Canada. *Diabetes Res Clin Pract.* 1990;10(Suppl 1):S17–S27. doi: 10.1016/0168-8227(90)90135-G.
10. Hegele RA, Cao H, Harris SB, Hanley AJ, Zinman B. The hepatic nuclear factor-1alpha G319S variant is associated with early-onset type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1077–1082.
11. Nachar A, Vallerand D, Musallam L, Lavoie L, Badawi A, Arnason J, et al. The action of antidiabetic plants of the canadian james bay cree traditional pharmacopeia on key enzymes of

- hepatic glucose homeostasis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:189819. doi: 10.1155/2013/189819.
12. Neel JV. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? *Am J Hum Genet.* 1962;14:353–362.
13. Young TK, Reading J, Elias B, O'Neil JD. Type 2 diabetes mellitus in Canada's first nations: status of an epidemic in progress. *CMAJ.* 2000;163:561–566.
14. Kuzmina E, Lejeune P, Dannenbaum D, Torrie JE. Cree diabetes information system (CDIS) 2009 annual report. 3. Cree Board of Health and Social Services of James Bay: Montréal; 2010.
15. Obesity GD. The eating habits of the aboriginal population. *Health Rep.* 2008;19:21–35.
16. Hanley AJ, Harris SB, Mamakeesick M, Goodwin K, Fiddler E, Hegele RA, et al. Complications of type 2 diabetes among aboriginal Canadians: prevalence and associated risk factors. *Diabetes Care.* 2005;28:2054–2057. doi: 10.2337/diacare.28.8.2054.
17. Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1999;341:1127–1133. doi: 10.1056/NEJM1999100734111506.
18. Fineberg D, Jandeleit-Dahm KA, Cooper ME. Diabetic nephropathy: diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9:713–723. doi: 10.1038/nrendo.2013.184.
19. Adler AI, Stratton IM, Neil HA, Yudkin JS, Matthews DR, Cull CA, et al. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ.* 2000;321:412–419. doi: 10.1136/bmj.321.7258.412.
20. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ.* 2000;321:405–412. doi: 10.1136/bmj.321.7258.405.
21. Diabetes HSL. renal tubular cell apoptosis. *World J Diabetes.* 2013;4:27–30. doi: 10.4239/wjd.v4.i2.27.
22. Kumar D, Robertson S, Burns KD. Evidence of apoptosis in human diabetic kidney. *Mol Cell Biochem.* 2004;259:67–70. doi: 10.1023/B:MCBI.0000021346.03260.7e.
23. Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Lorz C, Gnirke A, Rastaldi MP, Nair V, et al. BASP1 promotes apoptosis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:610–621. doi: 10.1681/ASN.2009020227.

24. Horio M, Ito A, Matsuoka Y, Moriyama T, Orita Y, Takenaka M, et al. Apoptosis induced by hypertonicity in Madin Darley canine kidney cells: protective effect of betaine. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16:483–490. doi: 10.1093/ndt/16.3.483.
25. Fraser MH, Cuerrier A, Haddad PS, Arnason JT, Owen PL, Johns T. Medicinal plants of Cree communities (Quebec, Canada): antioxidant activity of plants used to treat type 2 diabetes symptoms. *Can J Physiol Pharmacol* 2007;85:1200–1214.
26. Haddad PS, Musallam L, Martineau LC, Harris C, Lavoie L, Arnason JT, et al. Comprehensive evidence-based assessment and prioritization of potential antidiabetic medicinal plants: a case study from canadian eastern james bay cree traditional medicine. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:893426. doi: 10.1155/2012/893426.
27. Harbilas D, Martineau LC, Harris CS, Adeyiwola-Spoor DC, Saleem A, Lambert J, et al. Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: part II. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009;87:479–492. doi: 10.1139/Y09-029.
28. Spoor DC, Martineau LC, Leduc C, Benhaddou-Andaloussi A, Meddah B, Harris C, et al. Selected plant species from the Cree pharmacopoeia of northern Quebec possess anti-diabetic potential. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84:847–858. doi: 10.1139/y06-018.
29. Erkan E, Devarajan P, Schwartz GJ. Apoptotic response to albumin overload: proximal vs. distal/collecting tubule cells. *Am J Nephrol*. 2005;25:121–131. doi: 10.1159/000084888.
30. Hizoh I, Haller C. Radiocontrast-induced renal tubular cell apoptosis: hypertonic versus oxidative stress. *Investig Radiol*. 2002;37:428–434. doi: 10.1097/00004424-200208000-00003.
31. Terada Y, Inoshita S, Hanada S, Shimamura H, Kuwahara M, Ogawa W, et al. Hyperosmolality activates Akt and regulates apoptosis in renal tubular cells. *Kidney Int*. 2001;60:553–567. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.060002553.x.
32. Yoshida T, Yoshino J, Hayashi M, Saruta T. Identification of a renal proximal tubular cell-specific enhancer in the mouse 25-hydroxyvitamin d 1alpha-hydroxylase gene. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:1455–1463. doi: 10.1097/01.ASN.0000013885.23734.CA.
33. Zhang B, Suzuki JS, Nishimura N, Tohyama C. Difference in cadmium cytotoxicity in two kidney cell lines (LLC-PK(1) and MDCK) with special reference to metallothionein. *Toxicol in Vitro*. 1995;9:765–772. doi: 10.1016/0887-2333(95)00055-D.

34. Shang N, Saleem A, Musallam L, Walshe-Roussel B, Badawi A, Cuerrier A, et al. Novel approach to identify potential bioactive plant metabolites: pharmacological and metabolomics analyses of ethanol and hot water extracts of several Canadian medicinal plants of the Cree of Eeyou Istchee. *PLoS One*. 2015;10:e0135721. doi: 10.1371/journal.pone.0135721.
35. Yong Y, Saleem A, Guerrero-Analco JA, Haddad PS, Cuerrier A, Arnason JT, et al. Larix Laricina bark, a traditional medicine used by the Cree of Eeyou Istchee: antioxidant constituents and in vitro permeability across Caco-2 cell monolayers. *J Ethnopharmacol*. 2016;194:651–657. doi: 10.1016/j.jep.2016.10.054.
36. Eid HM, Ouchfoun M, Saleem A, Guerrero-Analco JA, Walshe-Roussel B, Musallam L, et al. A combination of (+)-catechin and (–)-epicatechin underlies the in vitro adipogenic action of Labrador tea (*Rhododendron Groenlandicum*), an antidiabetic medicinal plant of the eastern James Bay Cree pharmacopeia. *J Ethnopharmacol*. 2016;178:251–257. doi: 10.1016/j.jep.2015.12.021.
37. Harris CS, Asim M, Saleem A, Haddad PS, Arnason JT, Bennett SA. Characterizing the cytoprotective activity of *Sarracenia Purpurea L.*, a medicinal plant that inhibits glucotoxicity in PC12 cells. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:245. doi: 10.1186/1472-6882-12-245.
38. Shang N, Guerrero-Analco JA, Musallam L, Saleem A, Muhammad A, Walshe-Roussel B, et al. Adipogenic constituents from the bark of *Larix Laricina du Roi* (K. Koch; Pinaceae), an important medicinal plant used traditionally by the Cree of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of type 2 diabetes symptoms. *J Ethnopharmacol*. 2012;141:1051–1057. doi: 10.1016/j.jep.2012.04.002.
39. Nachar A, Saleem A, Arnason JT, Haddad PS. Regulation of liver cell glucose homeostasis by dehydroabietic acid, abietic acid and squalene isolated from balsam fir (*Abies Balsamea* (L.) mill.) a plant of the eastern James Bay Cree traditional pharmacopeia. *Phytochemistry*. 2015;117:373–379. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.07.001.
40. Guerrero-Analco JA, Muhammad A, Saleem A, Martineau LC, Musallam L, Eid HM, et al. Bioactive phytochemicals from Canadian boreal Forest species used traditionally by eastern James Bay Cree aboriginals to treat diabetes mellitus. In: Jetter R, et al., editors. *Phytochemicals – biosynthesis, function and application: volume 44*. New York: Springer International Publishing; 2014. pp. 57–84.

41. Uyeo S, Okada J, Matsunago S. Selenium Dehydrogenation Of Abieslactone. *Yakugaku Zasshi*. 1964;84:453–457. doi: 10.1248/yakushi1947.84.5_453.
42. Steglich W, Klaar M, Zechlin L, Hecht HJ. Abietospiran, the triterpene from the bark of the white fir (*Abies Alba*). *Angew Chem Int Ed*. 1979;18 doi:10.1002/anie.197906981.
43. Baxter H, Harborne JB, Moss GP. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. 2. London et Philadelphia: Taylor & Francis: CRC press; 1999.
44. Manville JF, Kriz CD. Juvabione and its analogues.: IV. Isolation, identification, and occurrence of juvabione, juvabiol, and epijuvabiol from the whole wood of *Abies Lasiocarpa*. *Can J Chem*. 1977;55:2547–2553. doi: 10.1139/v77-351.
45. Gray PS, Mills JS. 1109. The isolation of abienol from Canada balsam, the oleoresin of *Abies Balsamea*(L.) mill. *J Chem Soc*. 1964; doi:10.1039/JR9640005822.
46. Ryabinin AA. *Journal of general chemistry of the Union of Soviet Socialist Republics*. 1. New York: Consultants Bureau Enterprises; 1962.
47. Saleem A, Harris CS, Asim M, Cuerrier A, Martineau L, Haddad PS, et al. A RP-HPLC-DAD-APCI/MSD method for the characterisation of medicinal Ericaceae used by the Eeyou Istchee Cree first nations. *Phytochem Anal*. 2010;21:328–339. doi: 10.1002/pca.1203.
48. Teresa JdP JG, Urones, Basabe P, Llanos A *Anales de Quim*. 1977;73:463.
49. *Phytochemical L-ZE*. Studies on flavonoids and other compounds of juniper fruits. *Pol J Chem*. 1980;54:213–219.
50. Baker W, Finch ACM, Ollis WD, Robinson KW. 280. The structures of the naturally occurring biflavonyls. *J Chem Soc*. 1963; doi:10.1039/JR9630001477.
51. Nakanishi T, Iida N, Inatomi Y, Murata H, Inada A, Murata J, et al. Neolignan and flavonoid glycosides in *Juniperus Communis* Var. *Depressa*. *Phytochemistry*. 2004;65:207–213. doi: 10.1016/j.phytochem.2003.10.025.
52. Weinges K, Göritz K, Nader F. Zur Kenntnis der Proanthocyanidine, XII Konfigurationsbestimmung von C₃₀H₂₆O₁₂-Procyanidinen und Strukturaufklärung eines neuen Procyanidins. *European J Org Chem*. 1968;715:164–171.
53. Thomas AF, Ozainne M. “Junionone” [1-(2,2-dimethylcyclobutyl)but-1-en-3-one], the first vegetable monocyclic cyclobutane monoterpene. *J Chem Soc Chem Commun*. 1973; doi:10.1039/C39730000746.

54. Kagawa K, Tokura K, Uchida K, Kakushi H, Shike T, Kikuchi J, et al. Platelet aggregation inhibitors in a Bhutanese medicinal plant, Shug Chher. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1993;41:1604–1607. doi: 10.1248/cpb.41.1604.
55. Arya VP, Erdtman H, Kubota T. Chemistry of the natural order cupressales—41: the structure and stereochemistry of communic acid. *Tetrahedron*. 1961;16:255–263. doi: 10.1016/0040-4020(61)80076-8.
56. Hinge VK, Wagh AD, Paknikar SK, Bhattacharyya SC. Terpenoids—LXXI. *Tetrahedron*. 1965;21:3197–3203. doi: 10.1016/S0040-4020(01)96937-6.
57. Schneider I, Gibbons S, Bucar F. Inhibitory activity of *Juniperus Communis* on 12(S)-HETE production in human platelets. *Planta Med*. 2004;70:471–474. doi: 10.1055/s-2004-818980.
58. Arya VP, Enzell C, Erdtman H, Kubota T. Communic acid, a new Diterpene acid from *Juniperus Communis* L. *Acta Chem Scand*. 1961;15:225–226. doi: 10.3891/acta.chem.scand.15-0225.
59. Thomas AF. 1, 4-Dimethylcyclohex-3-enyl methyl ketone, a monoterpenoid with a novel skeleton. *Helv Chim Acta*. 1973;56:1800–1802. doi: 10.1002/hlca.19730560541.
60. Yannai S. Dictionary of food compounds. With CD-ROM: additives, flavors, and ingredients. 2 ed. Chapman & Hall/CRC: Boca Raton; 2004.
61. Teresa JdP, Barrero AF, Feliciano AS, Bellido IS. *Anales de Quim*. 1977;73:568.
62. Little CHA, Andrew DM, Silk PJ, Strunz GM. Identification of cytokinins zeatin and zeatin riboside in *Abies Balsamea*. *Phytochemistry*. 1979;18:1219–1220. doi: 10.1016/0031-9422(79)80139-9.
63. Williams AH. Dihydrochalcones; their occurrence and use as indicators in chemical plant taxonomy. *Nature*. 1964;202:824–825. doi: 10.1038/202824b0.
64. Wilkins CK, Bohm BA. *Can J Bot* 1976;54:2133.
65. Braekman JC, Nyembo L, Bourdoux P, Kahindo N, Hootele C. Distribution des alcaloïdes dans le genre *Lycopodium*. *Phytochemistry*. 1974;13:2519–2528. doi: 10.1016/S0031-9422(00)86930-7.
66. Manners GD, Swan EP. Stilbenes in the barks of five canadian *Picea* species. *Phytochemistry*. 1971;10:607–610. doi: 10.1016/S0031-9422(00)94705-8.
67. Nozzolillo C, Isabelle P, Andersen OM, Abou-Zaid M. Anthocyanins of jack pine (*Pinus Banksiana*) seedlings. *Can J Bot*. 2002;80:796–801. doi: 10.1139/b02-056.

68. Rowe JW, Bower CL, Wagner ER. Extractives of jack pine bark: occurrence of cis- and trans-pinosylvin dimethyl ether and ferulic acid esters. *Phytochemistry*. 1969;8:235–241. doi: 10.1016/S0031-9422(00)85819-7.
69. Vermes B, Chari VM, Wagner H. Structure elucidation and synthesis of Flavonol Acylglycosides. III.. The synthesis of tiliroside. *Helv Chim Acta*. 1981;64:1964–1967. doi: 10.1002/hlca.19810640630.
70. Farkas L, Vermes B, Nógrádi M. Synthese von Flavonoidbis(glycosiden), V. Die Synthese sämtlicher bekannter natürlicher Quercetinbis(glucoside) *Chem Ber*. 1974;107:1518–1525. doi: 10.1002/cber.19741070512.
71. Abou-zaid MM, Nozzolillo C. Flavonol glycosides from needles of *Pinus Banksiana*. *Biochem Syst Ecol*. 1991;19:237–240. doi: 10.1016/0305-1978(91)90007-M.
72. Bower CL, Rowe JW. Extractives of jack pine bark: occurrence of (+)-13-epimanoyl oxide and related labdane diterpenes. *Phytochemistry*. 1967;6:151–153. doi: 10.1016/0031-9422(67)85024-6.
73. Carman R, Duffield A. (+) α -Bisabolol and (+)-Anymol. A Repetition of the Synthesis From the Limonene 8,9-Epoxides. *Aust J Chem* 1989;42:2035–2039.
74. Tanaka H, Ichino K, Ito K. Dihydrochalcones from *lindera umbellata*. *Phytochemistry*. 1984;23:1198–1199. doi: 10.1016/S0031-9422(00)82646-1.
75. Hillis WE, Orman HR. The extractives of New Zealand *Nothofagus* species. *J Linn Soc Bot*. 1962;58:175–184. doi: 10.1111/j.1095-8339.1962.tb00891.x.
76. Harborne JB, Williams CA. Leaf survey of flavonoids and simple phenols in the genus *rhododendron*. *Phytochemistry*. 1971;10:2727–2744. doi: 10.1016/S0031-9422(00)97273-X.
77. Hörhammer L, Wagner H, Reinhardt H. Isolierung des Bis-(5,7,4'-Trihydroxy-)-flavons "Amentoflavon" aus der Rinde von *Viburnum prunifolium* L. (Amerikan. Schneeball) *Sci Nat*. 1965;52:161. doi: 10.1007/BF00609279.
78. Terahara N, Takeda Y, Nesumi A, Honda T. Anthocyanins from red flower tea (Benibana-cha), *Camellia Sinensis*. *Phytochemistry*. 2001;56:359–361. doi: 10.1016/S0031-9422(00)00359-9.
79. Kolodziej H. The first natural biflavonoid with flavanol and dihydroflavonol constituent units coupled at the B-ring. *J Chem Soc Chem Commun*. 1987; doi:10.1039/C39870000205.

80. Emiko E-F, G-i N, Nishioka I, Hayashi K. Isolation and structures of Procyanidins (condensed tannins) from *Rhaphiolepis Umbellata*. *Agric Biol Chem*. 1986;50
81. Hsu F, Nonaka G, Nishioka I. Tannins and related compounds. XXXI. Isolation and characterization of Proanthocyanidins in *Kandelia candel* (L.) DRUCE. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 1985;33:3142–3152. doi: 10.1248/cpb.33.3142.
82. Niemann GJ, Baas WJ. Phenolics from *Larix* needles, 14: Flavonoids and phenolic glucosides and ester of *L-decidua* [larch]. *Z Naturforsch*. 1978;Section c, eBiosciences:33.
83. Rodewald WJ, Gryniewicz G. Lycopodium alkaloids, part VII. The alkaloids of *lycopodium clavatum*. *Rocz Chem*. 1977;51:1271–1275.
84. Harborne JB, Baxter H. The handbook of the natural flavonoids. 2nd ed. Chichester et New York: Wiley; 1999.
85. Van Noorden CJ. The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem*. 2001;103:241–251. doi: 10.1078/0065-1281-00601.
86. Eid HM, Haddad PS. Mechanisms of action of indigenous antidiabetic plants from the boreal Forest of northeastern Canada. *Advances in Endocrinology*. 2014;2014:11. doi: 10.1155/2014/272968.
87. Dannenbaum D, Kuzmina E, Lejeune P, Torrie J, Gangbe M. Prevalence of diabetes and diabetes-related complications in first nations communities in northern Quebec (Eeyou Istchee), Canada. *Can J Diabetes*. 2008;32:46–52. doi: 10.1016/S1499-2671(08)21010-5.
88. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 1996;87:171. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81334-3.
89. Lozano GM, Bejarano I, Espino J, Gonzalez D, Ortiz A, Garcia JF, et al. Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone. *J Reprod Dev*. 2009;55:615–621. doi: 10.1262/jrd.20250.
90. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003;22:8543–8567. doi: 10.1038/sj.onc.1207107.
91. Lopez-Caamal F, Middleton RH, Huber HJ. Equilibria and stability of a class of positive feedback loops. *J Math Biol*. 2014;68:609–645. doi: 10.1007/s00285-013-0644-z.
92. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407:770–776. doi: 10.1038/35037710.

93. Cullen SP, Martin SJ. Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death Differ.* 2009;16:935–938. doi: 10.1038/cdd.2009.59.
94. Rapinski M, Musallam L, Arnason JT, Haddad P, Cuerrier A. Adipogenic activity of wild populations of *Rhododendron Groenlandicum*, a medicinal shrub from the James Bay Cree traditional pharmacopeia. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:7. doi: 10.1155/2015/492458.
95. Li S, Brault A, Sanchez Villavicencio M, Haddad PS. *Rhododendron Groenlandicum* (Labrador tea), an antidiabetic plant from the traditional pharmacopoeia of the Canadian eastern James Bay Cree, improves renal integrity in the diet-induced obese mouse model. *Pharm Biol.* 2016; doi:10.3109/13880209.2015.1137953.
96. Ouchfoun M, Eid HM, Musallam L, Brault A, Li S, Vallerand D, et al. Labrador tea (*Rhododendron Groenlandicum*) attenuates insulin resistance in a diet-induced obesity mouse model. *Eur J Nutr.* 2016;55:941–954. doi: 10.1007/s00394-015-0908-z.
97. Martineau LC, Adeyiwola-Spoor DC, Vallerand D, Afshar A, Arnason JT, Haddad PS. Enhancement of muscle cell glucose uptake by medicinal plant species of Canada's native populations is mediated by a common, metformin-like mechanism. *J Ethnopharmacol.* 2010;127:396–406. doi: 10.1016/j.jep.2009.10.026.

Chapitre 4. Article 3

Cet article est en preparation pour une soumission à une revue.

Contribution de chaque co-auteur

J'avais conçu le projet, effectué tous les travaux expérimentaux, analysé les données et rédigé l'article.

Sarah Pasquin a contribué au dépannage des immunofluorescences et a contribué à l'analyse des données de cytométrie en flux.

Armelle le champion a contribué à l'analyse des données de cytométrie de flux.

Hoda Eid a aidé avec plusieurs expériences.

Ammar Saleem, sous la supervision du Dr John.T Arnason, a effectué le fractionnement phytochimique de l'extrait d'*Abies balsamea*, l'identification et l'isolement de ses constituents.

Dr Pierre S. Haddad est mon directeur de recherche qui m'a supervisé tout le long de ma période d'étude. Il a initié le cadre conceptuel du projet, aidé dans l'interprétation des données et corrigé l'article.

Abietic acid, key component of *Abies balsamea* which is a medicinal plant of the Eastern James Bay Cree pharmacopeia, was identified as the most active pure compound against renal insult

Auteurs

Shilin Li^{1,2}, Sarah Pasquin¹ Hoda Eid^{1,2,3}, Armelle Le Champion⁴, Ammar Saleem^{5,6}, John.T Arnason^{5,6}, Pierre S. Haddad^{1,2*}.

Affiliations

¹Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Canada, H3C 3J7.

² Natural Health Products and Metabolic Diseases Laboratory, CIHR Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines and Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, Montreal, Canada.

³ Dept. of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Beni-Suef University, Beni-Suef, Egypt, 62514

⁴ Department of Microbiology, Infectious diseases and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Canada, H3C 3J7.

⁵ Canadian Institutes of Health Research Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines and Montreal Diabetes Research Center, Canada

⁶ Laboratory for the Analysis of Natural and Synthetic Environmental Toxins, University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada

* Author to whom correspondence should be addressed:

Pierre S. Haddad, PhD

Department of Pharmacology

Université de Montréal

P.O. Box 6128, Downtown Postal Station

Montreal (Quebec)

Canada H3C 3J7

Abstract

Background

In a previous study, among 17 antidiabetic Boreal forest species of the traditional pharmacopeia of the Eastern James Bay Cree, *Abies balsamea* (*A. balsamea*) was identified as the one that expressed the most effective renal protective potential *in vitro* against hypertonic stress.

Aim of the study

We used a bioassay-guided fractionation approach to identify active fractions and compounds of *A. balsamea* with renal protective potential *in vitro* in MDCK cells challenged with hypertonic medium, as well as beginning to investigate the underlying mechanisms.

Materials and Methods

MDCK cells were subjected to a 700 mOsm/L hypertonic medium in the presence or absence of *A. balsamea* crude extract and its hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), methanol (MeOH) and water (H₂O) fractions. After 18 hr incubation, all cells (supernatant and adherent) were collected, stained with Annexin V (AnnV) and Propidium iodide (PI), and subjected to flow cytometry to assess the cytoprotective (AnnV⁻/PI⁻) and anti-apoptotic (AnnV⁺/PI⁻) potential. Pan caspase inhibitor carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone (Z-VAD-FMK) was used as positive control.

Results

The Hex fraction possessed the highest potential among all solvent fractions against cell damage induced by hypertonic stress. Hex notably and significantly reduced AnnV⁺/PI⁻ staining (early stage apoptosis) to 4.17% as compared to 23.40% for hypertonic controls ($P < 0.0001$). In subsequent studies, three pure compounds were identified from the Hex fraction, namely, abietic acid, dehydroabietic acid and squalene. Abietic acid stood out by its strongest effect in maintaining MDCK cell viability (AnnV⁻/PI⁻) at a relatively high level (25.48% increase relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$) as well as a significant reduction (20.20% decrease relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$) of early stage apoptosis (AnnV⁺/PI⁻). These effects were comparable to vehicle negative control (isotonic EMEM group) or Z-VAD-FMK positive protective control. Abietic acid may thus serve to standardize *A. balsamea* traditional preparations and find potential applications in the treatment of diabetic nephropathy (DN).

Keywords

Diabetic nephropathy, MDCK cells, hypertonic stress, Indigenous Traditional Medicine, annexin V, propidium iodide, Z-VAD-FMK.

1. Introduction

Diabetes is a chronic disease with uncontrolled elevated blood glucose, there are two major types, namely, type 1 diabetes (T1D) which is in absolute need of insulin due to the impaired endocrine within beta pancreatic cells, and type 2 diabetes (T2D) which is caused by insulin resistance (IR) (Zimmet et al., 2001). These conditions eventually lead to hyperglycemia in the long run (Ozougwu et al., 2013; Tan and Cheah, 1990). Classic DM includes excessive increased fluid intake, lethargy, urine production, hyperglycemia, unexplained weight loss, changes in energy metabolism compensatory thirst and blurred vision (Lin and Sun, 2010). Reduced peripheral glucose disposition in skeletal muscle, combined with increased hepatic glucose production, contribute to hyperglycemia in diabetic subjects (Nachar et al., 2015).

In addition, a series of risk factors for T2D has been reported, including genetic predisposition, psychiatric disorder, high blood pressure, obesity, aging, sedentary lifestyle, and others (Wild, S. et al., 2004). According to previous estimates, by the end of 2030, 366 million people will be suffering from DM (Amos et al., 1997; King et al., 1998; King and Rewers, 1993; Wild, S. et al., 2004). Notably, Aboriginal populations worldwide are disproportionately affected by T2D. This was associated with rapid changes of environment as well as potential genetic predisposition toward higher conservation of food calories (Ekoe et al., 1990; Hegele et al., 1999; Nachar et al., 2013; Neel, 1962; Young et al., 2000). According to previously published statistics, the average of age-adjusted prevalence of T2D was 29% in Cree populations of Eeyou Istchee (CEI - Eastern James Bay area of Quebec, Canada) (Kuzmina et al., 2010; Nachar et al., 2013). Moreover, higher prevalence of diabetic complications, notably DN, was noticed in Cree communities (Kuzmina et al., 2010; Nachar et al., 2013). Such high prevalence may have resulted, at least in part, from cultural inappropriateness of modern drug treatments (Garriguet, 2008; Hanley et al., 2005).

Diabetic nephropathy (DN), a major cause of end stage renal failure, is an important diabetic complication which is defined by a decrease in glomerular filtration rate followed by the development of proteinuria after a long period of time (usually 5-10 years) after the onset of DM (Forbes and Cooper, 2013; Gilbertson et al., 2005). DN is always associated with high mortality as a result of uremia (Mogensen et al., 1983). More importantly, pathological renal conditions also contribute to the progression of macrovascular complications, for instance strokes and heart attacks (Matsushita et al., 2010). Although a subset of subjects acquires DN

despite good glycemic control (DCCT, 1993) and normal blood pressure, most DN occurs after hypertension and hyperglycemia (Group., 1998; Turner R, 1998). Among the factors involved in the development of DN, renal tubular cell apoptosis was considered to play an important role by causing gradual loss of renal function and mass (Habib, 2013; Kumar et al., 2004; Sanchez-Nino et al., 2010). Apoptosis has been noticed in interstitial cells of renal biopsy samples from patients with DN as well as in tubular epithelial and endothelia cells, while DM is also known to induce apoptosis in various end-organ systems (Adeghate, 2004; Kowluru, 2005). Thus the gradual loss of renal function and mass in DN is considered to be the result of apoptosis (Habib, 2013; Kumar et al., 2004; Sanchez-Nino et al., 2010). In parallel, various kidney cell type can be used to study renal apoptosis, such as Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells subjected to hypertonic stress (Horio et al., 2001).

In an effort to find culturally relevant complementary and alternative approaches to T2D prevention and management for Canadian Aboriginal diabetics, the Canadian Institutes Health Research Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines (CIHR-TAAM) was founded in 2003. *A. balsamea* was first identified through ethnobotanical surveys as one of 17 promising medicinal plant species stemming from the James Bay Cree traditional pharmacopeia and its *in vitro* potential in the context of T2D was confirmed using a comprehensive platform of bioassays (Nachar et al., 2015; Nachar et al., 2013). The crude extract of *A. balsamea* was also found to express the most promising biological activity in a renal protection assay relevant to DN complications according to the findings in article 2.

In the current study, we sought to determine the active phytochemical compounds that could underlie the renal protective effect of *A. balsamea*. For that purpose, we used an approach of bioassay-guided fractionation based on solvents of different polarity and the same MDCK cell bioassay stressed with hypertonic medium, stained with Annexin V/propidium iodide (AnnV/PI) and subjected to flow cytometry analysis.

2. Materials and methods

2.1 Cell culture

MDCK cells were generously provided by Dr. Josette Noël (Département de physiologie moléculaire et intégrative, Faculté de médecine, Université de Montréal). The cells were maintained in 100 mm petri dish (Sarstedt Inc, Saint-Léonard, Canada) with Eagle's Minimum

Essential Medium (EMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.5% antibiotics (PS: Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL) and equilibrated with 5% CO₂, 95% air at 37°C. Cells were passaged every two to three days at the ratio of 1:10 after 0.25% trypsin dissociation.

2.2 Bioassay-guided isolation and compound identification by HPLC-DAD

A. balsamea was collected from the Eastern James Bay area of Quebec, Canada following the instructions of Cree healers. Voucher specimen (No. Mis03-1) was deposited in the herbarium of the Montreal Botanical Garden and botanical identification was performed by resident plant taxonomist Dr. Alain Cuerrier (Nachar et al., 2015).

The collected *A. balsamea* bark (1000 g) was air dried in the shade and then powdered on a Wiley Mill (4 mm mesh). The powdered material was subjected to fractionation using solvents of increasing polarity. Two liters of hexane was added to dried powdered bark (500 g) and mixed for 2 hours in a 10 L glass container using an electronic mixer. The supernatant was separated from pellet by vacuum filtration and dried with rotatory evaporator (yield 67.1%). This procedure was repeated with the pellet to yield 20.3% of EtOAc fraction, 10.6% MeOH fraction and 1.8% H₂O fraction. These fractions were then tested for bioactivity. Isolation of active principles from the Hex fraction was achieved using preparative scale HPLC as previously described (Nachar et al., 2015).

2.3 Cytotoxicity Assay (LDH)

Before screening the fractions of *A. balsamea*, cytotoxicity tests were performed to determine the maximal nontoxic concentrations, based on the level of lactate dehydrogenase (LDH) release (LDH Colorimetric kit; Roche, Mannheim, Germany). Cells were split by 0.25% trypsin while reaching subconfluence, and seeded at a density of 1.5×10^5 /well on 6-well plates. Medium was refreshed when 70% confluence was reached (around 20 hours later), followed by the addition of each solvent fractions of *A. balsamea* at varying concentrations. After incubation for 18 hours, supernatant (contains released LDH) was collected on ice and adherent cells (contains cellular LDH) were then lysed by EMEM containing 1% Triton X-100 for 10 min at 37°C, 5% CO₂, followed by centrifugation at $250 \times g$, 4 °C, 10 min. A coupled enzymatic reaction, in which a red formazan product was generated, measured LDH in both medium and lysate buffers at

490nm. The following equation was used to calculate the % cytotoxicity for each fractions of *A. balsamea*:

$$\frac{\text{Released LDH}}{\text{Total LDH (Released LDH + Cellular LDH)}} \times 100\%$$

Results were analyzed to determine the concentration of *A. balsamifera* products yielding LDH release comparable to the negative 0.1% DMSO vehicle control. A common optimal nontoxic maximum concentration of 15µg/mL was determined for all fractions of *A. balsamea* (each dose-response experiment being repeated three times).

2.4 Screening the solvent fractions of *A. balsamea* by flow cytometric analysis of AnnV/PI staining.

When MDCK cells reached 70% subconfluence, medium was then switched to 700mOsm/L hypertonic (EMEM culture medium to which 200 mM sodium chloride was added) or isotonic medium (FBS free) (Horio et al., 2001) for 18 hours, in the presence or not of *A. balsamea* and each of its solvent fractions at the aforementioned common nontoxic maximum concentration of 15µg/mL. Z-VDD-FMK, a pan caspase inhibitor, served as a positive control for our renal protection assay. AnnV-FITC (fluorescein isothiocyanate, BD Bioscience, Mississauga, ON) and PI (Thermo Fischer Scientific) was used to detect apoptosis. Prior to assay, 5 mL polystyrene tubes (BD Bioscience, Mississauga, ON) were labeled and preloaded with 500 µL FBS, before being placed in a laminar flow hood. After the indicated treatment period, supernatant was transferred and collected in 5mL prepared polystyrene tubes. Subsequently, adherent cells were washed once with 1 mL PBS before 250 µL 0.25% trypsin was added and cells were incubated at 37 °C for 3 mins, followed by the harvest of detached cells with another 1mL PBS wash. All samples were subjected to centrifugation at 250g, 4 °C, 5 min, followed by discarding the supernatant and resuspending in 500µL of binding buffer (10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂). Two (2) µL of AnnV-FITC and 1 µL PI solutions were then added into each tube. After incubation with aluminium foil paper coverage to avoid light on ice for 5 min, cells were analyzed using a FACSCanto II flow cytometer (BD, Biosciences, Bedford, MA, USA) and FlowJo software. Positive staining was confirmed by flow cytometer and each experiment was repeated three times. As illustrated in the following Results section, PI⁺ Quadrants Q1 and Q2 respectively suggests necrosis and late

stage apoptosis/secondary necrosis; Q3 Quadrant (AnnV⁺/PI⁻) represents early stage apoptosis; Q4 Quadrant displays viable cells (AnnV⁻/PI⁻).

2.5 Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm standard error of the mean from 3 independent experiments with triplicate measurements for each treatment. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and the Bonferroni test as appropriate in software Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A p-value below 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1 Determination of maximum nontoxic solvent fraction concentration (Cytotoxicity)

MDCK cells were incubated with *A. balsamea* crude extract or its solvent fractions at different concentrations, respectively. After 18 hours' treatment, toxicity was evaluated by lactate dehydrogenase (LDH) release and maximal nontoxic concentrations were then determined as those at which LDH release value was within 5-10% of values obtained with the negative vehicle control (0.1% DMSO). Using this approach, a common concentration of 15 μ g/mL was selected and used to compare the anti-apoptotic potential of *A. balsamea* and its fractions (Table 1).

3.2 *In vitro* screen of renal protective potential of *A. balsamea* and its fractions by flow cytometry

Aiming to identify the anti-apoptotic potential of *A. balsamea* and its most active constituents, *A. balsamea* together with its solvent fractions were tested using AnnV/PI double staining. As shown in Figure 1 using fluorescent based flow cytometry analysis, signals representing substantial necrosis and late stage apoptosis/secondary necrosis (AnnV⁺/PI⁺ Q1 and AnnV⁻/PI⁺ Q2 quadrants) as well as early stage apoptosis (AnnV⁺/PI⁻ Q3 quadrant) were detected in MDCK cells as a result of the 700 mOsm/L hypertonic stress (Figure 1A, upper middle panel). In contrast, such signals were barely existent in control cells bathed in isotonic EMEM group (Figure 1A, upper left panel). We also used Z-VAD-FMK as a positive cytoprotective control, in view of its pan caspase inhibitor property caused by irreversible binding to the catalytic site of caspase proteases (Van Noorden, 2001). Accordingly, Z-VAD-FMK efficiently protected

MDCK cells against hypertonic stress by maintaining high viability as well as low early stage apoptosis (Figure 1A, upper right panel).

3.2.1 Cell viability (AnnV⁻/PI⁻ staining)

In accordance with our previous study, *A. balsamea* crude extract significantly improved cell viability as assessed by the change in AnnV⁻/PI⁻ staining ($22.12\% \pm 0.50$ improvement relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 1B) in the presence of 700 mOsm/L hypertonic stress. Solvent fractions were next tested. As illustrated in Figure 1B, with the exception of the H₂O fraction, the Hex, MeOH and EtOAc fractions afforded variable protective effects against hypertonic stress. Among the four fractions, Hex was the most active fraction, increasing AnnV⁻/PI⁻ staining by $26.98\% \pm 0.61$ relative to hypertonic stress alone ($P < 0.0001$, Figure 1B), even slightly higher than that of *A. balsamea* crude extract. In addition, result obtained with the Hex fraction was statistically similar to that found in the control isotonic EMEM group (hypertonic stress free, change of $26.28\% \pm 0.76$ AnnV⁻/PI⁻ staining relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 1B) and in the Z-VAD-FMK group (change of $30.12\% \pm 0.39$ AnnV⁻/PI⁻ staining relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 1B).

3.2.2 Early stage apoptosis (AnnV⁺/PI⁻ staining)

Analysis of AnnV⁺/PI⁻ staining in Q3 Quadrant (AnnV⁺/PI⁻) indicated considerable early stage apoptosis ($23.40\% \pm 0.78$) was induced in the presence of hypertonic stress compared to isotonic EMEM group ($1.23\% \pm 0.13$, $P < 0.0001$). Hex again stood out from the four fractions for its strongest potential inhibiting early stage apoptosis ($-19.23\% \pm 0.33$ relative to hypertonic stress, Figure 1C). Moreover, Hex fraction yielded results that was almost the same as that of *A. balsamea* ($-19.77\% \pm 0.09$ relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 1C). Z-VAD-FMK at 100 μ M delivered highest protection ($-22.10\% \pm 0.01$ relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 1C) among all the treatment, however, the values among Z-VAD-FMK, isotonic EMEM group, *A. balsamea* and Hex fraction were similar with each other, with no statistically significant difference. On the other hand, H₂O fraction was the only fraction to increase AnnV⁺/PI⁻ signals in the presence hypertonic stress; in fact, it further increased early stage apoptosis ($0.50\% \pm 3.53$ relative to hypertonic stress, Figure 1C)

3.3 Investigating the anti-apoptotic potential of three pure compounds identified from *A. balsamea* Hex fraction

Screening results showed that Hex fraction was the most powerful in maintaining the viability as well as inhibiting the early stage apoptosis in the presence of 700mOsm/L hypertonic stress (Figure 1). AnnV/PI staining was again performed to test these three pure compounds (abietic acid, dehydroabietic acid and squalene) identified from Hex fraction for their respective anti-apoptotic activities. Abietic acid turned out to be the best performing treatment, as assessed by the change in AnnV⁻/PI⁻ staining ($25.48\% \pm 0.81$ relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 2B) as well as the change in AnnV⁺/PI⁻ staining ($-20.20\% \pm 0.32$ relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 2C). Interestingly, the improvement of cell viability by abietic acid was slightly higher than its crude extract *A. balsamea* ($22.12\% \pm 0.50$ relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 2B), and almost equal to that of isotonic EMEM group ($26.28\% \pm 0.76$ relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 2B) and Hex fraction ($26.98\% \pm 0.61$ relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 2B), and slightly lower to that of Z-VAD-FMK ($30.12\% \pm 0.39$ relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 2B). However, dehydroabietic acid barely provided any protection for the viability ($4.25\% \pm 0.49$ relative to hypertonic stress, Figure 2B), moreover, squalene ($-2.12\% \pm 0.21$ relative to hypertonic stress, Figure 2B) seems toxic by acting as agonist with hypertonic stress.

In addition, abietic acid was also notable for its anti-apoptotic potential as indicated by reduction of AnnV⁺/PI⁻ staining ($-20.20\% \pm 0.32$ relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 2C), best among the three pure compounds and even better than crude extract *A. balsamea* ($-19.77\% \pm 0.09$ relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 2C) and Hex fraction ($-19.23\% \pm 0.33$ relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 2C), statistically similar with that of Z-VAD-FMK ($-22.10\% \pm 0.01$ relative to hypertonic stress, $P < 0.0001$, Figure 2C). Apart from the inability to maintain the viability, the apoptotic inhibitory ability of squalene was also weak ($-1.77\% \pm 0.23$ relative to hypertonic stress, Figure 2C).

4. Discussion

When discussing with our Cree partners of Eeyou Istchee (CEI - Eastern James Bay area of Quebec, Canada), they emphasized the fact that their population was suffering disproportionately from DN (Dannenbaum et al., 2008; Shang et al., 2015). They thus encouraged us to look into the renal protection potential of medicinal plants coming from their traditional pharmacopeia. As it is acknowledged that apoptosis plays a key role in developing DN (Habib, 2013; Kumar et al., 2004; Sanchez-Nino et al., 2010), anti-apoptotic therapy could be a novel approach for DN. Our team has recently completed a novel renal protective screening study of 17 identified antidiabetic medicinal plants (Eid, Hoda M. and Haddad, Pierre S., 2014; Harris et al., 2012) in order to respond to our CEI partners' wish (article 2). *A. balsamea* was found to possess the most powerful renal protective and anti-apoptotic potential from among these 17 Cree medicinal plants, exerting its beneficial effects mainly through inhibiting the mitochondrial apoptotic pathway (article 2). The aim of current study was to identify the active phytochemical compounds that could underlie the anti-apoptotic potential of *A. balsamea* crude extract.

To achieve this, we employed a bioassay-guided fractionation approach whereby solvents of varying polarity were used to separate the phytochemical components of *A. balsamea* crude extract. These solvents are Hex, EtOAc, MeOH and H₂O, the polarity increasing from Hex to H₂O. We also selected hypertonic stress as a physiologically relevant condition that is known to cause cell death, notably involving apoptosis (Horio et al., 2001). The osmolality of body fluids is around 280 mOsm/L, which is equal to EMEM medium we used in the study. In preliminary experiments, we challenge MDCK cells with different medium osmolarities challenges (data not illustrated) and found that 700 mOsm/L was the ideal condition to induce substantial apoptosis, which could be used to test the anti-apoptotic potential of the 17 plant species. The results of the current study clearly demonstrated that the hexane fraction of *A. balsamea* crude extract was the one that exhibited the most powerful activity to protect MDCK cells against hypertonic stress induced loss of viability, in general, and enhanced apoptosis, in particular. In another study on the effect of the 17 Cree plants on hepatic enzymes controlling liver cell glucose production, *A. balsamea* was also found to be the most powerful species (Nachar et al., 2013). We subsequently carried out bioassay-guided fractionation and found that the hexane solvent fraction was the most bioactive as in the that study (Nachar et al., 2015). We successfully

identified the three major phytochemical components in this hexane fraction as being abietic acid, dehydroabietic acid and squalene. We therefore tested these three pure compounds in our MDCK renal protective bioassay. As indicated by the results presented above, abietic acid clearly stood out from among these three pure compounds as the best performing treatment. Indeed, it improved MDCK viability and exerted anti-apoptotic activity to the same extent as *A. balsamea* crude extract, its hexane fraction or even vehicle control and Z-VAD-FMK positive control. In contrast, dehydroabietic acid was ineffective at improving MDCK cell viability in the face of hypertonic stress, yet significantly reduced apoptosis, albeit to a lesser extent than abietic acid. Squalene, on the other hand, was not found to exert any significant renal protective activity in our bioassay.

To our knowledge, this is the first report to attribute renal protective and anti-apoptotic biological activity to abietic acid. On the other hand, the concept that cell death, including apoptosis, necrosis and necroptosis, is a trigger for inflammation is very well established (Davidovich et al., 2014). In this context, it is interesting to note that abietic acid was shown to possess anti-inflammatory activity (Fernandez et al., 2001; Takahashi et al., 2003). It can thus be speculated that part of the anti-inflammatory effect of abietic acid could be due, at least in part, to its anti-apoptotic potential, albeit further studies will be necessary to clarify this point.

5. Conclusion

In summary, abietic acid was shown to possess the greatest renal protective and anti-apoptotic potential from among the prominent constituents of the hexane fraction of *A. balsamea* crude extract. Future studies will be needed to elucidate the mechanism of action of abietic acid in the context of renal cell damage. Notwithstanding, our studies suggest that abietic acid may be an interesting compound to standardize *A. balsamea* extracts and traditional preparations that could afford protection against DN. Abietic acid could also provide a template for novel therapies for DN.

6. Acknowledgement

A Team Grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines; CTP-79855) to Pierre S. Haddad funded these studies. Very special

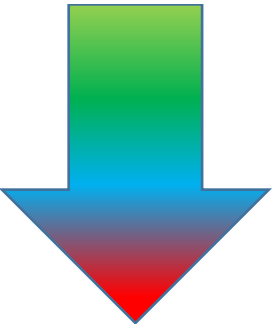
thanks are due to Cree Elders of Eeyou Istchii who kindly agreed to be interviewed. They made this paper possible by allowing us to use, for the purposes of this research, their knowledge related to medicinal plants transmitted to them by their predecessors. Their trust has also enabled a useful exchange between Indigenous knowledge and Western science.

7. Conflict

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

8 Tables

Table 1: List of *A. balsamea*, its fractions and the concentrations of the extracts tested in MDCK cells.

Species	Abbreviations	Plant Part	MDCK cells ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.	<i>A. balsamea</i>	Bark	15
Hexane fraction	Hex	 <p>Non Polar</p>	15
Ethyl acetate fraction	EtOAc		15
Methanol fraction	MeOH		15
Aqueous fraction	H ₂ O		Polar

9. Figure legends

Figure 1. Renal protective potential of *A. balsamea* and its fractions. AnnV/PI labeling was performed 18 hours after plant extract treatment to assess viability and early stage apoptosis. (A) Representative pictures of flow cytometry; (B) Histogram of AnnV⁻/PI⁻; (C) Histogram of AnnV⁺/PI⁻. Results (B and C) were expressed as means \pm SEM for 3 separate experiments, normalized to the 700 mOsm/L hypertonic stress condition. **** (P < 0.0001) denotes other treatments significantly different from vehicle 700 mOsm/L hypertonic stress treatment, one-way ANOVA and Bonferroni test.

Figure 2. Renal protective potential of *A. balsamea*, Hex fraction and identified pure compounds. AnnV/PI labeling was performed 18 hours after plant extract treatment to assess viability and early stage apoptosis. (A) Representative pictures of flow cytometry; (B) Histogram of AnnV⁻/PI⁻; (C) Histogram of AnnV⁺/PI⁻. Results (B and C) were expressed as means \pm SEM for 3 separate experiments, normalized to the 700 mOsm/L hypertonic stress condition. **** (P < 0.0001) denotes other treatments significantly different from vehicle 700 mOsm/L hypertonic stress treatment, one-way ANOVA and Bonferroni test.

10. Figure

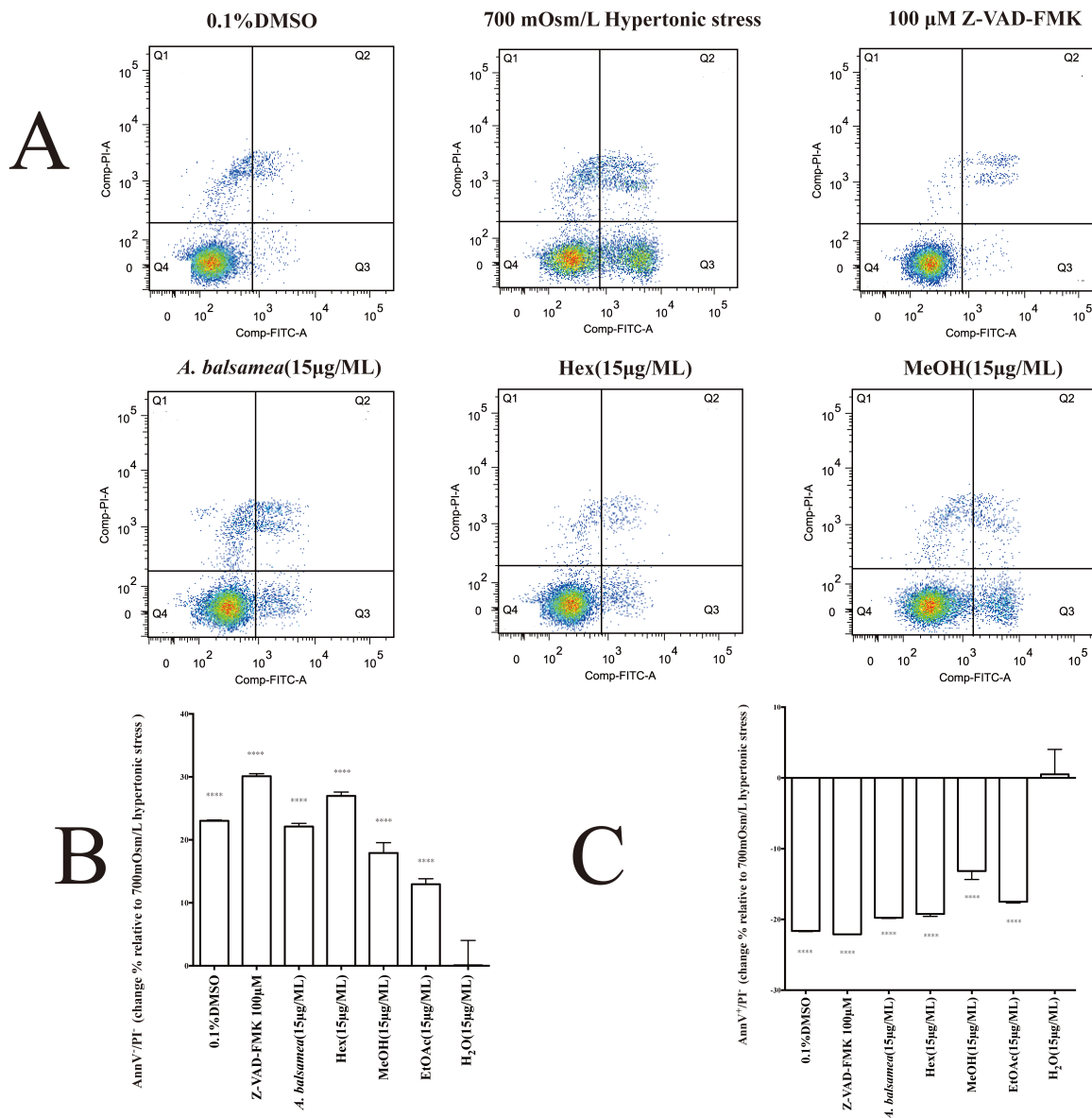


Figure 1: Renal protective potential of *A. balsamea* and its fractions.

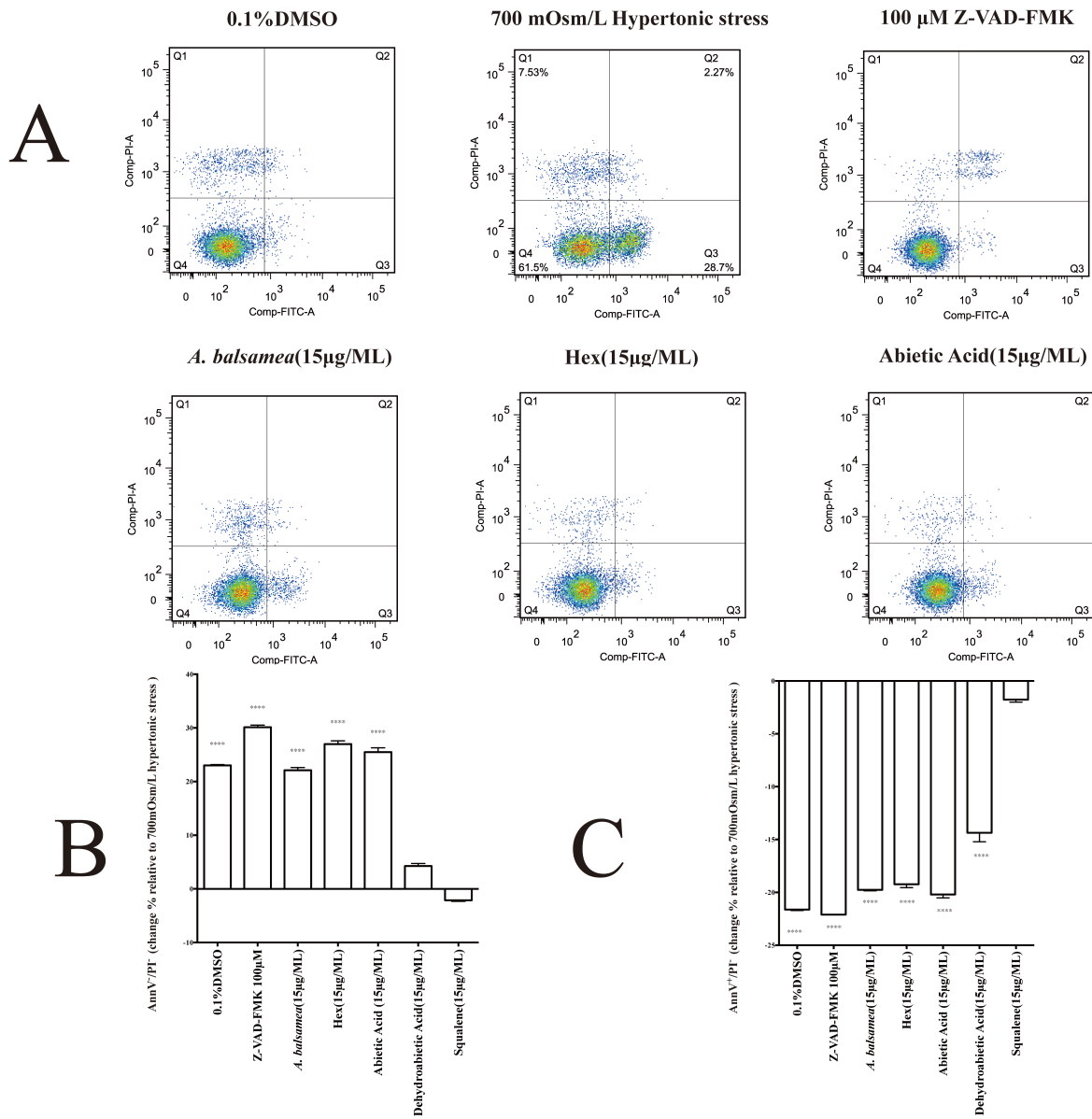


Figure 2: Renal protective potential of *A. balsamea*, Hex fraction and identified pure compounds.

11. Reference

- Adeghate, E., 2004. Molecular and cellular basis of the aetiology and management of diabetic cardiomyopathy: a short review. *Molecular and cellular biochemistry* 261(1-2), 187-191.
- Amos, A.F., McCarty, D.J., Zimmet, P., 1997. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 14 Suppl 5, S1-85.
- Dannenbaum, D., Kuzmina, E., Lejeune, P., Torrie, J., Gangbe, M., 2008. Prevalence of Diabetes and Diabetes-related Complications in First Nations Communities in Northern Quebec (Eeyou Istchee), Canada. *Canadian Journal of Diabetes* 32(1), 46-52.
- Davidovich, P., Kearney, C.J., Martin, S.J., 2014. Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis. *Biological chemistry* 395(10), 1163-1171.
- DCCT, 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *The New England journal of medicine* 329(14), 977-986.
- Eid, H.M., Haddad, P.S., 2014. Mechanisms of Action of Indigenous Antidiabetic Plants from the Boreal Forest of Northeastern Canada.
- Ekoe, J.M., Thouez, J.P., Petitclerc, C., Foggin, P.M., Ghadirian, P., 1990. Epidemiology of obesity in relationship to some chronic medical conditions among Inuit and Cree Indian populations in New Quebec, Canada. *Diabetes Res Clin Pract* 10 Suppl 1, S17-27.
- Fernandez, M.A., Tornos, M.P., Garcia, M.D., de las Heras, B., Villar, A.M., Saenz, M.T., 2001. Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from *Pimenta racemosa* var. *grisea*. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 53(6), 867-872.
- Forbes, J.M., Cooper, M.E., 2013. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93(1), 137-188.
- Garriguet, D., 2008. Obesity and the eating habits of the Aboriginal population. *Health Rep* 19(1), 21-35.
- Gilbertson, D.T., Liu, J., Xue, J.L., Louis, T.A., Solid, C.A., Ebben, J.P., Collins, A.J., 2005. Projecting the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2015. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 16(12), 3736-3741.

Group., U.P.D.S.U., 1998. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). . *Lancet* (London, England) 352(9131), 837-853.

Habib, S.L., 2013. Diabetes and renal tubular cell apoptosis. *World J Diabetes* 4(2), 27-30.

Hanley, A.J., Harris, S.B., Mamakeesick, M., Goodwin, K., Fiddler, E., Hegele, R.A., Spence, J.D., House, A.A., Brown, E., Schoales, B., McLaughlin, J.R., Klein, R., Zinman, B., 2005. Complications of Type 2 Diabetes Among Aboriginal Canadians: prevalence and associated risk factors. *Diabetes care* 28(8), 2054-2057.

Harris, C.S., Asim, M., Saleem, A., Haddad, P.S., Arnason, J.T., Bennett, S.A.L., 2012.

Hegele, R.A., Cao, H., Harris, S.B., Hanley, A.J., Zinman, B., 1999. The hepatic nuclear factor-1alpha G319S variant is associated with early-onset type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree. *J Clin Endocrinol Metab* 84(3), 1077-1082.

Horio, M., Ito, A., Matsuoka, Y., Moriyama, T., Orita, Y., Takenaka, M., Imai, E., 2001. Apoptosis induced by hypertonicity in Madin Darley canine kidney cells: protective effect of betaine. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 16(3), 483-490.

King, H., Aubert, R.E., Herman, W.H., 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes care* 21(9), 1414-1431.

King, H., Rewers, M., 1993. Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. WHO Ad Hoc Diabetes Reporting Group. *Diabetes care* 16(1), 157-177.

Kowluru, R.A., 2005. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. *Antioxidants & redox signaling* 7(11-12), 1581-1587.

Kumar, D., Robertson, S., Burns, K.D., 2004. Evidence of apoptosis in human diabetic kidney. *Molecular and cellular biochemistry* 259(1-2), 67-70.

Kuzmina, E., Lejeune, P., Dannenbaum, D., Torrie, J.E., 2010. Cree Diabetes Information System (CDIS) 2009 Annual Report. Public Health Report Series 3 on Diabetes
Cree Board of Health and Social Services of James Bay.

Leahy, J.L., 2005. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Archives of medical research* 36(3), 197-209.

Lin, Y., Sun, Z., 2010. Current views on type 2 diabetes. *The Journal of endocrinology* 204(1), 1-11.

Matsushita, K., van der Velde, M., Astor, B.C., Woodward, M., Levey, A.S., de Jong, P.E., Coresh, J., Gansevoort, R.T., 2010. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet (London, England)* 375(9731), 2073-2081.

Mogensen, C.E., Christensen, C.K., Vittinghus, E., 1983. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 32 Suppl 2, 64-78.

Nachar, A., Saleem, A., Arnason, J.T., Haddad, P.S., 2015. Regulation of liver cell glucose homeostasis by dehydroabietic acid, abietic acid and squalene isolated from balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.) a plant of the Eastern James Bay Cree traditional pharmacopeia. *Phytochemistry* 117, 373-379.

Nachar, A., Vallerand, D., Musallam, L., Lavoie, L., Badawi, A., Arnason, J., Haddad, P.S., 2013. The action of antidiabetic plants of the canadian james bay cree traditional pharmacopeia on key enzymes of hepatic glucose homeostasis. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013, 189819.

Neel, J.V., 1962. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 14, 353-362.

Ozougwu, J.C., Obimba, K.C., Belonwu, C.D., Unakalamba, C.B., 2013. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology* 4(4), 46-57.

Sanchez-Nino, M.D., Sanz, A.B., Lorz, C., Gnirke, A., Rastaldi, M.P., Nair, V., Egido, J., Ruiz-Ortega, M., Kretzler, M., Ortiz, A., 2010. BASP1 promotes apoptosis in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21(4), 610-621.

Shang, N., Saleem, A., Musallam, L., Walshe-Roussel, B., Badawi, A., Cuerrier, A., Arnason, J.T., Haddad, P.S., 2015. Novel Approach to Identify Potential Bioactive Plant Metabolites: Pharmacological and Metabolomics Analyses of Ethanol and Hot Water Extracts of Several Canadian Medicinal Plants of the Cree of Eeyou Istchee. *PloS one* 10(8), e0135721.

Takahashi, N., Kawada, T., Goto, T., Kim, C.S., Taimatsu, A., Egawa, K., Yamamoto, T., Jisaka, M., Nishimura, K., Yokota, K., Yu, R., Fushiki, T., 2003. Abietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) in RAW264.7 macrophages and 3T3-L1

adipocytes to regulate gene expression involved in inflammation and lipid metabolism. *FEBS letters* 550(1-3), 190-194.

Tan, K.T., Cheah, J.S., 1990. Pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Ann Acad Med Singapore* 19(4), 506-511.

Turner R, H.R., Stratton I, Cull C, Frighi V, Manley S, Matthews D, Neil A, McElroy H, Kohner E, Fox C, Hadden D, Wright D, and Turner R.C., 1998. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ (Clinical research ed.)* 317(7160), 703-713.

Van Noorden, C.J., 2001. The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem* 103(3), 241-251.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H., 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care* 27(5), 1047-1053.

Young, T.K., Reading, J., Elias, B., O'Neil, J.D., 2000. Type 2 diabetes mellitus in Canada's first nations: status of an epidemic in progress. *Cmaj* 163(5), 561-566.

Zimmet, P., Alberti, K.G., Shaw, J., 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414(6865), 782-787.

Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives⁹

L'objectif principal de mon projet doctoral était d'étudier le potentiel de protection rénale de 17 espèces de plantes de la pharmacopée traditionnelle des Cris de la Baie James Est du Canada, qui ont été connues pour posséder la capacité antidiabétique. Ce projet s'inscrit dans le contexte d'un programme de recherche d'équipe IRSC avec les communautés cries fondée en 2003 par le Dr Pierre Haddad. Lors des études précédentes, l'équipe avait effectué une étude *in vivo* à l'aide d'un modèle d'obésité induite par l'alimentation (OIA) chez des souris afin d'évaluer le potentiel antidiabétique du thé du Labrador, *R. groenlandicum*. Comme les reins ainsi que le plasma et l'urine avaient été prélevés pour cette étude, la première partie de mon projet doctoral a été d'évaluer l'effet de cette plante sur l'intégrité rénale.

Comme mentionné précédemment, *R. groenlandicum* est l'une des plantes antidiabétiques les plus prometteuses utilisées traditionnellement par les Cris de la Baie James orientale (Canada) avec plusieurs actions observées dans des tests biologiques *in vitro* (Martineau et al., 2010; Nachar et al., 2013; Spoor et al., 2006), ainsi que *in vivo* (Ouchfoun et al., 2016). Dans les présentes études, nous avons cherché à déterminer si *R. groenlandicum* pourrait être bénéfique contre la ND. Comme fait précédemment (Harbilas et al., 2012a; Harbilas et al., 2012b, 2013), nous avons utilisé des souris OIA pour étudier l'effet de *R. groenlandicum* dans un état diabétique léger (Ouchfoun et al., 2016). De telles études ont montré en effet que ces 16 semaines d'alimentation DG résultent en un taux de glucose sanguin significativement élevé par rapport aux contrôles alimentés par une diète standard. Dans ces conditions, le traitement de *R. groenlandicum* réduit significativement la glycémie de base ainsi que la réponse à un OGTT (Ouchfoun et al., 2016).

Puisqu'une glycémie élevée est la principale cause des manifestations pathologiques de la ND, nous avons mis à l'avant l'hypothèse que les souris nourries DG de cette étude précédente souffraient de ND. Une caractéristique commune de ND est la micro-albuminurie dans laquelle le rein anormal émet plus d'albumine sérique que la normale dans l'urine (Parving et al., 2015). Nous avons, par conséquent, d'abord examiné le niveau urinaire d'albumine et les souris nourries à l'DG montraient des signes de micro-albuminurie. Malgré un tel dysfonctionnement

⁹ Cette page a été traduite à partir d'extraits des articles 1, 2 et 3 de la thèse en cours.

glomérulaire, l'atrophie tubulaire et la fibrose tubulo-interstitielle sont associées à la diminution progressive de la fonction rénale dans les étapes ultérieures de la ND ¹⁰ (Nangaku, 2004). En effet, l'atrophie tubulaire et une fibrose tubulo-interstitielle ont été révélées comme étant de meilleurs prédicteurs : de progression au stade tardif de la maladie rénale que la pathologie glomérulaire (Beyenbach, 2004; Drummond and Mauer, 2002; Gilbert and Cooper, 1999; Marcussen, 2000). Bien que les mécanismes sous-jacents à l'atrophie tubulaire soient incomplètement élucidés, les résultats récents indiquent que l'apoptose rénale proximale des cellules du tubule peut être un mécanisme initial pour l'atrophie tubulaire dans le DT2 (Lau et al., 2012). Ensuite, nous avons donc utilisé l'histologie rénale pour évaluer l'intégrité du rein. Des animaux nourris à l'DG ont montré des signes d'hypertrophie des deux zones tubulaires glomérulaires et proximales tels qu'évaluées avec coloration de l'Acide périodique-Schiff (APS). Le dépôt de collagène, tel qu'évalué avec coloration trichrome de Masson, a été significativement augmenté chez les animaux DG, indiquant des signes de fibrose interstitielle. Nous avons également observé un grand nombre de vacuoles qui semblaient être de nature lipidique, ce qui suggère la présence de stéatose. Enfin, nous avons utilisé l'immunohistochimie pour quantifier Bmf, une protéine pro-apoptotique. En effet, il a été clairement démontré que Bmf joue un rôle important dans la médiation de l'apoptose cellulaire du tubule proximal du rein de la souris diabétique *in vivo* (Brezniceanu et al., 2008; Lau et al., 2012). Comme on le voit chez les souris db/db utilisées dans ces études antérieures, les animaux nourris avec DG ont également démontré une augmentation significative de l'expression de Bmf. Tous ces éléments ont confirmé que les animaux nourris avec DG présentaient des signes de lésions rénales, mais pas de ND de stade avancé. Ceci fait du sens dans le contexte du diabète léger associé à ce modèle.

En résumé, notre étude démontre qu'une prise prolongée de DG, qui est accompagnée par un contrôle glycémique perturbé (notamment l'augmentation de la RI), peut conduire à des lésions rénales mesurables (Boini et al., 2010; Lee et al., 2012; Zhang et al., 2012). Le traitement avec le *R. groenlandicum*, qui a amélioré la sensibilité à l'insuline dans ce modèle d'OIA (Ouchfoun et al., 2016), améliore également les paramètres d'intégrité du rein. Les mécanismes sous-jacents de protection rénale de *R. groenlandicum* semblent impliquer une amélioration plus

¹⁰ Cette page a été traduite à partir d'extraits des articles 1, 2 et 3 de la thèse en cours.

faible dans la micro-albuminurie et la morphologie glomérulaire, une ¹¹réduction significative de la fibrose rénale et de la stéatose et une inhibition importante de l'expression de Bmf. Nos observations soulèvent la possibilité que le thé du Labrador peut posséder le potentiel pour inverser les manifestations pathologiques de la ND, en particulier l'atrophie tubulaire et la fibrose interstitielle. Les présentes études prêtent plus de crédibilité au fait que le thé du Labrador est une plante antidiabétique prometteuse qui devrait, par conséquent, être testé cliniquement pour être utilisé comme un traitement complémentaire et une alternative culturellement pertinente pour les diabétiques Cris.

Le but de la seconde étude était de commencer à évaluer la capacité néphroprotectrice de 17 plantes médicinales des Cris qui ont été identifiées comme ayant un potentiel antidiabétique significatif dans plusieurs tests biologiques relatifs à l'homéostasie du glucose et des lipides, ainsi que dans des modèles animaux de l'obésité et du diabète (Eid and Haddad, 2014; Harris et al., 2012). En effet, nos partenaires de la CEI ont mis en évidence le fait que leur population souffrait de façon disproportionnée de la ND (Dannenbaum et al., 2008; Shang et al., 2015) et voulaient que l'on se penche sur la protection rénale découlant de leurs plantes médicinales traditionnelles.

Nous avons donc choisi la lignée cellulaire MDCK, qui est un modèle cellulaire tubulaire rénal très bien caractérisé qui peut servir à évaluer la cyto-protection contre diverses agressions, y compris le stress hypertonique, l'albumine, le cadmium, et ainsi de suite (Erkan et al., 2005; Hizoh and Haller, 2002; Horio et al., 2001; Terada et al., 2001; Yoshida et al., 2002; Zhang et al., 1995). Nous avons également choisi le stress hypertonique comme condition physiologiquement pertinente dont on sait qu'il provoque la mort cellulaire, impliquant notamment l'apoptose (Horio et al., 2001). L'osmolalité des fluides corporels est d'environ 280 mOsm/L, ce qui est égal au milieu EMEM que nous avons utilisé dans l'étude. Dans des études préliminaires, nous avons soumis les cellules MDCK à différents défis d'osmolalité (données non illustrées) et trouvé que 700 mOsm/L a été la condition idéale pour induire l'apoptose substantielle, ce qui pourrait être utilisé pour tester le potentiel anti-apoptotique des 17 espèces végétales. Cela était pertinent dans le contexte de la ND qui implique également l'apoptose des cellules rénales (Habib, 2013; Kumar et al., 2004; Sanchez-Nino et al., 2010). En effet, nos

¹¹ Cette page a été traduite à partir d'extraits des articles 1, 2 et 3 de la thèse en cours.

résultats avec double coloration AnnV/PI et une ¹²cytométrie en flux démontrent clairement qu'un stress hypertonique de 700 mOsm/L résulte en des augmentations significatives en mort cellulaire (PI⁺ quadrants Q1 et Q2; représentant respectivement la nécrose et l'apoptose tardive). Le stress hypertonique a également augmenté de façon significative la proportion de cellules avec coloration AnnV⁺/PI⁻, indiquant des dommages précoces aux cellules apoptotiques.

Aussi et c'est important, nous avons choisi l'inhibiteur pan caspase Z-VAD-FMK comme un contrôle positif cytoprotecteur introduit dans le milieu hypertonique. Il a été très efficace pour ramener le mode de coloration de AnnV /PI à celui observé chez les contrôles négatifs traités par un véhicule (pas de stress hypertonique). Ainsi, nos cellules MDCK fournissent un modèle adéquat pour dépister l'activité néphroprotectrice potentielle des plantes médicinales antidiabétiques des Cris.

Dans cette étude de criblage *in vitro*, *A. balsamea* se démarque clairement comme l'une des plus puissantes plantes de protection rénale chez les Cris qui présentait des activités anti-apoptotiques importantes, en particulier au niveau des caspases 3 et 9. Nos travaux antérieurs avec des extraits d'*A. balsamea* ont démontré qu'ils peuvent considérablement améliorer l'absorption de glucose basale et stimulée par l'insuline chez des cellules musculaires squelettiques et chez des adipocytes en culture (Spor et al., 2006). La plante a également été la plus puissante des espèces des Cris pour atténuer les mécanismes de production de glucose de cellules hépatiques *in vitro* par des mécanismes dépendants de l'insuline et indépendants de l'insuline (Eid and Haddad, 2014). Dans les cellules du muscle squelettique, *A. balsamea* exerce son action par l'intermédiaire d'un mécanisme similaire à celui de la Metformine, impliquant l'activation de l'AMPK secondaire à un stress métabolique induit par la perturbation de la transduction de l'énergie mitochondriale (épuisement de l'énergie), bien qu'avec des effets légers sur le pH cellulaire ou les niveaux d'ATP (Martineau et al., 2010). Il est intéressant de spéculer que les effets d'*A. balsamea* sur les mitochondries peuvent également entraîner le déclenchement d'évènements anti-apoptotiques, mais d'autres études seront nécessaires pour répondre à ce point.

¹² Cette page a été traduite à partir d'extraits des articles 1, 2 et 3 de la thèse en cours.

En résumé, cette étude démontre qu'*A. balsamea* et *G. hispidula* présentent le plus grand ¹³potentiel de toutes les plantes antidiabétiques Cris testées pour protéger les cellules rénales contre les dommages induits par le stress hypertonique. *A. balsamea* semble le faire en supprimant l'apoptose, très probablement par des actions sur la voie de signalisation de la caspase mitochondriale, tandis que *G. hispidula* peut exercer son potentiel de protection rénale par d'autres voies. Ces résultats peuvent avoir une importance clinique pour l'atténuation de la ND qui affecte les communautés CEI. En effet, les espèces de plantes médicinales des Cris peuvent contenir des composants phytochimiques qui peuvent fournir de nouvelles avenues pharmacologiques pour améliorer le traitement et la gestion de la ND. Plus important encore, les préparations de plantes traditionnelles chez les Cris sont de prometteuses thérapies complémentaires qui sont culturellement adaptées et respectueuses. À ce titre, des futures études cliniques devraient être encouragées.

L'objectif de la troisième et dernière étude de la présente thèse était d'identifier les composés phytochimiques actifs qui pourraient caractériser le potentiel anti-apoptotique de l'extrait brut d'*A. balsamea*. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche de fractionnement guidé par un test biologique dans lequel des solvants de polarité différente ont été utilisés pour séparer les composants phytochimiques de l'extrait brut d'*A. balsamea*. Ces solvants sont Hex, EtOAc, MeOH et H₂O, où la polarité augmente de Hex à H₂O. Nous avons également choisi le stress hypertonique comme condition physiologiquement pertinente qui est connue pour provoquer la mort cellulaire, impliquant notamment l'apoptose (Horio et al., 2001). Les résultats de cette étude démontrent clairement que la fraction d'hexane d'extrait brut d'*A. balsamea* a été celle qui a présenté l'activité la plus puissante pour protéger les cellules MDCK contre la perte de viabilité induite par le stress hypertonique, en général, et l'apoptose accrue, en particulier. Dans une autre étude sur l'effet des 17 plantes Cris sur les enzymes hépatiques qui contrôlent la production de glucose hépatique cellulaire, *A. balsamea* a également été avancée comme étant l'espèce la plus puissante (Nachar et al., 2013). Nous avons ensuite procédé à un fractionnement guidé par des tests biologiques et nous avons constaté que la fraction de solvant d'hexane a été la plus bioactive comme dans les études actuelles (Nachar et al., 2015). Nous avons donc précédemment identifié avec succès les trois principales composantes phytochimiques dans

¹³ Cette page a été traduite à partir d'extraits des articles 1, 2 et 3 de la thèse en cours.

cette fraction d'hexane comme étant l'acide abiétique, l'acide ¹⁴déhydroabiétique et le squalène. Dans la présente étude, nous avons ainsi testé ces trois composés purs dans notre test biologique de protection rénale MDCK. Comme indiqué par les résultats présentés ci-dessus, l'acide abiétique se distinguait clairement parmi ces trois composés purs comme le traitement performant le meilleur. En effet, il a amélioré la viabilité de MDCK et exercé une activité anti-apoptique dans la même mesure que l'extrait brut d'*A. balsamea*, sa fraction d'hexane ou même le contrôle véhicule et le contrôle positif Z-VAD-FMK. En revanche, l'acide déhydroabiétique était inefficace pour améliorer la viabilité des cellules MDCK face au stress hypertonique, mais l'apoptose était réduite de manière significative, quoique dans une moindre mesure que par l'acide abiétique. Le squalène, d'autre part, n'a pas fait preuve d'exercer une activité de protection rénale importante dans notre test biologique.

À notre connaissance, ce rapport est le premier à attribuer une activité biologique protectrice et anti-apoptique rénale à l'acide abiétique. D'autre part, le concept que la mort cellulaire, y compris l'apoptose, la nécrose et la nécroptose, est un déclencheur de l'inflammation est très bien établi (Davidovich et al., 2014). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que l'acide abiétique a montré de posséder une activité anti-inflammatoire (Fernandez et al., 2001; Takahashi et al., 2003). On peut donc spéculer qu'une partie de l'effet anti-inflammatoire de l'acide abiétique pourrait être due, au moins en partie, à son potentiel anti-apoptotique, bien que d'autres études soient nécessaires pour clarifier ce point.

Lors des échanges avec nos partenaires CEI, ils ont insisté sur le fait que leur population souffrait de manière disproportionnée de la ND (Dannenbaum et al., 2008; Shang et al., 2015). Ils nous ont donc encouragés à nous pencher sur le potentiel de protection rénale des plantes médicinales provenant de leur pharmacopée traditionnelle. Comme il est reconnu que l'apoptose joue un rôle clé dans le développement de la ND (Habib, 2013; Kumar et al., 2004; Sanchez-Nino et al., 2010), la thérapie anti-apoptique pourrait être une nouvelle approche pour la ND. Afin de répondre au souhait de nos partenaires de la CEI, la présente thèse présente une nouvelle étude de ciblage de protection rénale (Li et al., 2016) sur les 17 plantes médicinales précédemment identifiées comme antidiabétiques (Eid and Haddad, 2014; Harris et al., 2012).

¹⁴ Cette page a été traduite à partir d'extraits des articles 1, 2 et 3 de la thèse en cours.

A. balsamea a montré qu'elle possède le potentiel de ¹⁵protection et anti-apoptotique rénale le plus puissant parmi ces 17 plantes médicinales des Cris, en exerçant ses effets bénéfiques principalement par l'inhibition de la voie de l'apoptose mitochondriale. De plus, parmi les principaux composants phytochimiques de la fraction d'hexane de l'extrait brut du sapin baumier, l'acide abiétique a montré de posséder le plus grand potentiel de protection et anti-apoptotique. Des études ultérieures seront nécessaires pour élucider le mécanisme d'action de l'acide abiétique, dans le contexte de lésions aux cellules rénales. Nonobstant, nos études suggèrent que l'acide abiétique peut être un composé intéressant pour standardiser des extraits d'*A. balsamea* et des préparations traditionnelles qui pourraient offrir une protection contre la ND. L'acide abiétique pourrait également servir de modèle pour de nouvelles thérapies pour la ND.

En résumé, au cours des cinq dernières années passées dans le laboratoire du Dr Pierre Haddad, j'ai identifié avec succès deux agents prometteurs qui possèdent un potentiel bénéfique contre ND. L'un est *R. groenlandicum*. Il aide à atténuer les dommages engendrés suite à l'hyperglycémie causée par une longue période de consommation de diète DG. *R. groenlandicum* exerce principalement son rôle protecteur en réduisant la microalbuminurie, la fibrose interstitielle, la tolérance au glucose, la stéatose et l'expression de Bmf. Cependant, les travaux futurs sont encore nécessaires pour identifier le ou les composés purs le plus actif de l'espèce végétale brute de *R. groenlandicum*. Ceci aiderait à établir un dosage normalisé ainsi que les mécanismes d'action, ce qui faciliterait la préparation d'un essai clinique. Un autre réactif prometteur est l'acide abiétique, un composé pur qui a montré un potentiel néphroprotecteur chez le modèle MDCK *in vitro*. Plus, de travail détaillé est nécessaire à l'avenir, comme une enquête plus approfondie du mécanisme ainsi que la confirmation de son effet sur l'organisme entier grâce à l'étude des animaux *in vivo*. Nous croyons que grâce à l'accomplissement des travaux futurs, l'acide abiétique, ainsi que certains composés dérivés de *R. groenlandicum*, faciliteront l'élaboration des essais cliniques. Ces essais cliniques permettront de faire la lumière sur le traitement alternatif de ND par des plantes de la pharmacopée traditionnelle crie. Ceci pourra, bénéficier non seulement la communauté crie, mais aussi l'ensemble de la population souffrant de ND.

¹⁵ Cette page a été traduite à partir d'extraits des articles 1, 2 et 3 de la thèse en cours.

Chapitre 6: Bibliographie

- Adeghate, E., 2004. Molecular and cellular basis of the aetiology and management of diabetic cardiomyopathy: a short review. *Mol. Cell. Biochem.* 261(1-2), 187-191.
- Adepoiyi, T., Weigl, B., Greb, H., Neogi, T., McGuire, H., 2013. New screening technologies for type 2 diabetes mellitus appropriate for use in tuberculosis patients. *Public Health Action* 3(Suppl 1), S10-17.
- Adler, A.I., Stratton, I.M., Neil, H.A., Yudkin, J.S., Matthews, D.R., Cull, C.A., Wright, A.D., Turner, R.C., Holman, R.R., 2000. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ (Clinical research ed.)* 321(7258), 412-419.
- Al Homsy MF, L.M., 1992. An Update on the pathogenesis of Diabetes Mellitus, Department of Pathology and Medical Microbiology (Immunology Unit) Faculty of Medicine and Health Sciences, UAE University, Al Ain, United Arab Emirates.
- Al-Goblan, A.S., Al-Alfi, M.A., Khan, M.Z., 2014. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes* 7, 587-591.
- Al-Shabrawey, M., Zhang, W., McDonald, D., 2015. Diabetic retinopathy: mechanism, diagnosis, prevention, and treatment. *Biomed Res Int* 2015, 854593.
- Alfadhli, E.M., 2015. Gestational diabetes mellitus. *Saudi Med J* 36(4), 399-406.
- Allen, D.A., Harwood, S., Varaganam, M., Raftery, M.J., Yaqoob, M.M., 2003. High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17(8), 908-910.
- American Diabetes, A., 2004. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 27 Suppl 1, S5-S10.
- American Diabetes, A., 2009. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 32 Suppl 1(Suppl 1), S62-67.
- American Diabetes, A., 2010. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 33 Suppl 1(Suppl 1), S62-S69.

American Diabetes, A., 2012. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 35 Suppl 1, S64-71.

American Diabetes, A., 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 Suppl 1, S81-90.

Amos, A.F., McCarty, D.J., Zimmet, P., 1997. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 14 Suppl 5, S1-85.

Angelov, A., Putyrski, M., Liebl, W., 2006. Molecular and Biochemical Characterization of α -Glucosidase and α -Mannosidase and Their Clustered Genes from the Thermoacidophilic Archaeon *Picrophilus torridus*. *J. Bacteriol.* 188(20), 7123-7131.

Aquilante, C.L., 2010. Sulfonylurea pharmacogenomics in Type 2 diabetes: the influence of drug target and diabetes risk polymorphisms. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 8(3), 359-372.

Baggio, L.L., Drucker, D.J., 2007. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132(6), 2131-2157.

Bailey, C.J., 2008. Metformin: effects on micro and macrovascular complications in type 2 diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther* 22(3), 215-224.

Bansal, V., Kalita, J., Misra, U.K., 2006. Diabetic neuropathy. *Postgrad. Med. J.* 82(964), 95-100.

Barbour, L.A., McCurdy, C.E., Hernandez, T.L., Kirwan, J.P., Catalano, P.M., Friedman, J.E., 2007. Cellular Mechanisms for Insulin Resistance in Normal Pregnancy and Gestational Diabetes. *Diabetes Care* 30(Supplement 2), S112-S119.

Basit, A., Riaz, M., Fawwad, A., 2012. Glimepiride: evidence-based facts, trends, and observations (GIFTS). [corrected]. *Vasc Health Risk Manag* 8, 463-472.

Baum, J.D., Ounsted, M., Smith, M.A., 1975. Letter: Weight gain in infancy and subsequent development of diabetes mellitus in childhood. *Lancet* 2(7940), 866.

Baynest, H.W., 2015. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Baynes J Diabetes Metab* 6(5).

Bevier, W.C., Jovanovic-Peterson, L., Peterson, C.M., 1995. Pancreatic disorders of pregnancy. Diagnosis, management, and outcome of gestational diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 24(1), 103-138.

Beyenbach, K.W., 2004. Kidneys sans glomeruli. *American journal of physiology. Renal physiology* 286(5), F811-827.

Blickle, J.F., 2006. Meglitinide analogues: a review of clinical data focused on recent trials. *Diabetes Metab* 32(2), 113-120.

Boini, K.M., Zhang, C., Xia, M., Poklis, J.L., Li, P.L., 2010. Role of sphingolipid mediator ceramide in obesity and renal injury in mice fed a high-fat diet. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 334(3), 839-846.

Brezniceanu, M.L., Liu, F., Wei, C.C., Chenier, I., Godin, N., Zhang, S.L., Filep, J.G., Ingelfinger, J.R., Chan, J.S., 2008. Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. *Diabetes* 57(2), 451-459.

Burant, C.F., Sreenan, S., Hirano, K., Tai, T.A., Lohmiller, J., Lukens, J., Davidson, N.O., Ross, S., Graves, R.A., 1997. Troglitazone action is independent of adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 100(11), 2900-2908.

Callaghan, B.C., Cheng, H.T., Stables, C.L., Smith, A.L., Feldman, E.L., 2012. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurol* 11(6), 521-534.

Carino, G.P., Mathiowitz, E., 1999. Oral insulin delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 35(2-3), 249-257.

Cariou, B., Charbonnel, B., Staels, B., 2012. Thiazolidinediones and PPARgamma agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol. Metab.* 23(5), 205-215.

Carpenter, M.W., Coustan, D.R., 1982. Criteria for screening tests for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 144(7), 768-773.

Cefalu, W.T., Riddle, M.C., 2015. SGLT2 Inhibitors: The Latest “New Kids on the Block”! *Diabetes Care* 38(3), 352-354.

Chao, L., Marcus-Samuels, B., Mason, M.M., Moitra, J., Vinson, C., Arioglu, E., Gavrilova, O., Reitman, M.L., 2000. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* 106(10), 1221-1228.

Cheung, N., Wong, I.Y., Wong, T.Y., 2014. Ocular Anti-VEGF Therapy for Diabetic Retinopathy: Overview of Clinical Efficacy and Evolving Applications. *Diabetes Care* 37(4), 900-905.

Chiasson, J.L., Josse, R.G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., 2003. Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. *Jama* 290(4), 486-494.

Ciaraldi, T.P., Gilmore, A., Olefsky, J.M., Goldberg, M., Heidenreich, K.A., 1990. In vitro studies on the action of CS-045, a new antidiabetic agent. *Metabolism* 39(10), 1056-1062.

Collier, C.A., Bruce, C.R., Smith, A.C., Lopaschuk, G., Dyck, D.J., 2006. Metformin counters the insulin-induced suppression of fatty acid oxidation and stimulation of triacylglycerol storage in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(1), E182-189.

Cornel, S., Adriana, I.D., Mihaela, T.C., Speranta, S., Algerino, D.S., Mehdi, B., Jalaladin, H.-R., 2015. Anti-vascular endothelial growth factor indications in ocular disease. *Rom J Ophthalmol* 59(4), 235-242.

Costantino, H.R., Brown, S.H., Kelly, R.M., 1990. Purification and characterization of an alpha-glucosidase from a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature optimum of 105 to 115 degrees C. *J. Bacteriol.* 172(7), 3654-3660.

Coucha, M., Elshaer, S.L., Eldahshan, W.S., Mysona, B.A., El-Remessy, A.B., 2015. Molecular mechanisms of diabetic retinopathy: potential therapeutic targets. *Middle East Afr J Ophthalmol* 22(2), 135-144.

Cox, M.E., Edelman, D., 2009. Tests for Screening and Diagnosis of Type 2 Diabetes. *Clinical Diabetes* 27(4), 132-138.

Dannenbaum, D., Kuzmina, E., Lejeune, P., Torrie, J., Gangbe, M., 2008. Prevalence of Diabetes and Diabetes-related Complications in First Nations Communities in Northern Quebec (Eeyou Istchee), Canada. *Canadian Journal of Diabetes* 32(1), 46-52.

Davidovich, P., Kearney, C.J., Martin, S.J., 2014. Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis. *Biological chemistry* 395(10), 1163-1171.

DCCT, 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *The New England journal of medicine* 329(14), 977-986.

de Andrade, P.B.M., Rubi, B., Frigerio, F., van den Ouweland, J.M.W., Maassen, J.A., Maechler, P., 2006. Diabetes-associated mitochondrial DNA mutation A3243G impairs cellular metabolic pathways necessary for beta cell function. *Diabetologia* 49(8), 1816-1826.

- Deacon, C.F., Ahrén, B., 2011. Physiology of incretins in health and disease. *Rev Diabet Stud* 8(3), 293-306.
- DeFronzo, R.A., 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 88(4), 787-835, ix.
- Derosa, G., Maffioli, P., 2012. α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Arch Med Sci* 8(5), 899-906.
- Deshpande, A.D., Harris-Hayes, M., Schootman, M., 2008. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther* 88(11), 1254-1264.
- Devaraj, S., Rosenson, R.S., Jialal, I., 2004. Metabolic syndrome: an appraisal of the pro-inflammatory and procoagulant status. *Endocrinol Metab Clin North Am* 33(2), 431-453, table of contents.
- Dokken, B.B., 2008. The Pathophysiology of Cardiovascular Disease and Diabetes: Beyond Blood Pressure and Lipids. *Diabetes Spectrum* 21(3), 160-165.
- Donnelly, D., 2012. The structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor and its ligands. *Br. J. Pharmacol.* 166(1), 27-41.
- Drummond, K., Mauer, M., 2002. The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes. *Diabetes* 51(5), 1580-1587.
- Edwards, J.L., Vincent, A.M., Cheng, H.T., Feldman, E.L., 2008. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacol. Ther.* 120(1), 1-34.
- Eid, H.M., Haddad, P.S., 2014. Mechanisms of Action of Indigenous Antidiabetic Plants from the Boreal Forest of Northeastern Canada. *Advances in Endocrinology* 2014, 11.
- Eid, H.M., Nachar, A., Thong, F., Sweeney, G., Haddad, P.S., 2015. The molecular basis of the antidiabetic action of quercetin in cultured skeletal muscle cells and hepatocytes. *Pharmacogn Mag* 11(41), 74-81.
- Ekoe, J.M., Thouez, J.P., Petitclerc, C., Foggin, P.M., Ghadirian, P., 1990. Epidemiology of obesity in relationship to some chronic medical conditions among Inuit and Cree Indian populations in New Quebec, Canada. *Diabetes research and clinical practice* 10 Suppl 1, S17-27.
- Engelgau, M.M., Narayan, K.M., Herman, W.H., 2000. Screening for type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23(10), 1563-1580.

Erkan, E., Devarajan, P., Schwartz, G.J., 2005. Apoptotic response to albumin overload: proximal vs. distal/collecting tubule cells. *Am J Nephrol* 25(2), 121-131.

Feingold, K.R., 2000. Oral and Injectable (Non-insulin) Pharmacological Agents for Type 2 Diabetes, in: Feingold, K.R., Anawalt, B., Boyce, A., Chrousos, G., Dungan, K., Grossman, A., Hershman, J.M., Kaltsas, G., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., McLachlan, R., Morley, J.E., New, M., Perreault, L., Purnell, J., Rebar, R., Singer, F., Trencce, D.L., Vinik, A., Wilson, D.P. (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).

Fernandez, M.A., Tornos, M.P., Garcia, M.D., de las Heras, B., Villar, A.M., Saenz, M.T., 2001. Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from *Pimenta racemosa* var. *grisea*. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 53(6), 867-872.

Ferner, R.E., 1992. 8 Drug-induced diabetes. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 6(4), 849-866.

Fineberg, D., Jandeleit-Dahm, K.A., Cooper, M.E., 2013. Diabetic nephropathy: diagnosis and treatment. *Nature reviews. Endocrinology* 9(12), 713-723.

Fonte, P., Araújo, F., Reis, S., Sarmiento, B., 2013. Oral insulin delivery: how far are we? *J Diabetes Sci Technol* 7(2), 520-531.

Food, U., Administration, D., 2015. FDA approves Jardiance to treat type 2 diabetes. Press release. August 1, 2014.

Forbes, J.M., Cooper, M.E., 2013. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol. Rev.* 93(1), 137-188.

Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., Viollet, B., 2014. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab* 20(6), 953-966.

Fraser, M.H., Cuerrier, A., Haddad, P.S., Arnason, J.T., Owen, P.L., Johns, T., 2007. Medicinal plants of Cree communities (Quebec, Canada): antioxidant activity of plants used to treat type 2 diabetes symptoms. *Can J Physiol Pharmacol* 85(11), 1200-1214.

Fukami, K., Yamagishi, S., Ueda, S., Okuda, S., 2008. Role of AGEs in diabetic nephropathy. *Curr. Pharm. Des.* 14(10), 946-952.

Fulgencio, J.-P., Kohl, C., Girard, J., Pégrier, J.-P., 1996. Troglitazone Inhibits Fatty Acid Oxidation and Esterification, and Gluconeogenesis in Isolated Hepatocytes from Starved Rats. *Diabetes* 45(11), 1556-1562.

Gabrisko, M., 2013. Evolutionary history of eukaryotic alpha-glucosidases from the alpha-amylase family. *J. Mol. Evol.* 76(3), 129-145.

García, A.A., 2005. Symptom prevalence and treatments among mexican americans with type 2 diabetes. *Diabetes Educ* 31(4), 543-554.

Garriguet, D., 2008. Obesity and the eating habits of the Aboriginal population. *Health Rep* 19(1), 21-35.

Gerich, J.E., 1985. Sulfonylureas in the treatment of diabetes mellitus--1985. *Mayo Clin Proc* 60(7), 439-443.

Ghosh, R.K., Ghosh, S.M., Chawla, S., Jaskanwala, S.A., 2012. SGLT2 inhibitors: a new emerging therapeutic class in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Pharmacol.* 52(4), 457-463.

Giacco, F., Brownlee, M., 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 107(9), 1058-1070.

Gilbert, R.E., Cooper, M.E., 1999. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? *Kidney international* 56(5), 1627-1637.

Gilbertson, D.T., Liu, J., Xue, J.L., Louis, T.A., Solid, C.A., Ebben, J.P., Collins, A.J., 2005. Projecting the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2015. *J Am Soc Nephrol* 16(12), 3736-3741.

Godbout, A., Chiasson, J.L., 2007. Who should benefit from the use of alpha-glucosidase inhibitors? *Curr Diab Rep* 7(5), 333-339.

Golay, A., Ybarra, J., 2005. Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 19(4), 649-663.

Gonzalez, C.G., Alonso, A., Balbin, M., Diaz, F., Fernandez, S., Patterson, A.M., 2002. Effects of pregnancy on insulin receptor in liver, skeletal muscle and adipose tissue of rats. *Gynecol Endocrinol* 16(3), 193-205.

Goykhman, S., Drincic, A., Desmangles, J.C., Rendell, M., 2009. Insulin Glargine: a review 8 years after its introduction. *Expert Opin Pharmacother* 10(4), 705-718.

Grempler, R., Thomas, L., Eckhardt, M., Himmelsbach, F., Sauer, A., Sharp, D.E., Bakker, R.A., Mark, M., Klein, T., Eickelmann, P., 2012. Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes Obes Metab* 14(1), 83-90.

Grespi, F., Soratroi, C., Krumschnabel, G., Sohm, B., Ploner, C., Geley, S., Hengst, L., Häcker, G., Villunger, A., 2010. BH3-only protein Bmf mediates apoptosis upon inhibition of CAP-dependent protein synthesis. *Cell Death Differ.* 17(11), 1672-1683.

Group., U.P.D.S.U., 1998. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352(9131), 837-853.

Habib, S.L., 2013. Diabetes and renal tubular cell apoptosis. *World J Diabetes* 4(2), 27-30.

Haddad, P.S., Musallam, L., Martineau, L.C., Harris, C., Lavoie, L., Arnason, J.T., Foster, B., Bennett, S., Johns, T., Cuerrier, A., Coon Come, E., Coon Come, R., Diamond, J., Etapp, L., Etapp, C., George, J., Husky Swallow, C., Husky Swallow, J., Jolly, M., Kawapit, A., Mamianskum, E., Petagumskum, J., Petawabano, S., Petawabano, L., Weistche, A., Badawi, A., 2012. Comprehensive evidence-based assessment and prioritization of potential antidiabetic medicinal plants: a case study from canadian eastern james bay cree traditional medicine. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012, 893426.

Hage Hassan, R., Bourron, O., Hajduch, E., 2014. Defect of insulin signal in peripheral tissues: Important role of ceramide. *World J Diabetes* 5(3), 244-257.

Hamilton, M.T., Hamilton, D.G., Zderic, T.W., 2014. Sedentary behavior as a mediator of type 2 diabetes. *Med Sport Sci* 60, 11-26.

Hanley, A.J., Harris, S.B., Mamakeesick, M., Goodwin, K., Fiddler, E., Hegele, R.A., Spence, J.D., House, A.A., Brown, E., Schoales, B., McLaughlin, J.R., Klein, R., Zinman, B., 2005. Complications of Type 2 Diabetes Among Aboriginal Canadians: prevalence and associated risk factors. *Diabetes Care* 28(8), 2054-2057.

Harbilas, D., Brault, A., Vallerand, D., Martineau, L.C., Saleem, A., Arnason, J.T., Musallam, L., Haddad, P.S., 2012a. *Populus balsamifera* L. (Salicaceae) mitigates the development of obesity and improves insulin sensitivity in a diet-induced obese mouse model. *Journal of ethnopharmacology* 141(3), 1012-1020.

Harbilas, D., Martineau, L.C., Harris, C.S., Adeyiwola-Spoor, D.C., Saleem, A., Lambert, J., Caves, D., Johns, T., Prentki, M., Cuerrier, A., Arnason, J.T., Bennett, S.A., Haddad, P.S., 2009. Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: part II. *Can J Physiol Pharmacol* 87(6), 479-492.

- Harbilas, D., Vallerand, D., Brault, A., Saleem, A., Arnason, J.T., Musallam, L., Haddad, P.S., 2012b. *Larix laricina*, an Antidiabetic Alternative Treatment from the Cree of Northern Quebec Pharmacopoeia, Decreases Glycemia and Improves Insulin Sensitivity In Vivo. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2012, 296432.
- Harbilas, D., Vallerand, D., Brault, A., Saleem, A., Arnason, J.T., Musallam, L., Haddad, P.S., 2013. *Populus balsamifera* Extract and Its Active Component Salicortin Reduce Obesity and Attenuate Insulin Resistance in a Diet-Induced Obese Mouse Model. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2013, 172537.
- Harris, C.S., Asim, M., Saleem, A., Haddad, P.S., Arnason, J.T., Bennett, S.A.L., 2012. Characterizing the cytoprotective activity of *Sarracenia purpurea* L., a medicinal plant that inhibits glucotoxicity in PC12 cells. BMC Complementary and Alternative Medicine 12, 245-245.
- Harris, M.I., Klein, R., Welborn, T.A., Knudman, M.W., 1992. Onset of NIDDM occurs at least 4-7 yr before clinical diagnosis. Diabetes Care 15(7), 815-819.
- Hauer, H., 2002. The mode of action of thiazolidinediones. Diabetes Metab Res Rev 18 Suppl 2, S10-15.
- Hegele, R.A., Cao, H., Harris, S.B., Hanley, A.J., Zinman, B., 1999. The hepatic nuclear factor-1alpha G319S variant is associated with early-onset type 2 diabetes in Canadian Ojji-Cree. J Clin Endocrinol Metab 84(3), 1077-1082.
- Heikkinen, S., Auwerx, J., Argmann, C.A., 2007. PPARgamma in human and mouse physiology. Biochim Biophys Acta 1771(8), 999-1013.
- Heise, T., Hermanski, L., Nosek, L., Feldman, A., Rasmussen, S., Haahr, H., 2012. Insulin degludec: four times lower pharmacodynamic variability than insulin glargine under steady-state conditions in type 1 diabetes. Diabetes Obes Metab 14(9), 859-864.
- Hizoh, I., Haller, C., 2002. Radiocontrast-induced renal tubular cell apoptosis: hypertonic versus oxidative stress. Invest Radiol 37(8), 428-434.
- Holscher, C., 2010. Incretin analogues that have been developed to treat type 2 diabetes hold promise as a novel treatment strategy for Alzheimer's disease. Recent Pat CNS Drug Discov 5(2), 109-117.
- Holst, J.J., 2007. The physiology of glucagon-like peptide 1. Physiol. Rev. 87(4), 1409-1439.

Horio, M., Ito, A., Matsuoka, Y., Moriyama, T., Orita, Y., Takenaka, M., Imai, E., 2001. Apoptosis induced by hypertonicity in Madin Darley canine kidney cells: protective effect of betaine. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 16(3), 483-490.

Hu, F.B., 2003. Sedentary lifestyle and risk of obesity and type 2 diabetes. *Lipids* 38(2), 103-108.

Huang, K., Chan, S.J., Hua, Q.X., Chu, Y.C., Wang, R.Y., Klaproth, B., Jia, W., Whittaker, J., De Meyts, P., Nakagawa, S.H., Steiner, D.F., Katsoyannis, P.G., Weiss, M.A., 2007. The A-chain of insulin contacts the insert domain of the insulin receptor. Photo-cross-linking and mutagenesis of a diabetes-related crevice. *J. Biol. Chem.* 282(48), 35337-35349.

Hunter, S.J., Garvey, W.T., 1998. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am. J. Med.* 105(4), 331-345.

IADPSG, 2010. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care* 33(3), 676-682.

Javed, S., Petropoulos, I.N., Alam, U., Malik, R.A., 2015. Treatment of painful diabetic neuropathy. *Ther Adv Chronic Dis* 6(1), 15-28.

Juutilainen, A., Kortelainen, S., Lehto, S., Rönnemaa, T., Pyörälä, K., Laakso, M., 2004. Gender Difference in the Impact of Type 2 Diabetes on Coronary Heart Disease Risk. *Diabetes Care* 27(12), 2898-2904.

Kahn, S.E., Cooper, M.E., Del Prato, S., 2014. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet* 383(9922), 1068-1083.

Kahn, S.E., Hull, R.L., Utzschneider, K.M., 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444(7121), 840-846.

Kalra, S., 2014. Sodium Glucose Co-Transporter-2 (SGLT2) Inhibitors: A Review of Their Basic and Clinical Pharmacology. *Diabetes Ther* 5(2), 355-366.

Kalra, S., Gupta, Y., 2015. Clinical use of Insulin Degludec: Practical Experience and Pragmatic Suggestions. *N Am J Med Sci* 7(3), 81-85.

Kalra, S., Madhu, S.V., Bajaj, S., 2015. Sulfonylureas: Assets in the past, present and future. *Indian J Endocrinol Metab* 19(3), 314-316.

- Kampmann, U., Madsen, L.R., Skajaa, G.O., Iversen, D.S., Moeller, N., Ovesen, P., 2015. Gestational diabetes: A clinical update. *World J Diabetes* 6(8), 1065-1072.
- Karalliedde, J., Gnudi, L., 2014. Diabetes mellitus, a complex and heterogeneous disease, and the role of insulin resistance as a determinant of diabetic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* 31(2), 206-213.
- Kaur, S., Pandhi, P., Dutta, P., 2011. Painful diabetic neuropathy: an update. *Ann Neurosci* 18(4), 168-175.
- Keating, G.M., 2012. Insulin detemir: a review of its use in the management of diabetes mellitus. *Drugs* 72(17), 2255-2287.
- Kim, S.J., Winter, K., Nian, C., Tsuneoka, M., Koda, Y., McIntosh, C.H., 2005. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic beta-cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1, and down-regulation of bax expression. *J. Biol. Chem.* 280(23), 22297-22307.
- King, H., Aubert, R.E., Herman, W.H., 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes care* 21(9), 1414-1431.
- King, H., Rewers, M., 1993. Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. WHO Ad Hoc Diabetes Reporting Group. *Diabetes care* 16(1), 157-177.
- Kitada, M., Zhang, Z., Mima, A., King, G.L., 2010. Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *J Diabetes Investig* 1(3), 77-89.
- Kolberg, J.A., Jørgensen, T., Gerwien, R.W., Hamren, S., McKenna, M.P., Moler, E., Rowe, M.W., Urdea, M.S., Xu, X.M., Hansen, T., Pedersen, O., Borch-Johnsen, K., 2009. Development of a Type 2 Diabetes Risk Model From a Panel of Serum Biomarkers From the Inter99 Cohort. *Diabetes Care* 32(7), 1207-1212.
- Kowluru, R.A., 2005. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. *Antioxid. Redox Signal.* 7(11-12), 1581-1587.
- Krauss, R.M., Siri, P.W., 2004. Metabolic abnormalities: triglyceride and low-density lipoprotein. *Endocrinol Metab Clin North Am* 33(2), 405-415.
- Krentz, A.J., Bailey, C.J., 2005. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 65(3), 385-411.

Krolewski, A.S., Warram, J.H., Christlieb, A.R., Busick, E.J., Kahn, C.R., 1985. The changing natural history of nephropathy in type I diabetes. *Am. J. Med.* 78(5), 785-794.

Kumar, D., Robertson, S., Burns, K.D., 2004. Evidence of apoptosis in human diabetic kidney. *Molecular and cellular biochemistry* 259(1-2), 67-70.

Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O., 2011. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacogn Rev* 5(9), 19-29.

Kuzmina, E., Lejeune, P., Dannenbaum, D., Torrie, J.E., 2010. Cree Diabetes Information System (CDIS) 2009 Annual Report. Public Health Report Series 3 on Diabetes
Cree Board of Health and Social Services of James Bay.

Laakso, M., 2010. Cardiovascular disease in type 2 diabetes from population to man to mechanisms: the Kelly West Award Lecture 2008. *Diabetes Care* 33(2), 442-449.

Landau, B.R., Wahren, J., Chandramouli, V., Schumann, W.C., Ekberg, K., Kalhan, S.C., 1996. Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J. Clin. Invest.* 98(2), 378-385.

Lau, G.J., Godin, N., Maachi, H., Lo, C.S., Wu, S.J., Zhu, J.X., Brezniceanu, M.L., Chénier, I., Fragasso-Marquis, J., Lattouf, J.B., Ethier, J., Filep, J.G., Ingelfinger, J.R., Nair, V., Kretzler, M., Cohen, C.D., Zhang, S.L., Chan, J.S., 2012. Bcl-2-modifying factor induces renal proximal tubular cell apoptosis in diabetic mice. *Diabetes* 61(2), 474-484.

Leduc, C., Coonishish, J., Haddad, P., Cuerrier, A., 2006. Plants used by the Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany. *Journal of ethnopharmacology* 105(1-2), 55-63.

Lee, W., Eom, D.W., Jung, Y., Yamabe, N., Lee, S., Jeon, Y., Hwang, Y.R., Lee, J.H., Kim, Y.K., Kang, K.S., Kim, S.N., 2012. *Dendrobium moniliforme* attenuates high-fat diet-induced renal damage in mice through the regulation of lipid-induced oxidative stress. *The American journal of Chinese medicine* 40(6), 1217-1228.

Li, S., Brault, A., Sanchez Villavicencio, M., Haddad, P.S., 2016. *Rhododendron groenlandicum* (Labrador tea), an antidiabetic plant from the traditional pharmacopoeia of the Canadian Eastern James Bay Cree, improves renal integrity in the diet-induced obese mouse model. *Pharm. Biol.*, 1-9.

Lim, A., 2014. Diabetic nephropathy - complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 7, 361-381.

- Lin, Y., Sun, Z., 2010. Current views on type 2 diabetes. *J. Endocrinol.* 204(1), 1-11.
- Lorber, D., 2014. Importance of cardiovascular disease risk management in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes* 7, 169-183.
- Luna, B., Hughes, A.T., Feinglos, M.N., 1999. The use of insulin secretagogues in the treatment of type 2 diabetes. *Prim Care* 26(4), 895-915.
- Maghbooli, Z., Pasalar, P., Keshtkar, A., Farzadfar, F., Larijani, B., 2014. Predictive factors of diabetic complications: a possible link between family history of diabetes and diabetic retinopathy. *J Diabetes Metab Disord* 13, 55.
- Marathe, C.S., Rayner, C.K., Jones, K.L., Horowitz, M., 2011. Effects of GLP-1 and incretin-based therapies on gastrointestinal motor function. *Exp Diabetes Res* 2011, 279530.
- Marcussen, N., 2000. Tubulointerstitial damage leads to atubular glomeruli: significance and possible role in progression. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 15 Suppl 6, 74-75.
- Martineau, L.C., Adeyiwola-Spoor, D.C., Vallerand, D., Afshar, A., Arnason, J.T., Haddad, P.S., 2010. Enhancement of muscle cell glucose uptake by medicinal plant species of Canada's native populations is mediated by a common, metformin-like mechanism. *Journal of ethnopharmacology* 127(2), 396-406.
- Maruyama, Y., Nakajima, T., Ichishima, E., 1994. A 1,2-alpha-D-mannosidase from a *Bacillus* sp.: purification, characterization, and mode of action. *Carbohydr Res* 251, 89-98.
- Matsushita, K., van der Velde, M., Astor, B.C., Woodward, M., Levey, A.S., de Jong, P.E., Coresh, J., Gansevoort, R.T., 2010. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 375(9731), 2073-2081.
- Maynard, J.D., Rohrscheib, M., Way, J.F., Nguyen, C.M., Ediger, M.N., 2007. Noninvasive Type 2 Diabetes Screening. Superior sensitivity to fasting plasma glucose and A1C 30(5), 1120-1124.
- McCall, A.L., Farhy, L.S., 2013. Treating type 1 diabetes: from strategies for insulin delivery to dual hormonal control. *Minerva Endocrinol* 38(2), 145-163.
- McIntosh, C.H., Widenmaier, S., Kim, S.J., 2009. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (Gastric Inhibitory Polypeptide; GIP). *Vitam Horm* 80, 409-471.

Miettinen, H., Lehto, S., Salomaa, V., Mahonen, M., Niemela, M., Haffner, S.M., Pyorala, K., Tuomilehto, J., 1998. Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The FINMONICA Myocardial Infarction Register Study Group. *Diabetes Care* 21(1), 69-75.

Mittendorfer, B., Klein, S., 2014. Absence of leptin triggers type 1 diabetes. *Nature medicine* 20(7), 705-706.

Mogensen, C.E., Christensen, C.K., Vittinghus, E., 1983. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 32 Suppl 2, 64-78.

Mudaliar, S., Edelman, S.V., 2001. Insulin therapy in type 2 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30(4), 935-982.

Musso, G., Gambino, R., Cassader, M., 2011. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annu. Rev. Med.* 62, 361-380.

Nachar, A., Saleem, A., Arnason, J.T., Haddad, P.S., 2015. Regulation of liver cell glucose homeostasis by dehydroabietic acid, abietic acid and squalene isolated from balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.) a plant of the Eastern James Bay Cree traditional pharmacopeia. *Phytochemistry* 117, 373-379.

Nachar, A., Vallerand, D., Musallam, L., Lavoie, L., Badawi, A., Arnason, J., Haddad, P.S., 2013. The action of antidiabetic plants of the canadian james bay cree traditional pharmacopeia on key enzymes of hepatic glucose homeostasis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 189819.

Nakajima, M., Imamura, H., Shoun, H., Wakagi, T., 2003. Unique metal dependency of cytosolic alpha-mannosidase from *Thermotoga maritima*, a hyperthermophilic bacterium. *Arch Biochem Biophys* 415(1), 87-93.

Nangaku, M., 2004. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 43(1), 9-17.

Nauck, M.A., 2014. Update on developments with SGLT2 inhibitors in the management of type 2 diabetes. *Drug Des Devel Ther* 8, 1335-1380.

NDDG, 1979. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes* 28(12), 1039-1057.

Neel, J.V., 1962. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 14, 353-362.

Newton, C.A., Raskin, P., 2004. Diabetic Ketoacidosis in Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus: Clinical and Biochemical Differences. *Archives of Internal Medicine* 164(17), 1925-1931.

Nishi, M., Nanjo, K., 2011. Insulin gene mutations and diabetes. *J Diabetes Investig* 2(2), 92-100.

O'Sullivan, J.B., Mahan, C.M., 1964. CRITERIA FOR THE ORAL GLUCOSE TOLERANCE TEST IN PREGNANCY. *Diabetes* 13, 278-285.

Olokoba, A.B., Obateru, O.A., Olokoba, L.B., 2012. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J* 27(4), 269-273.

Onodera, T., Ray, U.R., Melez, K.A., Suzuki, H., Toniolo, A., Notkins, A.L., 1982. Virus-induced diabetes mellitus: autoimmunity and polyendocrine disease prevented by immunosuppression. *Nature* 297(5861), 66-68.

Onodera, T., Toniolo, A., Ray, U.R., Jenson, A.B., Knazek, R.A., Notkins, A.L., 1981. Virus-induced diabetes mellitus. XX. Polyendocrinopathy and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 153(6), 1457-1473.

Osonoi, T., Saito, M., Mochizuki, K., Fukaya, N., Muramatsu, T., Inoue, S., Fuchigami, M., Goda, T., 2010. The alpha-glucosidase inhibitor miglitol decreases glucose fluctuations and inflammatory cytokine gene expression in peripheral leukocytes of Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 59(12), 1816-1822.

Ossman, S.S., 2006. Diabetic Nephropathy: Where We Have Been and Where We Are Going. *Diabetes Spectrum* 19(3), 153-156.

Ouchfoun, M., Eid, H.M., Musallam, L., Brault, A., Li, S., Vallerand, D., Arnason, J.T., Haddad, P.S., 2015. Labrador tea (*Rhododendron groenlandicum*) attenuates insulin resistance in a diet-induced obesity mouse model. *European journal of nutrition*.

Ouchfoun, M., Eid, H.M., Musallam, L., Brault, A., Li, S., Vallerand, D., Arnason, J.T., Haddad, P.S., 2016. Labrador tea (*Rhododendron groenlandicum*) attenuates insulin resistance in a diet-induced obesity mouse model. *Eur J Nutr* 55(3), 941-954.

Ozougwu, J.C., Obimba, K.C., Belonwu, C.D., Unakalamba, C.B., 2013. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology* 4(4), 46-57.

Palicka, V., 2002. Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *Ejifcc* 13(5), 140-144.

Pandeyarajan, V., Weiss, M.A., 2012. Design of non-standard insulin analogs for the treatment of diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 12(6), 697-704.

Papathodorou, K., Banach, M., Edmonds, M., Papanas, N., Papazoglou, D., 2015. Complications of Diabetes. *J Diabetes Res* 2015, 189525.

Parhofer, K.G., Goke, B., 2002. [Glinides and glitazones in diabetes treatment. Are they really effective?]. *MMW Fortschr Med* 144(18), 34-36, 38-39.

Parving, H.H., Persson, F., Rossing, P., 2015. Microalbuminuria: a parameter that has changed diabetes care. *Diabetes research and clinical practice* 107(1), 1-8.

Perley, M., Kipnis, D.M., 1966. Plasma insulin responses to glucose and tolbutamide of normal weight and obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes* 15(12), 867-874.

Petersen, K.F., Shulman, G.I., 2002. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 90(5a), 11g-18g.

Philips, J.C., Scheen, A., 2006. Insulin detemir in the treatment of type 1 and type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag* 2(3), 277-283.

Phillippe, H.M., Wargo, K.A., 2013. Mitiglinide for type 2 diabetes treatment. *Expert Opin Pharmacother* 14(15), 2133-2144.

Piciucchi, M., Capurso, G., Archibugi, L., Delle Fave, M.M., Capasso, M., Delle Fave, G., 2015. Exocrine pancreatic insufficiency in diabetic patients: prevalence, mechanisms, and treatment. *Int J Endocrinol* 2015, 595649.

Piller, K., Daniel, R.M., Petach, H.H., 1996. Properties and stabilization of an extracellular alpha-glucosidase from the extremely thermophilic archaeobacteria *Thermococcus* strain AN1: enzyme activity at 130 degrees C. *Biochim Biophys Acta* 1292(1), 197-205.

Pinero-Pilona, A., Raskin, P., 2001. Idiopathic Type 1 diabetes. *J Diabetes Complications* 15(6), 328-335.

Pons, R.S., Rockett, F.C., de Almeida Rubin, B., Oppermann, M.L.R., Bosa, V.L., 2015. Risk factors for gestational diabetes mellitus in a sample of pregnant women diagnosed with the disease. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 7(Suppl 1), A80-A80.

Punthakee, Z., Werstuck, G.H., Gerstein, H.C., 2007. Diabetes and cardiovascular disease: explaining the relationship. *Rev Cardiovasc Med* 8(3), 145-153.

Puttagunta, A.L., Toth, E.L., 1998. Insulin lispro (Humalog), the first marketed insulin analogue: indications, contraindications and need for further study. *Cmaj* 158(4), 506-511.

Rahimi, Z., 2012. ACE insertion/deletion (I/D) polymorphism and diabetic nephropathy. *J Nephrothol* 1(3), 143-151.

Rajeev, S.P., Wilding, J., 2015. SGLT2 inhibition and ketoacidosis – should we be concerned? *The British Journal of Diabetes* 15(4).

Raju SM, R.B., 2010. *Illustrated medical biochemistry*, 2nd Edition ed. Jaypee Brothers Medical Publishers ltd, New Delhi, India.

Raptis, A.E., Viberti, G., 2001. Pathogenesis of diabetic nephropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 Suppl 2, S424-437.

Rendell, M., 2004. The role of sulphonylureas in the management of type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 64(12), 1339-1358.

Richard, J.W., 3rd, Raskin, P., 2011. Updated review: improved glycemic control with repaglinide-metformin in fixed combination for patients with type 2 diabetes. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes* 4, 29-37.

Ritz, E., Orth, S.R., 1999. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 341(15), 1127-1133.

Rivera-Marrero, C.A., Ritzenthaler, J.D., Roman, J., Moremen, K.W., 2001. Molecular cloning and expression of an alpha-mannosidase gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb. Pathog.* 30(1), 9-18.

Rolfsmeier, M., Blum, P., 1995. Purification and characterization of a maltase from the extremely thermophilic crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* 177(2), 482-485.

Russell, J.W., Zilliox, L.A., 2014. Diabetic neuropathies. *Continuum (Minneapolis)* 20(5 Peripheral Nervous System Disorders), 1226-1240.

Sacks, D.A., Abu-Fadil, S., Greenspoon, J.S., Fotheringham, N., 1989. Do the current standards for glucose tolerance testing in pregnancy represent a valid conversion of O'Sullivan's original criteria? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 161(3), 638-641.

Sacks, D.B., Bruns, D.E., Goldstein, D.E., Maclaren, N.K., McDonald, J.M., Parrott, M., 2002. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Clin. Chem.* 48(3), 436-472.

Salomone, S., 2011. Pleiotropic effects of glitazones: a double edge sword? *Front Pharmacol* 2, 14.

Saloranta, C., Hershon, K., Ball, M., Dickinson, S., Holmes, D., 2002. Efficacy and safety of nateglinide in type 2 diabetic patients with modest fasting hyperglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87(9), 4171-4176.

Sanchez-Nino, M.D., Sanz, A.B., Lorz, C., Gnrirke, A., Rastaldi, M.P., Nair, V., Egido, J., Ruiz-Ortega, M., Kretzler, M., Ortiz, A., 2010. BASP1 promotes apoptosis in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21(4), 610-621.

Sanke, T., Nanjo, K., 1994. [Review for clinical molecular genetics of mutant insulin]. *Nihon Rinsho* 52(10), 2550-2555.

Santos Cavaioia, T., Edelman, S., 2014. Inhaled insulin: a breath of fresh air? A review of inhaled insulin. *Clin Ther* 36(8), 1275-1289.

Scarsi, M., Podvinec, M., Roth, A., Hug, H., Kersten, S., Albrecht, H., Schwede, T., Meyer, U.A., Rucker, C., 2007. Sulfonylureas and glinides exhibit peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity: a combined virtual screening and biological assay approach. *Mol. Pharmacol.* 71(2), 398-406.

Schena, F.P., Gesualdo, L., 2005. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 16 Suppl 1, S30-33.

Schwitzgebel, V.M., 2014. Many faces of monogenic diabetes. *J Diabetes Investig* 5(2), 121-133.

Seino, Y., Fukushima, M., Yabe, D., 2010. GIP and GLP-1, the two incretin hormones: Similarities and differences. *J Diabetes Investig* 1(1-2), 8-23.

Senesh, G., Bushi, D., Neta, A., Yodfat, O., 2010. Compatibility of insulin Lispro, Aspart, and Glulisine with the Solo MicroPump, a novel miniature insulin pump. *J Diabetes Sci Technol* 4(1), 104-110.

Shah, C.P., Chen, C., 2011. Review of therapeutic advances in diabetic retinopathy. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2(1), 39-53.

Shang, N., Saleem, A., Musallam, L., Walshe-Roussel, B., Badawi, A., Cuerrier, A., Arnason, J.T., Haddad, P.S., 2015. Novel Approach to Identify Potential Bioactive Plant Metabolites: Pharmacological and Metabolomics Analyses of Ethanol and Hot Water Extracts of Several Canadian Medicinal Plants of the Cree of Eeyou Istchee. *PloS one* 10(8), e0135721.

Sharplin, P., Gordon, J., Peters, J.R., Tetlow, A.P., Longman, A.J., McEwan, P., 2009. Improved glycaemic control by switching from insulin NPH to insulin glargine: a retrospective observational study. *Cardiovasc Diabetol* 8, 3.

Sherman, J.J., 2005. The Impact of Smoking and Quitting Smoking on Patients With Diabetes. *Diabetes Spectrum* 18(4), 202-208.

Shrivastava, S.R., Shrivastava, P.S., Ramasamy, J., 2013. Role of self-care in management of diabetes mellitus. *Journal of diabetes and metabolic disorders* 12(1), 14-14.

Shubrook, J.H., Bokaie, B.B., Adkins, S.E., 2015. Empagliflozin in the treatment of type 2 diabetes: evidence to date. *Drug Des Devel Ther* 9, 5793-5803.

Simone, S., Gorin, Y., Velagapudi, C., Abboud, H.E., Habib, S.L., 2008. Mechanism of oxidative DNA damage in diabetes: tuberin inactivation and downregulation of DNA repair enzyme 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine-DNA glycosylase. *Diabetes* 57(10), 2626-2636.

Simpson, D., McCormack, P.L., Keating, G.M., Lyseng-Williamson, K.A., 2007. Insulin lispro: a review of its use in the management of diabetes mellitus. *Drugs* 67(3), 407-434.

Skyler, J.S., Oddo, C., 2002. Diabetes trends in the USA. *Diabetes/metabolism research and reviews* 18 Suppl 3, S21-S26.

Sola, D., Rossi, L., Schianca, G.P., Maffioli, P., Bigliocca, M., Mella, R., Corliano, F., Fra, G.P., Bartoli, E., Derosa, G., 2015. Sulfonylureas and their use in clinical practice. *Arch Med Sci* 11(4), 840-848.

Spoor, D.C., Martineau, L.C., Leduc, C., Benhaddou-Andaloussi, A., Meddah, B., Harris, C., Burt, A., Fraser, M.H., Coonishish, J., Joly, E., Cuerrier, A., Bennett, S.A., Johns, T., Prentki, M., Arnason, J.T., Haddad, P.S., 2006. Selected plant species from the Cree pharmacopoeia of northern Quebec possess anti-diabetic potential. *Can J Physiol Pharmacol* 84(8-9), 847-858.

Stern, C.S., Lebowitz, J., 2010. Latest drug developments in the field of cardiovascular disease. *Int J Angiol* 19(3), e100-105.

Strack, T., 2008. Metformin: a review. *Drugs Today (Barc)* 44(4), 303-314.

Stratton, I.M., Adler, A.I., Neil, H.A., Matthews, D.R., Manley, S.E., Cull, C.A., Hadden, D., Turner, R.C., Holman, R.R., 2000. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ (Clinical research ed.)* 321(7258), 405-412.

- Stumvoll, M., Goldstein, B.J., van Haeften, T.W., 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet (London, England)* 365(9467), 1333-1346.
- Susztak, K., Ciccone, E., McCue, P., Sharma, K., Böttinger, E.P., 2005. Multiple metabolic hits converge on CD36 as novel mediator of tubular epithelial apoptosis in diabetic nephropathy. *PLoS Med* 2(2), e45.
- Takahashi, N., Kawada, T., Goto, T., Kim, C.S., Taimatsu, A., Egawa, K., Yamamoto, T., Jisaka, M., Nishimura, K., Yokota, K., Yu, R., Fushiki, T., 2003. Abietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) in RAW264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes to regulate gene expression involved in inflammation and lipid metabolism. *FEBS letters* 550(1-3), 190-194.
- Tan, K.T., Cheah, J.S., 1990. Pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Ann Acad Med Singapore* 19(4), 506-511.
- Tentolouris, N., Voulgari, C., Katsilambros, N., 2007. A review of nateglinide in the management of patients with type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag* 3(6), 797-807.
- Terada, Y., Inoshita, S., Hanada, S., Shimamura, H., Kuwahara, M., Ogawa, W., Kasuga, M., Sasaki, S., Marumo, F., 2001. Hyperosmolality activates Akt and regulates apoptosis in renal tubular cells. *Kidney international* 60(2), 553-567.
- Tsai, A.G., Williamson, D.F., Glick, H.A., 2011. Direct medical cost of overweight and obesity in the USA: a quantitative systematic review. *Obes Rev* 12(1), 50-61.
- Turner R, H.R., Stratton I, Cull C, Frighi V, Manley S, Matthews D, Neil A, McElroy H, Kohner E, Fox C, Hadden D, Wright D, and Turner R.C., 1998. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *Bmj* 317(7160), 703-713.
- Uy, J., Fogelfeld, L., Guerra, Y., 2012. Cumulative clinical experience with use of insulin lispro: critical appraisal, role in therapy, and patient considerations. *Diabetes Metab Syndr Obes* 5, 1-10.
- van Bloemendaal, L., IJzerman, R.G., ten Kulve, J.S., Barkhof, F., Konrad, R.J., Drent, M.L., Veltman, D.J., Diamant, M., 2014. GLP-1 Receptor Activation Modulates Appetite- and Reward-Related Brain Areas in Humans. *Diabetes* 63(12), 4186-4196.
- Van Noorden, C.J., 2001. The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem* 103(3), 241-251.

Velagapudi, C., Bhandari, B.S., Abboud-Werner, S., Simone, S., Abboud, H.E., Habib, S.L., 2011. The tuberlin/mTOR pathway promotes apoptosis of tubular epithelial cells in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 22(2), 262-273.

Vella, S., Buetow, L., Royle, P., Livingstone, S., Colhoun, H.M., Petrie, J.R., 2010. The use of metformin in type 1 diabetes: a systematic review of efficacy. *Diabetologia* 53(5), 809-820.

Verzola, D., Bertolotto, M.B., Villaggio, B., Ottonello, L., Dallegri, F., Salvatore, F., Berruti, V., Gandolfo, M.T., Garibotto, G., Deferrari, G., 2004. Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 15 Suppl 1, S85-S87.

Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., Andreelli, F., 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)* 122(6), 253-270.

Viswanath, K., McGavin, D.D., 2003. Diabetic retinopathy: clinical findings and management. *Community Eye Health* 16(46), 21-24.

Wang, J., Takeuchi, T., Tanaka, S., Kubo, S.K., Kayo, T., Lu, D., Takata, K., Koizumi, A., Izumi, T., 1999. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J. Clin. Invest.* 103(1), 27-37.

Waser, B., Rehmann, R., Sanchez, C., Fourmy, D., Reubi, J.C., 2012. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptors in most gastroenteropancreatic and bronchial neuroendocrine tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97(2), 482-488.

Watson, C.P., Moulin, D., Watt-Watson, J., Gordon, A., Eisenhoffer, J., 2003. Controlled-release oxycodone relieves neuropathic pain: a randomized controlled trial in painful diabetic neuropathy. *Pain* 105(1-2), 71-78.

Wheatcroft, S.B., Williams, I.L., Shah, A.M., Kearney, M.T., 2003. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med* 20(4), 255-268.

WHO, 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva : World Health Organization WHO/NCD/NCS/(99.2), 59 p.

WHO, 2011. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee, Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus: Abbreviated Report of a WHO Consultation. World Health Organization Copyright (c) World Health Organization 2011., Geneva.

Wikipedia, Insulin analog. https://en.wikipedia.org/wiki/Insulin_analog.

Wikipedia, Meglitinide. https://en.wikipedia.org/wiki/Meglitinide#cite_note-pmid16735959-1.

Wikipedia, [Thiazolidinedione](https://en.wikipedia.org/wiki/Rosiglitazone). <https://en.wikipedia.org/wiki/Rosiglitazone>.

Wilcox, G., 2005. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 26(2), 19-39.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H., 2004. Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030 27(5), 1047-1053.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H., 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care* 27(5), 1047-1053.

Wilkin, T.J., 2001. The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between Type I and Type II diabetes. *Diabetologia* 44(7), 914-922.

Winter, W.E., Maclaren, N.K., Riley, W.J., Clarke, D.W., Kappy, M.S., Spillar, R.P., 1987. Maturity-onset diabetes of youth in black Americans. *N Engl J Med* 316(6), 285-291.

Wu, Y., Ding, Y., Tanaka, Y., Zhang, W., 2014. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci* 11(11), 1185-1200.

Wu, Z., Xie, Y., Morrison, R.F., Bucher, N.L., Farmer, S.R., 1998. PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J. Clin. Invest.* 101(1), 22-32.

Yamaoka, T., 2001. Gene therapy for diabetes mellitus. *Curr. Mol. Med.* 1(3), 325-337.

Yoshida, M., Booth, S.L., Meigs, J.B., Saltzman, E., Jacques, P.F., 2008. Phylloquinone intake, insulin sensitivity, and glycemic status in men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* 88(1), 210-215.

Yoshida, T., Yoshino, J., Hayashi, M., Saruta, T., 2002. Identification of a renal proximal tubular cell-specific enhancer in the mouse 25-hydroxyvitamin d 1alpha-hydroxylase gene. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 13(6), 1455-1463.

Young, T.K., Reading, J., Elias, B., O'Neil, J.D., 2000. Type 2 diabetes mellitus in Canada's first nations: status of an epidemic in progress. *Cmaj* 163(5), 561-566.

Yun, S.H., Adelman, R.A., 2015. Recent developments in laser treatment of diabetic retinopathy. *Middle East Afr J Ophthalmol* 22(2), 157-163.

Zelmanovitz, T., Gerchman, F., Balthazar, A.P., Thomazelli, F.C., Matos, J.D., Canani, L.H., 2009. Diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr* 1(1), 10.

Zhang, B., Suzuki, J.S., Nishimura, N., Tohyama, C., 1995. Difference in cadmium cytotoxicity in two kidney cell lines (LLC-PK(1) and MDCK) with special reference to metallothionein. *Toxicol In Vitro* 9(5), 765-772.

Zhang, H.M., Dang, H., Kamat, A., Yeh, C.K., Zhang, B.X., 2012. Geldanamycin derivative ameliorates high fat diet-induced renal failure in diabetes. *PloS one* 7(3), e32746.

Zimmet, P., Alberti, K.G., Shaw, J., 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414(6865), 782-787.