

Université de Montréal

Inhibition de l'absorption intestinale du glucose par les produits naturels issus de la pharmacopée traditionnelle des Cris de la Baie James

par

Lidia Anca Nistor

Département de pharmacologie,

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en Pharmacologie

Août 2009

© Lidia Anca Nistor, 2009

Université de Montréal
Faculté des Études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Inhibition de l'absorption intestinale du glucose par les produits naturels issus de la pharmacopée traditionnelle des Cris de la Baie James

Présenté par :

Lidia Anca Nistor

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Christian Beausejour, président-rapporteur

Dr Pierre Haddad, directeur de recherche

Dr Emile Levy, codirecteur de recherche

Dr Emmanuelle Brochiero, membre du jury

Résumé

Le diabète de type 2 et l'obésité sont des problèmes de santé majeurs et les peuples autochtones sont particulièrement à risque. Pour remédier à ce problème largement répandu dans les populations autochtones canadiennes pour qui la médication moderne n'est pas culturellement adaptée, notre équipe s'est donné comme objectif d'étudier les activités potentielles antidiabétique et anti-obésité de la pharmacopée traditionnelle des Cris de la Baie James. Le but de cette étude est de tester l'hypothèse selon laquelle certaines plantes médicinales pourraient inhiber l'absorption intestinale du glucose, une activité anti-hyperglycémique qui, par la même occasion, contribuerait à combattre l'obésité. Les extraits éthanoliques de dix-sept plantes médicinales de la forêt boréale ont été testés dans des cellules intestinales Caco-2 et comparés à l'effet d'inhibiteurs compétitifs connus, tels que la phlorizine et la phlorétine. Ces inhibiteurs sont des composés polyphénoliques qui partagent de nombreuses caractéristiques structurales avec des constituants moléculaires de plusieurs plantes Cri. Les résultats démontrent que treize des dix-sept extraits de plantes ont inhibé de façon significative l'absorption intestinale du $^3\text{H-D-glucose}$. Pour valider ces effets *in vivo*, quatre extraits ont été administrés à des rats Wistar par gavage intragastrique (250 mg/kg) en même temps qu'un bolus de glucose (3 g/kg). Suite à ce gavage, deux de ces extraits ont restreint l'augmentation de la glycémie d'environ 40% par rapport à un contrôle sans extrait. Ces résultats indiquent qu'une inhibition compétitive de l'absorption intestinale du glucose peut être atteinte par des extraits bruts de plantes médicinales. La prise de ces plantes durant les repas aiderait à un meilleur contrôle post-prandial de la glycémie, particulièrement chez les personnes à risque.

Mots clés : Diabète de type 2, transport du glucose, SGLT1, GLUT2, Caco-2/15, plantes médicinales, populations autochtones, produits de santé naturels.

Abstract:

Type II diabetes and obesity are major health problems worldwide and aboriginal peoples are particularly at risk. To address this problem in Canadian native populations for whom modern pharmaceuticals are culturally misadapted, our team is testing the traditional pharmacopeia of the James Bay Cree for anti-diabetic and anti-obesity activities. More specifically, the aim of the present study was to define the effects of traditional plants on intestinal glucose absorption, an under-appreciated anti-hyperglycaemic and anti-obesity activity. Crude ethanol extracts of seventeen Boreal forest medicinal plants were examined in the Caco-2 human enterocytic cell line and compared to the competitive classical inhibitors phlorizin and phloretin. It is worth noting that the latter compounds are polyphenols that share many structural characteristics with components of several Cree plants. Thirteen of seventeen extracts were observed to significantly inhibit uptake when administered simultaneously with 3H-deoxyglucose. Inhibition was dose-dependent and, in a few cases, even surpassed that induced by a combination of the positive controls. To validate these effects in-vivo, four plant extracts were administered by intragastric gavage at 250 mg/kg to normal rats simultaneously with a 3 g/kg bolus of glucose. This resulted in a decrease in peak glycaemia by approximately 40% for two of them. These findings indicate that competitive inhibition of facilitative intestinal glucose uptake can be achieved by crude extracts of medicinal plants. Intake of the latter with meals may help control post-prandial glycaemia and reduce caloric intake in high risk populations.

Keywords: Type 2 diabetes, glucose transport, SGLT1, GLUT2, Caco-2/15 cells, medicinal plants, aboriginal populations, natural health products.

Tables de matières

Page de titre.....	i
Page d'identification du jury.....	ii
Résumé.....	iii
Abstract	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Dédicace.....	xiii
Remerciements.....	xiv
1. Introduction.....	1
1.1. Digestion des sucres.....	5
1.1.1. Absorption des glucides.....	7
1.2. Le diabète – généralités.....	10

1.2.1. Classification du diabète.....	10
1.2.2. Résistance à l'insuline.....	13
1.2.3. Diabète de type II.....	13
1.2.4. Physiopathologie du diabète de type II.....	15
1.2.5. Diagnostique, symptômes et complications du diabète.....	16
1.2.6. Le traitement du DT2.....	17
1.2.6.1. Le traitement non pharmacologique.....	17
1.2.6.2. Le traitement pharmacologique.....	18
1.2.6.2.1. Médicaments en cours de développement clinique.....	20
1.3. Le diabète dans les populations autochtones.....	21
1.4. Modulation de l'absorption intestinale du glucose par les polyphénols et les plantes médicinales.....	22
1.5. Objectifs de l'étude	26
2. Article.....	29
3. Discussion générale.....	68
4. Conclusion et perspectives.....	73
5. Références.....	75

Liste des tableaux

Tableau I : Transport de glucose chez les mammifères.....4

Tableau II : Composition phénolique des 17 plantes médicinales étudiées25

Liste des figures

Figure 1 : Les principale étapes de la digestion des sucres.....	6
Figure 2 : L'absorption intestinale du glucose.....	8
Figure 3 : La pathologie du diabète de type II.....	15

Liste des abréviations

AMP	:	Adénosine monophosphate
AMPK	:	Protéine kinase activée par l'AMP
AUC	:	<i>Area under the curve</i>
BBM	:	<i>Brush border membrane</i>
CEI	:	<i>Cree of Eeyou Istchee</i>
cm	:	Centimètre
DMSO	:	Dimethyl sulfoxide
DT2	:	Diabète de type 2
g	:	Gramme
Glut	:	<i>Glucose transporter</i>
Glc6Pase	:	Glucose 6-phosphatase
h	:	Heure
kg	:	Kilogramme
LDH	:	Lactate dehydrogenase
MAP kinase	:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

MCV	:	Maladies cardio-vasculaires
mg	:	Milligramme
min	:	Minute
mL	:	Millilitre
mmol	:	Millimole
OGTT	:	<i>Oral glucose tolerance test</i>
PI-3 Kinase	:	Phosphatidyl-inositol-3 phosphate kinase
PKC	:	Protein kinase C
PPAR	:	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
SGLT1	:	<i>Sodium-glucose cotransporter 1</i>
TEER	:	<i>Transepithelial electrical resistance</i>
T2DM	:	<i>Type 2 diabetes mellitus</i>
µg	:	Microgramme
µL	:	Microlitre

À mes parents

À mon époux Florin

À mon fils Roberto

À mes neveux Alexandra et Radu

À mon frère et à ma belle sœur

À mes beaux parents

À tous mes amis

Remerciements

En premier, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Pierre Haddad, et mon codirecteur, le Dr. Émile Lévy de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires. Je les remercie également pour leurs conseils, leur générosité et leur disponibilité.

Je remercie particulièrement Carole pour son aide et sa gentillesse.

Je remercie aussi Geneviève pour son aide et son amitié.

J'aimerais remercier également le support que j'ai reçu de Diane et Antoine ainsi que l'aide et la gentillesse de mes collègues de laboratoire, Tri, Abir, Meriem, Arvind, Ali, Hoda, Despina.

Je voudrais aussi remercier Dr. Louis Martineau pour son support et ses commentaires précieux.

Je tiens à remercier aussi Florin et Roberto pour leur soutien infini.

1. Introduction

Le diabète de type 2 et l'obésité ont atteint des proportions épidémiques dans les pays développés et ceux en voie de développement (Edelman, 1998). Le nombre de personnes touchées va probablement doubler au cours des deux prochaines décennies (Wild, 2004). Au Canada, la prévalence du diabète augmentera de 2 millions de patients en 2005 à 3 millions en 2030 (WHO 2007). La diminution de la sécrétion d'insuline à partir des cellules β pancréatiques et l'insulino-résistance au niveau du foie, du muscle squelettique et du tissu adipeux, associées à l'obésité, représentent les principales causes du diabète de type 2. Ce syndrome est accompagné de complications sévères du système cardiovasculaire (CVS) qui représentent la principale cause de mortalité et morbidité (Laakso, 1999; Isomaa, 2001). La prévalence du diabète de type II est substantiellement élevée dans les populations qui consomment en excès les graisses saturées et les sucres raffinés caractéristiques à l'alimentation occidentale (Dyer, 2002) et qui contribuent à l'hyperinsulinisme et à la résistance à l'insuline (Shafir, 1991). Même si le comportement alimentaire est responsable en partie de l'apparition du diabète de type 2, la composante génétique joue un rôle prépondérant. Probablement que les individus développant une insulino-résistance ou un surpoids ont un génotype particulier.

Le diabète de type 2 montre une prévalence alarmante dans plusieurs populations autochtones (Campbell, 1994; Zimmet, 1998). Les Cris de la région orientale de la baie James du Nord du Québec sont particulièrement confrontés à ce problème. Dans ces populations, la prévalence du diabète de type II est trois à quatre fois plus grande que dans le reste de la population du Québec (Légaré, 2004). Cette incidence alarmante peut être expliquée par une prédisposition génétique, une déconnection culturelle de la médecine moderne et les changements assez récents dans le mode de vie (Brassard, 1993).

À cet égard, malgré la disponibilité de plusieurs médicaments pour le traitement du diabète, certaines communautés, comme les CEI (*Cree of Eeyou Istchee*), éprouvent de la difficulté à adhérer à la médication moderne et se tournent en partie vers la médecine traditionnelle et alternative. Pour remédier à ce problème, notre équipe se consacre à étudier les activités potentielles antidiabétique et anti-obésité de la pharmacopée traditionnelle des Cris de la Baie James.

Suite à des études ethnobotaniques menées auprès des CEI, plusieurs espèces de plantes médicinales utilisées par ces populations pour traiter les symptômes diabétiques, ont été identifiées (Leduc, 2006; Harbilas, 2009). L'enquête a visé les aînés et les guérisseurs des deux communautés Cris soit Mistissini et Whapmagoostui. Environ 15 symptômes associés au diabète ont servi de base pour l'investigation et 17 espèces de plantes ont été répertoriées et classifiées selon la fréquence de citation ainsi que le nombre et le type de symptômes (Leduc, 2006). Les extraits éthanoliques des dix-sept plantes médicinales de la forêt boréale ont fait l'objet de deux études de criblage *in vitro* et il a été démontré que la plupart d'entre eux montrent des propriétés antidiabétiques chez des lignées cellulaires sensibles à l'insuline (Spoor, 2006; Harbilas, 2009).

De nouvelles stratégies de prévention ou de traitement du diabète de type 2 peuvent être définies sur la base de l'inhibition de l'absorption des nutriments. Actuellement, des médicaments qui inhibent l'absorption des triglycérides et du cholestérol ou qui amoindrissent le catabolisme intestinal des sucres complexes sont disponibles (Yanovski, 2002; Van de Laar, 2005; Grundy, 2005). Il est évident que de nouveaux agents capables d'inhiber l'absorption intestinale du glucose peuvent avoir un impact important sur l'efficacité du traitement du diabète de type 2 (Kwon, 2007).

Le but de notre étude est d'identifier les extraits les plus efficaces parmi 17 plantes provenant de la pharmacopée Cris, capables de moduler l'absorption intestinale du glucose. Ces nouveaux inhibiteurs des transporteurs intestinaux du glucose peuvent se révéler très utiles dans le contrôle de la glycémie chez les patients diabétiques.

L'introduction de ce mémoire visera d'abord à résumer les connaissances sur le transport intestinal du glucose tant dans des conditions physiologiques normales que dans les situations déviantes caractérisant le diabète de type 2. Par la suite, une brève revue de littérature permettra de décrire le diabète de type 2, ses complications et son traitement.

La vie de tout organisme dépend de l'approvisionnement continu en énergie. L'un des carburants les plus importants du métabolisme est le D-glucose. Chez les mammifères, le transport du glucose est réalisé par un certain nombre de protéines membranaires spécifiques. Ils sont impliqués dans l'absorption du glucose par les cellules épithéliales intestinales et le segment tubulaire proximale du néphron. Le

glucose est retourné à la circulation pour fournir aux autres cellules l'énergie nécessaire pour les diverses exigences métaboliques. Dans les tissus, la captation de glucose est assurée par divers transporteurs de glucose dont la fonction est définie dans le tableau I. (Bouché, 2004; Mueckler, 1993)

Tableau I : Transport de glucose chez les mammifères (Mueckler, 1993).

Nom	Distribution tissulaire	Fonction
SglT1	Intestin, rein	Transport actif dépendant de Na ⁺ réalisé contre un gradient de concentration à travers les membranes apicales
Glut1	Abondant dans les érythrocytes, cellules endothéliales et plusieurs lignées cellulaires immortalisées	Transport basal de glucose; augmente le transport de glucose au cours de la croissance et la division cellulaire
Glut2	Hépatocytes, cellules β pancréatiques, intestin, rein	Assure la diffusion facilitée du glucose à travers la membrane baso-latérale
Glut3	Large distribution chez l'humain; présent dans le cerveau chez d'autres espèces	Transport basal chez plusieurs cellules humaines; absorption du glucose à partir du liquide encéphalique vers les cellules cérébrales
Glut4	Muscle squelettique, cœur, adipocytes	Assure le transport du glucose en réponse à l'insuline
Glut7	Hépatocytes et autres tissus néoglucogéniques	Transport du glucose à travers la membrane du RE

Le maintien de la balance énergétique est un processus fondamental pour l'organisme. L'équilibre est assuré lorsque l'entrée d'énergie (la prise alimentaire) est égale à la dépense énergétique. Un déséquilibre entre les apports et les dépenses

énergétiques peut avoir de graves répercussions, comme en témoigne aujourd'hui l'augmentation de la prévalence de l'obésité et du diabète de type 2 (Daval, 2006).

Le comportement alimentaire est mis en cause dans plusieurs maladies comme l'obésité, le diabète, les maladies cardiovasculaires et autres pathologies complexes. Parmi les facteurs alimentaires responsables en partie de ces troubles, les sucres raffinés sont de plus en plus consommés (Meneton, 2003). Les hydrates de carbone tiennent une place importante de notre diète quotidienne. Ils se retrouvent dans l'alimentation sous forme de monosaccharides (glucose, fructose et galactose), disaccharides (saccharose, maltose, lactose) ou polysaccharides (amidon) (Drozdowski, 2006). Les monosaccharides et les disaccharides se trouvent naturellement dans les aliments (le fructose dans les fruits ou le lactose dans le lait) ou bien ils sont rajoutés lors la préparation (ex. saccharose purifié). Les sucres complexes comme l'amidon, un polymère de glucose, sont présents naturellement dans les aliments (Meneton, 2003).

1.1 Digestion des sucres

Les polysaccharides et les disaccharides doivent subir une hydrolyse enzymatique pour être transformés en monosaccharides absorbables par les entérocytes. Quant à l'amidon ingéré, il est hydrolysé dans une proportion de 30 à 40% par l' α -amylase présente dans la salive. L'amidon résiduel est ensuite hydrolysé par l' α -amylase pancréatique en maltose et petits polymères de glucose qui seront à leur tour transformés en glucose par les α -glucosidases (maltase et α -dextrinase) présentes à la bordure en brosse des cellules intestinales. Les autres disaccharides provenant de l'alimentation seront hydrolysés au niveau de la bordure en brosse des entérocytes par des enzymes

spécifiques avec la formation des monosaccharides correspondantes (Figure 1) (Allannic, 1997; Meneton, 2003).

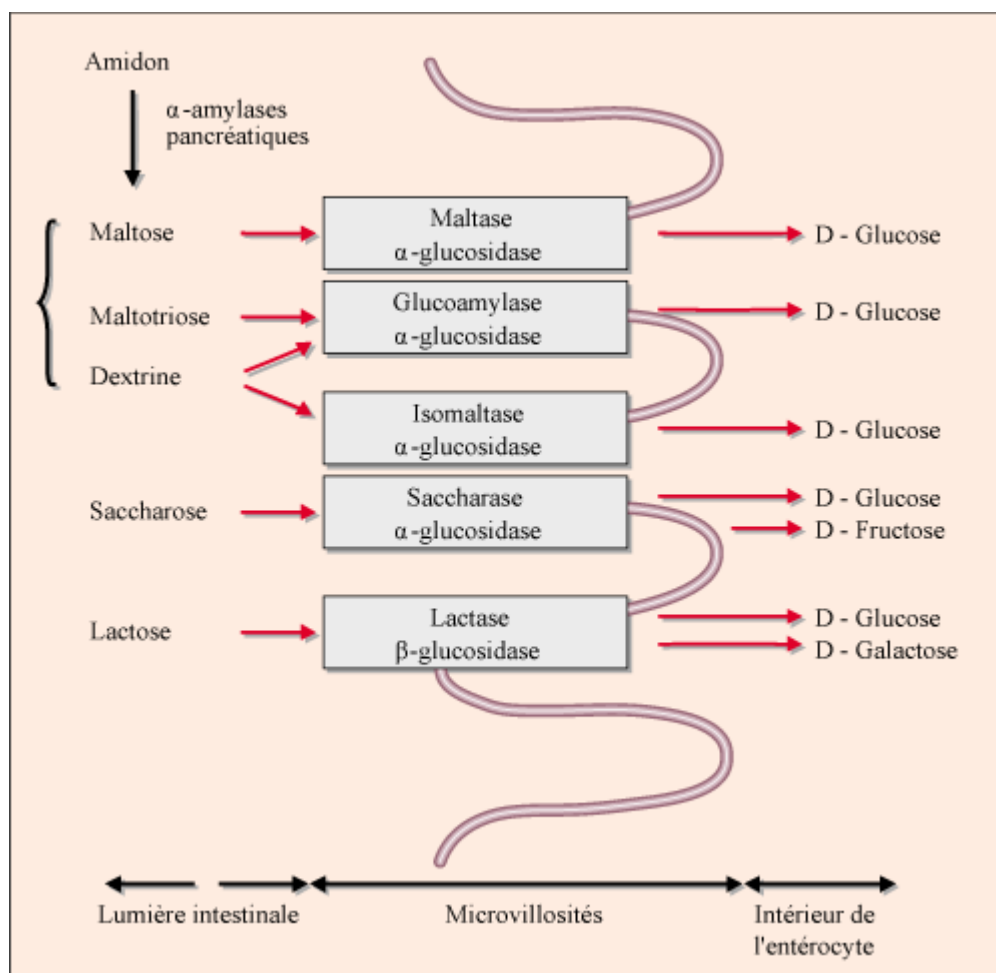


Figure 1. Les principales étapes de la digestion des sucres (d'après Allannic, 1997).

Malgré les différentes formes de glucides, seuls trois monosaccharides (le glucose, le fructose et le galactose) sont absorbés au niveau de l'intestin. Le glucose représente environ 80% des produits de digestion formés tandis que le fructose et le galactose représentent environ 20%. En plus le fructose et le galactose sont convertis en glucose par le foie. Le glucose, le produit majeur de l'ensemble des processus digestifs,

représente le substrat énergétique utilisé par la majorité des cellules de l'organisme pour générer de l'énergie ou pour synthétiser le glycogène sous forme de réserve glucidique (Tortora, 2001).

1.1.1 Absorption des glucides

Les hexoses sont des molécules hydrophiles ne pouvant pas diffuser à travers la membrane plasmique. Le glucose et le galactose pénètrent dans l'entérocyte via le transporteur de glucose sodium dépendent (SGLT1). Deux ions de sodium facilitent la captation du glucose en se liant avec le transporteur, et à cet effet, un gradient de sodium est maintenu par la pompe Na^+/K^+ ATPase située à la membrane baso-latérale de l'entérocyte. Le gradient électrochimique ainsi généré par le sodium fournit l'énergie permettant l'entrée du glucose. Les molécules de glucose sortent ensuite de la membrane baso-latérale de la cellule à l'aide d'un transporteur indépendant de l'ion Na^+ (GLUT2) pour pénétrer dans le système porte. De son côté, le fructose est capté par la protéine spécifique Glut5 et sort de la cellule par le transporteur Glut2 qui représente une voie commune pour le glucose et le fructose (Figure 2).

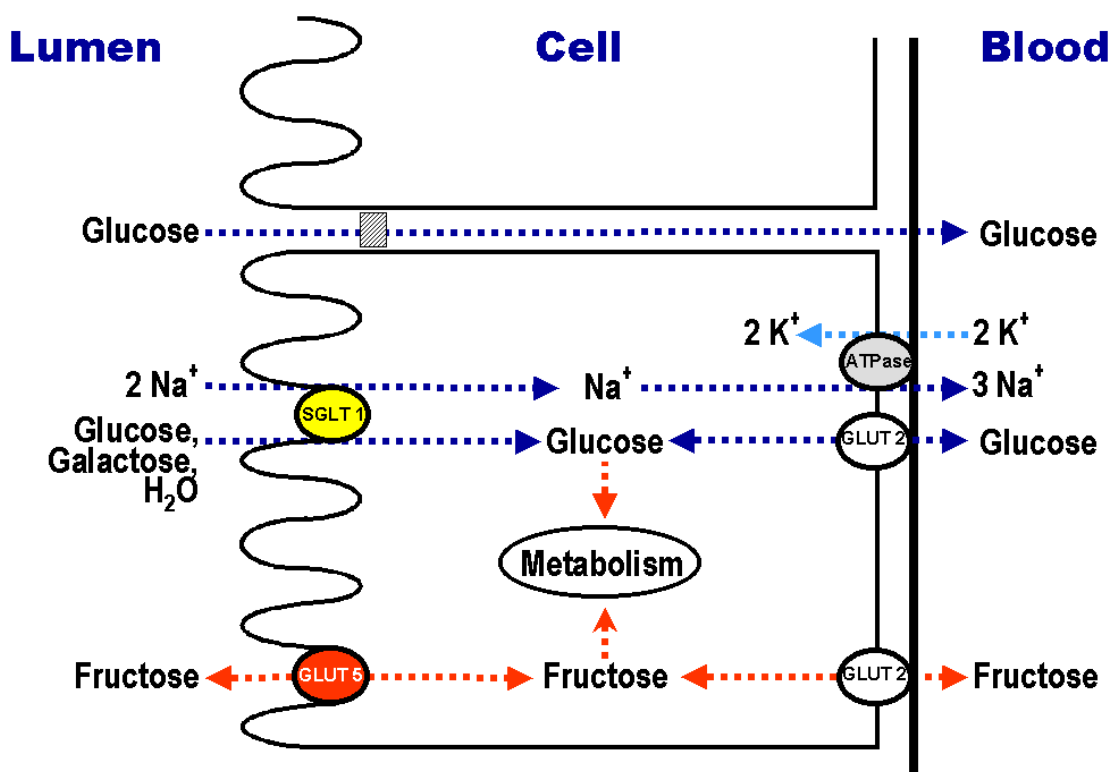


Figure 2. L'absorption intestinale du glucose (Wright, 1993).

Le modèle de l'absorption intestinale du glucose par le co-transport du glucose et du Na⁺ a été proposé pour la première fois par Crane en 1961 (Crane, 1961) et il a été confirmé par plusieurs autres études (Semenza, 1984; Wright, 1993). Ce modèle se prête adéquatement pour illustrer l'absorption intestinale du glucose dans des conditions où la concentration luminale du glucose est faible, mais il ne permet pas d'expliquer l'absorption à des concentrations élevées de glucose quand le SGLT1 est saturé (Kellet, 2005).

Il a été démontré que chez les rats diabétiques et les patients diabétiques de type 2, la capacité de l'intestin à absorber le glucose est augmentée. Ce fait est dû à une

augmentation de l'expression des transporteurs des monosaccharides SGLT1, GLUT2, et GLUT5 (Dyer, 1997; Dyer, 2002). D'autres études montrent qu'une diète riche en sucres stimule l'expression du GLUT2 (Miyamoto, 1993) et de l'enzyme sucrase-isomaltase (Kishi, 1999). Il a été également rapporté que le SGLT1 ne constitue pas la voie majeure d'absorption intestinale du glucose (Kellett, 2000). En utilisant la perfusion *ex vivo* du jéjunum de rat, des expériences ont pu démontrer que le transporteur de glucose sodium indépendant GLUT2, exprimé normalement à la membrane basolatérale, est présent dans les membranes apicales des entérocytes (Helliwell, 2000; Kellet, 2001). De plus, on constate une expression protéique considérable du GLUT2 dans les vésicules isolées de la membrane apicale de l'intestin des rats diabétiques (Kellet, 2005).

Un nouveau modèle de l'absorption intestinale du glucose en fonction de la concentration de glucose dans la lumière intestinale a été proposé (Kellet, 2001). Lorsque la concentration de glucose dans la lumière intestinale est faible, le transport actif est dominant. Il est réalisé par le SGLT1 qui est localisé à la membrane apicale des enterocytes. Ce transporteur arrive à saturation pour des concentrations luminales de glucose de 30-50mM (Debnam et Levin, 1975). Cependant, à des concentrations supérieures, le transport facilité du glucose intervient. Le transporteur impliqué est le GLUT2. Dans ce cas, le transport initial du glucose est réalisé par le SGLT1 qui entraîne une activation de la protéine kinase C β II. Cet événement est suivi par le recrutement rapide du GLUT2 du pôle baso-latéral vers le pôle apical de la cellule (Helliwell, 2000; Kellett, 2000). Dans l'entérocyte, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate avant d'entrer dans le réticulum endoplasmique où il est hydrolysé par la glucose-6-P-

ase en glucose et phosphate. Le glucose produit est libéré dans le cytosol et transporté par le GLUT2 vers la circulation sanguine. En absence de GLUT2, le glucose est libéré directement dans la circulation après la fusion de la membrane microsomale avec la membrane cellulaire (Stumpel, 2001; Habold, 2005).

1.2 Le diabète - généralités

Le diabète est une pathologie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique avec des perturbations du métabolisme glucidique, lipidique et protidique. Cette maladie est associée à l'incapacité de l'organisme à produire et/ou utiliser correctement l'insuline (American Diabetes Association 2004).

L'insuline est une hormone hypoglycémisante sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. La principale fonction de l'insuline est de maintenir la concentration sanguine du glucose à des valeurs normales. Dans ce sens, elle augmente le transport du glucose dans les cellules musculaires et les adipocytes en induisant la translocation du transporteur de glucose, GLUT4, vers la membrane. Au niveau du foie et du muscle strié, l'insuline inhibe la glycogénolyse et la gluconéogenèse, tout en stimulant la glycogénèse (Chang, 2004).

1.2.1 Classification du diabète

Le diabète peut être classifié en trois types: Diabète de type 1, Diabète de type 2 et le diabète gestationnel.

Le diabète de type 1 (dépendant de l'insuline) est appelé aussi diabète juvénile parce qu'il survient avant l'âge de 30 ans. Il représente environ 10% de tous les cas de diabète. Le diabète de type 1 se caractérise par une production insuffisante d'insuline

due à une destruction auto-immune des cellules β pancréatiques. En absence d'insuline, le glucose ne peut pas entrer dans la cellule pour produire de l'énergie ou pour être stocké sous forme de glycogène et il s'accumulera excessivement dans le sang. Les patients atteints dépendent de l'insuline exogène pour prévenir l'acidocétose et la mort.

À l'heure actuelle, le diabète de type I peut être traité par la prise d'insuline, la transplantation du pancréas et par la greffe d'îlots de Langerhans. Le traitement traditionnel du diabète de type 1 est l'administration d'insuline. Cependant, en raison de facteurs tels que coût, restrictions touchant le mode de vie et complications mettant la vie en danger, un traitement plus efficace doit être mis au point. La transplantation pancréatique et, plus récemment, la transplantation d'îlots de Langerhans purifiés, devraient être considérée comme des alternatives thérapeutiques acceptables à l'insulinothérapie continue des patients diabétiques de type 1 (ADA, 2006; Calne, 2005; Street, 2002).

Dans l'avenir, les cellules souches adultes ou cellules souches embryonnaires (CSE) seront une source prometteuse d'îlots de Langerhans pour la transplantation (Lee, 2008; Calne, 2005; Street, 2003). De nouvelles recherches sur la transplantation de cellules souches de la moelle osseuse ont permis d'établir que les cellules souches adultes peuvent déclencher le processus de régénération des tissus pancréatiques, ce qui a pour effet de restaurer la production normale d'insuline et de faire rétrocéder les symptômes du diabète (ADA, 2006; Abdi, 2008). L'utilisation de cellules souches adultes aurait l'avantage que les propres cellules du patient peuvent être utilisées,

contournant ainsi le rejet immunitaire. La possibilité que de nouvelles cellules β puissent être produites à partir de cellules souches adultes permettrait d'éviter les problèmes éthiques potentiels associés aux CSE (Wu, 2008).

Le diabète de type 2 (indépendant de insuline) survient généralement après l'âge de 30 ans mais l'incidence est actuellement en forte croissance chez les plus jeunes, spécialement dans les populations autochtones (Dannenbaum, 2008). Cette forme de diabète représente 90 à 95% de tous les cas de diabète. Le diabète de type 2 est caractérisé par une résistance à l'insuline et une diminution de la sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques associées à une prédisposition génétique.

Le diabète gestationnel est une intolérance au glucose qui se manifeste pour la première fois ou que l'on dépiste pendant la grossesse (Association canadienne du diabète, 2003). Cette forme de diabète est développée par environ 4% des femmes enceintes au cours du deuxième ou du troisième trimestre.

La présente étude vise principalement le diabète de type 2 et il est discuté en détail dans les sections suivantes.

1.2.2 Résistance à l'insuline

Comme il a été mentionné auparavant la résistance à l'insuline représente un défaut majeur dans le cas du diabète de type 2. La résistance à l'insuline se traduit par une diminution de l'effet de l'insuline sur les tissus insulino-sensibles (tissu musculaire, tissu adipeux, foie). Au début, la résistance à l'insuline est compensée par un hyperinsulinisme résultant de la surproduction de l'insuline par les cellules β pancréatiques dans le but de contenir l'hyperglycémie. L'hyperinsulinisme persistera jusqu'au moment où les cellules β pancréatiques ne seront plus capables de sécréter suffisamment d'insuline (Kahn 2003). À ce moment s'installe l'intolérance au glucose caractérisée par un taux élevé du glucose dans le sang suite à un repas, mais par des concentrations plasmatiques du glucose à jeun normales (Kahn, 2003). En fait, une diète hypercalorique associée à un manque d'exercice physique et à l'obésité peut conduire à un état de résistance à l'insuline (Kahn, 2003).

La résistance à l'insuline est considérée comme un état pré-diabétique quand le diabète de type 2 représente l'étape subséquente où la sécrétion exagérée d'insuline ne parvient plus à maintenir une glycémie normale.

1.2.3 Le diabète de type II

Le diabète de type 2 est une maladie métabolique complexe caractérisée par une hyperglycémie chronique due à une diminution de l'action ou de la sécrétion de l'insuline. Il affecte 90% des adultes atteints de diabète (ADA 2004). Le développement de cette maladie résulte d'interaction entre facteurs génétiques et environnementaux (Gerich, 1998).

La prédisposition génétique est soutenue par des études qui montrent que les enfants provenant des parents diabétiques ont 80% de risque de développer la maladie (Martin, 1992). Les facteurs génétiques sont reliés à un fonctionnement inadéquat des cellules β pancréatiques caractérisées par une diminution de leur capacité de détecter le glucose (Kahn, 1994; Light, 2002). Les mutations associées à la dysfonction de ces cellules peuvent être identifiées au niveau des gènes codant les facteurs de transcription, les protéines impliquées dans le métabolisme du glucose et les molécules de la voie de signalisation de l'insuline (Meyre, 2009). Les mutations des gènes SUR1 et Kir6.2 qui codent les canaux KATP peuvent produire l'expression de canaux KATP non fonctionnels ou dysfonctionnels dans les cellules β . Ces canaux sont un lien critique de la voie sécrétoire de l'insuline dépendante du glucose et leur pharmacologie est cliniquement importante puisqu'ils représentent la cible cellulaire de nombreux antidiabétiques (Light, 2002).

Les facteurs environnementaux sont représentés par des changements dans le style de vie tel que l'adoption d'un mode de vie sédentaire et une diète riche en gras et en sucres. Ce fait est observé de manière importante chez les populations autochtones qui ont remplacé leur comportement traditionnel par un style de vie sédentaire et une alimentation moderne riche en gras et en sucre (Harris, 1997). Il est proposé que ce changement de style de vie augmente la prévalence de l'obésité, contribuant ainsi au développement du diabète de type 2 dû en grande partie à la résistance à l'insuline (Zimmet, 1997). L'obésité est aussi associée à une diminution dans le nombre des récepteurs d'insuline dans les tissus périphériques (Saad, 1991).

1.2.4 Physiopathologie du diabète de type 2

Après un repas, l'homéostasie du glucose est maintenue par trois événements bien corrélés entre eux : 1) la stimulation de la sécrétion de l'insuline; 2) la diminution de la production du glucose hépatique sous l'action de l'insuline; et 3) la stimulation de la captation du glucose par les muscles sous l'action de l'insuline (DeFronzo, 1999).

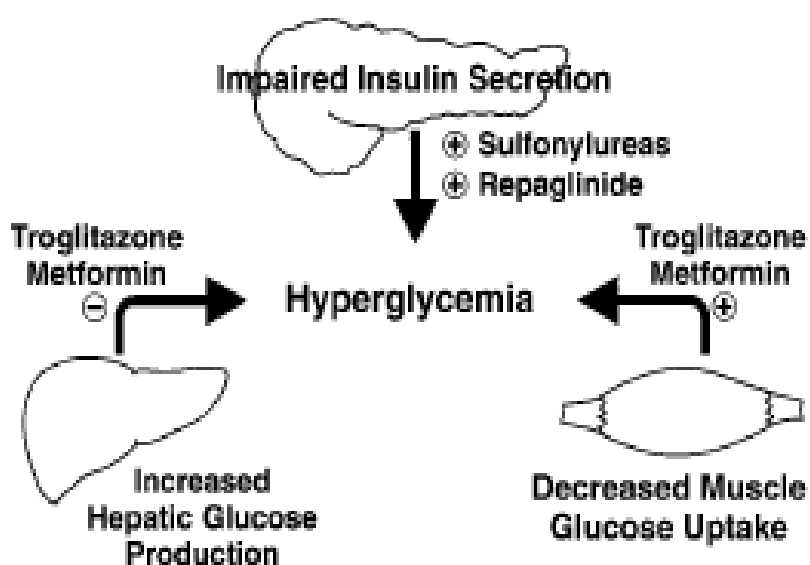


Figure 3. La pathologie du diabète de type II. Les sites d'action des antidiabétiques oraux sont indiqués. Le signe négatif indique une inhibition; un signe positif indique une stimulation. (DeFronzo 1999)

Chez les patients diabétiques, on observe une production hépatique accrue du glucose, malgré les concentrations croissantes d'insuline plasmatique. L'augmentation de la production hépatique de glucose serait principalement due à une stimulation de la gluconéogenèse (Magnusson, 1992) (Figure 3). Plusieurs études montrent que la

production excessive du glucose hépatique est un facteur déterminant de l'hyperglycémie à jeun (Groop, 1989; DeFronzo, 1989; Bodkin, 1989). Après un repas, la capacité de l'insuline endogène à stimuler la captation du glucose par les muscles est fortement diminuée (Mitrakou, 1990). Au niveau musculaire cette résistance à l'insuline peut être induite par des anomalies au niveau de la fonction du récepteur de l'insuline, du transport et de la phosphorylation du glucose, de la synthèse du glycogène et de l'oxydation du glucose (DeFronzo, 1997). Des anomalies dans la sécrétion de l'insuline surviennent lorsque les cellules β pancréatiques ne fonctionnent pas correctement. Ces aberrations jouent un rôle important dans la physiopathologie du diabète de type 2 et de l'intolérance au glucose (Polonsky, 1995). En bref, les patients diabétiques de type 2 présentent des anomalies dans la sécrétion et l'action de l'insuline (DeFronzo, 1999).

1.2.5 Diagnostic, symptômes et complications du diabète.

Une personne est diagnostiquée comme étant diabétique quand elle présente une glycémie à jeun de 126 mg/L ou 7,00 mmol/L; des symptômes du diabète (voir ici-bas) associées avec une glycémie plasmatique occasionnelle de 200 mg/dL (11,1 mmol/L); ou une glycémie de 200 mg/dL (11,1 mmol/L) 2 h après une charge de 75 g de glucose prise par voie orale (Drouin, 1999).

Il y a quelques symptômes communs associés avec le diabète, incluant la polydipsie (soif excessive), polyurie (urines abondantes), polyphagie (faim excessive), fatigue, perte de poids inhabituel, infections vaginales pour les femmes atteintes de cette maladie, irritabilité, vision floue. L'hyperglycémie chronique due au diabète endommage progressivement les petits vaisseaux sanguins des reins et des yeux ainsi

que les nerfs. Les vaisseaux s'obstruent et les organes ne sont plus assez irrigués ce qui conduit à un dysfonctionnement des différents organes. Les complications les plus fréquentes dues au diabète de type 2 sont les maladies cardiovasculaires, les maladies rénales (néphropathies), les affections neurologiques (neuropathies), les troubles oculaires (rétinopathies) et la sensibilité aux infections. Ces complications représentent la principale cause de morbidité chez les patients diabétiques (Kumar 2003).

1.2.6 Le traitement du DT2

Le traitement du diabète de type 2 inclut l'exercice physique, la diète hypocalorique, les médicaments hypoglycémiant oraux et, dans certains cas, l'administration de l'insuline exogène.

1.2.6.1 Le traitement non pharmacologique : Diète et exercice.

Dans le cas du diabète de type 2, des modifications nutritionnelles et l'éducation du patient sont importantes pour l'amélioration du contrôle glycémique (Gerich, 1998). L'adoption d'une diète hypocalorique a comme effet immédiat une diminution rapide de la glycémie due principalement à une diminution de la production hépatique du glucose. A long terme, une restriction calorique associée à une perte de poids conduit à une réduction de l'insulino-résistance des tissus insulino-sensibles (Henry, 1996).

Une diète appropriée et l'exercice physique régulier et adéquat représentent un remède universel dans le sens de la prévention du diabète (Steyn, 2004; Munter, 2007). La pratique régulière d'une activité physique augmente la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline et améliore les anomalies de la glycorégulation (Drouin, 1999;

Pan, 1997; Kriska, 1992). Le mécanisme de cette amélioration passe, au niveau du muscle strié, par une translocation vers la membrane cytoplasmique des transporteurs de glucose GLUT4, une augmentation du débit sanguin et une augmentation de la mise en réserve du glucose sous forme de glycogène par l'activation de la glycogène synthétase (Drouin, 1999).

1.2.6.2 Le traitement pharmacologique

Les sulfonylurées, les biguanides, les thiazolidinediones et les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase sont les principales classes des antidiabétiques oraux disponibles pour le traitement des patients atteints de diabète de type 2.

Les sulfonylurées stimulent la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. Elles exercent leurs effets par l'inhibition des canaux KATP des cellules β , induisant un influx de calcium et une stimulation de la sécrétion d'insuline (Light, 2002). Par conséquent, elles diminuent la production hépatique du glucose et facilitent la disposition du glucose. Pour être efficaces elles nécessitent un fonctionnement résiduel des cellules β (Lebovitz, 1992). Une complication fréquente de cette classe des médicaments est le risque d'hypoglycémie parce qu'elles stimulent la sécrétion d'insuline même quand la concentration plasmatique du glucose est basse.

Les biguanides ne modifient pas la sécrétion d'insuline ou de glucagon, mais elles augmentent l'effet ou la sensibilité à l'insuline au niveau des tissus cibles. Elles exercent leurs effets en activant la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), un régulateur clé du métabolisme énergétique (Foretz, 2006). La metformine, le seul biguanide actuellement disponible, agit en stimulant la captation du glucose par les

tissus périphériques (Lee, 1996) et en diminuant la gluconéogenèse hépatique (Perriello, 1994). Les biguanides diminuent l'absorption du glucose au niveau des cellules intestinales et augmentent la conversion du glucose en lactate par les entérocytes. La metformine a un effet bénéfique sur les lipides plasmatiques en diminuant les triglycérides et les concentrations de cholestérol total et de LDL-cholestérol et en augmentant le HDL-cholestérol (DeFronzo et Goodman, 1995; Goo, 1996). Un effet secondaire de cette classe est l'acidose lactique (Goo, 1996).

Les thiazolidinediones (TZD) est une nouvelle classe des antidiabétiques oraux représentée par le pioglitazone et la rosiglitazone. Ils agissent comme agonistes des récepteurs nucléaires PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) et diminuent la quantité d'acides gras libres plasmatiques. Ils diminuent la quantité de glucose produite par le foie et rendent les cellules adipeuses plus sensibles à l'action de l'insuline (ADA 2006; Gaborit, 2008).

Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase (acarbose et miglitol) ralentissent l'absorption intestinale des hydrates de carbone et diminuent la concentration de glucose plasmatique après le repas. Tel que mentionne auparavant les alpha-glucosidases (sucrase, maltase, isomaltase, gluco-amylase) sont des enzymes présentes à la bordure en brosse des cellules intestinales. Elles sont responsables de la digestion des oligosaccharides et disaccharides en monosaccharides afin d'être absorbés dans l'intestin et libérés dans la circulation sanguine. Les inhibiteurs des alpha-glucosidases ralentissent la digestion des sucres en changeant le site d'absorption vers la partie distale de l'intestin grêle ou vers le colon. Suite à ce processus, l'entrée du glucose dans la

circulation systémique est retardée et les cellules β pancréatiques bénéficient de suffisamment de temps pour augmenter la sécrétion d'insuline en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose dans le plasma (DeFronzo, 1999). Ils ont des effets secondaires sur le système digestif (flatulence, douleur abdominale et diarrhée) due à la fermentation des sucres non absorbés. Ces effets sont fréquents au début et le deviennent moins après quelques semaines de traitement (Ducobu, 2003).

1.2.6.2.1. Médicaments en cours de développement clinique

Plusieurs stratégies pharmacologiques sont actuellement explorées et les molécules en cours de développement clinique sont : (1) les analogues du GLP-1 résistants à la DPP-IV et (2) les inhibiteurs de la DPP-IV (Gautier, 2008).

Le *glucose-dependent insulintropic peptide* (GIP) et le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) sont des hormones peptidiques qui potentialisent l'effet du glucose sur la sécrétion d'insuline. Elles sont libérées par des cellules endocrines de l'épithélium intestinal lors du passage des nutriments. Ces hormones sont dégradées très rapidement en métabolites inactifs par la *dipeptidyl-peptidase-IV* (DPP-IV). Le GLP-1 stimule la synthèse d'insuline, inhibe la sécrétion de glucagon, ralentit la vidange gastrique et la sécrétion acide, et diminue la prise alimentaire chez l'homme. La sécrétion de GLP-1 est réduite dans les patients diabétiques de type 2. L'utilité clinique du GLP-1 est limitée à cause de sa très courte demi-vie (environ 1 minute). Des analogues de GLP-1 résistants à la DPP-IV et des inhibiteurs de la DPP-IV sont présentement en investigation (Gautier, 2008; Lamounier 2007). Les résultats des essais randomisés contrôlés contre placebo,

confirment leur efficacité sur le contrôle de l'équilibre glycémique chez les diabétiques de type 2 (Gauthier, 2008).

1.3 Le diabète dans les populations autochtones

Le diabète de type 2 montre une prévalence alarmante dans plusieurs populations autochtones (Campbell, 1994; Zimmet, 1998). Chez les Premières Nations du Canada, le diabète de type 2 est une maladie relativement récente. Dans les années 1940, le diabète était rare dans la région du Nord du Canada (West, 1978) mais au cours des dernières années, le nombre de personnes atteintes de diabète augmente d'une façon inquiétante (Montour, 1985; Young, 1990). Les populations autochtones Cris de la région orientale de la Baie James vivent en 9 communautés dans la région de la forêt boréale du Nord du Québec (Canada). Chez ces populations, la prévalence du diabète de type 2 a augmenté de 5.2% en 1989 à 17.3% en 2005. Cette prévalence est 3.5 fois plus élevée que dans le reste de la population du Québec (Dannenbaum, 2008; Légaré, 2004). Le problème est plus important chez ces populations parce que le diabète de type 2 est diagnostiqué dans les groupes d'âge de plus en plus jeunes, y compris les enfants (CMA 2000), et environ 64.3% des cas ont été diagnostiqués dans les 10 dernières années (Dannenbaum, 2008). Le surpoids et l'obésité connaissent aussi des taux élevés chez cette population, ce qui favorise le développement du diabète de type 2 (Brassard, 1993).

La diète traditionnelle chez les populations autochtones d'Amérique du Nord est riche en protéines, modérée en matières grasses et faible en glucides et en fibres (Gittelsohn, 1998). L'alimentation fournissant une quantité suffisante d'énergie et de

micronutriments est en concordance avec les exigences d'énergie nécessaires pour survivre à des basses températures et au labeur quotidien (Gittelsohn, 1998).

Les facteurs environnementaux, y compris les changements dans le mode de vie, comme l'inactivité physique et l'adoption d'un régime alimentaire de type occidental en combinaison avec une prédisposition génétique, peuvent contribuer à cette augmentation de la prévalence du diabète. De plus, les populations autochtones Cris utilisent encore leur médecine traditionnelle pour traiter certaines maladies.

Plusieurs études ont démontré l'effet anti-hyperglycémiant ou antidiabétique des plusieurs plantes médicinales (Marles, 1995; Grover, 2002). Dans certains cas, cette activité a été évaluée et confirmée à l'aide de modèles animaux (Swanston-Flatt, 1995; Vinson, 2005) et suggèrent que les plantes médicinales peuvent servir dans la recherche de nouveaux agents antidiabétiques.

1.4 Modulation de l'absorption intestinale du glucose par les polyphénols et les plantes médicinales

Les polyphénols sont des molécules largement distribuées dans les plantes et contribuent à la formation de la couleur des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils font partie de notre diète régulière. La formule structurale des polyphénols contient plusieurs groupements hydroxyles liés à un anneau aromatique. En fonction du nombre d'anneaux phénoliques et des éléments qui lient ces anneaux, ils sont classifiés en différentes classes (acides phénoliques, flavonoïdes, stilbènes et lignanes) (Manach, 2004). Les polyphénols ont un effet régulateur sur l'absorption intestinale du glucose (Johnston, 2005).

Depuis quelques années, les connaissances quant à la modulation de l'absorption intestinale et la réabsorption rénale du glucose s'intensifient. Les deux processus sont réalisés par des transporteurs de glucose dépendants du Na^+ (SGLTs). Le SGLT1 et le SGLT2 représentent des cibles potentielles dans le développement des médicaments pour normaliser la glycémie chez les patients diabétiques (Asano, 2004). Le composé le plus étudié à l'heure actuelle est la phlorizine (Ehrenkranz, 2005), un flavonoïde glucoside extrait des pommes. En 1922, il a été montré pour la première fois que le transport intestinal du glucose est diminué suite à une exposition à la phlorizine (Nakazawa, 1922) et en 1967 Alvarado démontre que cette diminution est due à une inhibition compétitive du transport du glucose dépendent du sodium à travers la membrane en brosse des entérocytes (Alvarado, 1967). Ses applications cliniques sont limitées à cause de son hydrolyse par les β glucosidases intestinales (Tsujihara, 1996; Malathi, 1969). Pour surmonter ce problème, plusieurs analogues ont été synthétisés chimiquement à partir de la phlorizine. Ces composés peuvent être administrés oralement et plusieurs d'entre eux ont un effet inhibiteur plus puissant que la phlorizine, mais leur application clinique nécessite des investigations supplémentaires (Hongu, 1998; Hongu, 1998; Tsujihara, 1999; Castaneda, 2007; Oku, 1999).

D'autres polyphénols comme ceux présents dans le thé vert (epigallocatechinegallate (EGCG) et epicatechinegallate (ECG)) diminuent le transport intestinal du glucose probablement par une inhibition compétitive du SGLT1 (Kobayashi, 2000). Dans son étude, Johnston suggère que les flavonoïdes glycosides inhibent le transport actif du glucose tandis que les aglycones inhibent le transport facilité du glucose chez les cellules intestinales Caco-2 (Johnston, 2005). D'autres

études suggèrent que les flavonoïdes inhibent le transport facilité du glucose, effectué par le transporteur GLUT2 situé à la membrane apicale des entérocytes (Song, 2002; Kwon, 2007). Il est intéressant de noter que des études récentes sur des animaux normaux et diabétiques suggèrent que le transporteur du glucose sodium indépendant (GLUT2) serait en partie responsable de l'absorption apicale du glucose dans l'intestin (Helliwell, 2000; Kellett, 2000).

Par ailleurs, plusieurs plantes médicinales sont à l'origine des médicaments modernes utilisés aujourd'hui. Parmi ces derniers, la metformine a été dérivé à partir d'une plante appelée *Galega officinalis*, qui était beaucoup utilisée traditionnellement dans le traitement du diabète (Bailey, 1996).

Les plantes médicinales jouent un rôle important dans la prévention et le traitement du diabète de type 2, spécialement dans les pays en voie de développement où les ressources sont faibles et les assurances médicales sont limitées (Garg M. and Garg C., 2008). En plus, les Cris de la Baie James (Eeyou Istchee), comme la majorité des populations autochtones, trouvent la médecine moderne mal adaptée à leur culture et se tournent vers la médecine traditionnelle pour traiter leur maladie, malgré la disponibilité de plusieurs médicaments pour le traitement du diabète.

Tel que mentionné auparavant, 17 plantes provenant de la pharmacopée Cris ont été identifiées suite à des études ethnobotaniques. Ces plantes sont utilisées par les populations autochtones Cris pour traiter les symptômes et les complications du diabète. Deux études de criblage montrent que la moitié de ces plantes augment la captation basale de glucose chez les cellules musculaires squelettiques (Spor, 2006; Harbilas, 2009).

Le nom des 17 plantes et leur composition phénolique sont résumées dans le tableau II, adapté de Spoor, 2006, Harbilas, 2009.

Tableau II. Composition phénolique des 17 plantes étudiées.

Plante	Composés phénoliques identifiés
<i>A. balsamea</i>	Acide p-coumarique, gallocatéchines
<i>A. incana</i>	Catéchines
<i>G. hispidula</i>	Acide chlorogénique, catéchines, taxifolin, myricétine et quercétine glycosides
<i>J. communis</i>	Catéchines, kaempférol et quercétine glycosides
<i>K. angustifolia</i>	Catéchines, procyanidine A, quercétine glycosides
<i>L. laricina</i>	Taxifoline, hydroxystilbenes
<i>L. clavatum</i>	Dérivés de l'acide férulique, dérivés d'apigénine
<i>P. glauca</i>	Hydroxystilbènes, kaempférol, quercétine et rhamnétine glycosides
<i>P. mariana</i>	Acide p-coumarique, hydroxystilbènes
<i>P. banksiana</i>	Taxifoline, catéchines, procyanidines
<i>P. balsamifera</i>	Salicine, salicortines, salireposide, populosides
<i>R. groenlandicum</i>	Acide chlorogénique, catéchines, procyanidines et quercétine glycosides
<i>R. tomentosum</i>	Acide chlorogénique, catéchines, taxifolin et quercétine glycosides
<i>S. planifolia</i>	Salicine, dérivés de l'isosaliréposide, tremulacine
<i>S. purpurea</i>	Taxifoline, flavonol glycosides (quercétine, kaempférol, myricétine)
<i>S. decora</i>	Quercétine et quercétine glycosides
<i>V. vitis-idaea</i>	Dérivés de l'acide p-coumarique, catéchine, cyanidine et quercétine glycosides

Comme on peut observer dans ce tableau, les plantes sont riches en composés phénoliques, plus précisément : acides phénoliques (acide chlorogénique, acide férulique, acide coumarique), flavonoïdes (quercétine, kaempférol, catéchine) et stilbènes (hydroxystilbènes).

1.5 Objectif de l'étude.

La présente étude fait partie d'un grand projet d'équipe qui vise à identifier des traitements efficaces pour le diabète de type 2 et l'obésité, issus de la médecine traditionnelle. Comme il a été mentionné, ces problèmes de santé et leurs complications sont largement répandus chez les populations autochtones canadiennes, incluant les Cris de la Baie James. Par conséquent, le but de cette étude est d'apporter une contribution à la validation de l'usage de ces espèces de plantes dans le traitement du diabète. Les 17 extraits de plantes ont été étudiés et on a prouvé *in vitro* qu'elles ont des effets prometteurs sur la réponse à l'insuline, mais l'effet sur l'absorption intestinale de glucose n'a pas été étudié, ce qui fera l'objet du présent projet. Plus spécifiquement, il s'agit de tester l'hypothèse selon laquelle certaines plantes Cri pourraient inhiber l'absorption intestinale du glucose, une activité anti-hyperglycémique et anti-obésité sous-estimée.

Afin de répondre à cet objectif, les cellules Caco2-15 ont été utilisées pour étudier l'absorption du glucose. Les cellules Caco2 représentent le modèle le plus commun utilisé pour évaluer l'absorption intestinale *in vitro*. Les lignées Caco-2 et Caco-2/15, un clone dérivé de la lignée parentale, ont été isolées d'un adénocarcinome colique humain qui développe plusieurs caractéristiques des entérocytes matures *in vivo* (Fogh, 1977). Elles se différencient spontanément et, à confluence, forment une monocouche de cellules polarisées avec des jonctions serrées et une bordure en brosse typique des entérocytes, exprimant les hydrolases qui y sont associées (saccharase-isomaltase (SI) et aminopeptidase N) ainsi que des gènes du métabolisme glucidique et

lipidique (Delie, 1997). L'effet des 17 extraits de plantes sur l'absorption de glucose dans les cellules Caco-2/15 sera évalué. Par la suite 4 extraits de plantes choisis en fonction de leur efficacité démontrée dans les expériences *in vitro* seront testés *in vivo* chez des animaux normaux. Finalement, l'effet de 3 extraits sur l'expression protéique des transporteurs de glucose SGLT1 et GLUT2 sera vérifié.

Rôle de chaque co-auteur dans cet article

Cet article est en préparation et est présentement dans le processus d'évaluation par les communautés Cris dicté par l'entente de recherche de l'Équipe des IRSC dans laquelle s'inscrit ce travail. Les travaux expérimentaux, l'analyse des données et la rédaction de l'article ont été effectués par Lidia A. Nistor Baldea. Dr. Louis Martineau a participé à l'élaboration des protocoles et à l'interprétation des données. Dr. Ali Benhaddou-Andaloussi a contribué aux expériences *in vivo*. Dr. John T. Arnason a contribué à la préparation des extraits de plantes. Dr. Pierre S. Haddad est mon directeur de recherche. Dr. Émile Lévy est mon co-directeur de recherche. Les deux directeurs ont participé à l'élaboration des protocoles, à l'interprétation des données et à la révision de l'article.

2. Article

Title:

INHIBITION OF INTESTINAL GLUCOSE ABSORPTION BY ANTIDIABETIC
MEDICINAL PLANTS DERIVED FROM THE JAMES BAY CREE TRADITIONAL
PHARMACOPEIA

Authors:

Lidia A. Nistor Baldea (1,2,3), Louis C. Martineau (1,2), Ali Benhaddou-Andalousi
(1,2), John T. Arnason (2,4), Émile Lévy (3), Pierre S. Haddad (1,2,3).

Affiliations

- 1) Natural Health Products and Metabolic Diseases Laboratory, Department of Pharmacology, Université de Montréal;
- 2) CIHR Team in Aboriginal Anti-Diabetic Medicines;
- 3) CHU-ME Research Center, Ste-Justine Childrens' Hospital, Montreal;
- 4) Department of Biology, University of Ottawa.

Corresponding author:

Pierre S. Haddad, Ph.D., Department of Pharmacology, Université de Montréal, P.O.
Box 6128, Downtown Station, Montreal (Quebec), Canada, H3C 3J7. Tel.: +1-514-343-
6590; Fax: +1-514-343-2291.

Abstract:

Type II diabetes and obesity are major health problems worldwide and aboriginal peoples are particularly at risk. To address this problem in Canadian native populations who find modern pharmaceuticals culturally inappropriate, our team is testing the traditional pharmacopeia of the James Bay Cree for anti-diabetic and anti-obesity activities. The present study tested for inhibition of intestinal glucose absorption, an under-appreciated anti-hyperglycaemic and anti-obesity activity. Crude ethanol extracts of seventeen Boreal forest medicinal plants were tested in the Caco-2 human enterocytic cell line and compared to the competitive inhibitors phloridzin and phloretin; polyphenols that share many structural characteristics with components of several Cree plants. Thirteen of seventeen extracts were observed to significantly inhibit uptake when administered simultaneously with ³H-deoxyglucose. Inhibition was dose-dependent and, in a few cases, even surpassed that induced by a combination of the positive controls. Selected plant extracts were administered in vivo by intragastric gavage at 250 mg/kg to normal rats simultaneously with a 3 g/kg bolus of glucose. For two such extracts, this resulted in a decrease in peak glycaemia by approximately 40%. Similarly, only 2 extracts reduced glucose transport after long term incubation and this could be related to reductions in the expression of SGLT-1 or GLUT-2 proteins. These findings indicate that competitive inhibition of intestinal glucose uptake can be achieved by crude extracts of medicinal plants. Such extracts could be taken with meals to control post-prandial glycaemia and reduce caloric intake in high risk populations that are positively inclined towards traditional medicine.

Keywords: Type 2 diabetes, glucose transport, SGLT1, GLUT2, Caco-2/15 cells, medicinal plants, aboriginal populations, natural health products.

Introduction

Type II diabetes has become a major health problem in both developed and developing countries (Li, 2006). The problem shows an increasing incidence in aboriginal populations, such as the Cree of Eeyou Istchee (CEI - James Bay area of Northern Quebec, Canada), probably due to a genetic predisposition (Zimmet, 1998) and to environmental factors like excessive energy intake and physical inactivity (Campbell, 1994).

Moreover chronic hyperglycemia of diabetes leads to glucose toxicity and causes a number of complications like retinopathy, nephropathy, neuropathy and peripheral vascular insufficiencies (Bonadonna 2004; Haffner, 2003; Porte, 1996). These complications have a higher incidence rate in the CEI populations (Thouez, 1990) due, in part, to the cultural inadequacy of modern therapies (Young, 2000).

Scientific data supports the antihyperglycemic or anti-diabetic effect of several medicinal plants worldwide (Grover 2002, Marles and Farnsworth 1995). For some species, activity has been evaluated and confirmed in animal models (Swanston-Flatt, 1995; Vinson and Zhang 2005) and suggest that herbal remedies could serve in the search for new anti-diabetic agents or represent culturally relevant complementary and alternative treatments. Seventeen (17) plant species used by the CEI to treat symptoms of diabetes were recently identified by our team using a novel ethnobotanical approach (Leduc, 2006; Harbilas 2009). Two *in vitro* screening studies revealed that most selected species exhibited some form of anti-diabetic activity in insulin-responsive cell lines (Spoor, 2006; Harbilas, 2009). This bioassay screening platform did not, however, evaluate whether the Cree plant extracts could regulate intestinal glucose absorption.

This is pertinent because any resulting reduction in the postprandial glucose level could prevent or delay the development of diabetes or diabetic complications.

Dietary carbohydrates are digested by pancreatic enzymes and the brush border hydrolases such as sucrase and maltase and hence cleaved into monosaccharides before they can be absorbed. Glucose resulting from the digestive process cannot penetrate the lipidic intestinal cell membrane and specific transporters are required. The Na⁺-dependent glucose transporter (SGLT1) located at the brush border membrane (BBM) mediates the uptake of glucose into the cell against its concentration gradient. The facilitative transporter GLUT2 transports sugars across the basolateral membrane to the blood (Drozdowski, 2006). Recent studies suggest that GLUT2 can also be recruited to the BBM in the presence of glucose in the lumen (Kellett, 2000) and can participate in the glucose absorption process (Kellett, 2005).

Many studies suggest that polyphenols like phloridzine, phloretin, or quercetin, decrease intestinal glucose absorption (Johnston, 2005; Kwon, 2007; Newey, 1959). Phloridzine, a flavonoid glycoside specific to apples, is known to be a competitive inhibitor of Na⁺-dependent glucose transport across the BBM (Newey, 1959; Ehrenkranz, 2005). Phloretin is the aglycone of phloridzine and an inhibitor of intestinal glucose transport mediated by GLUT2 (Drozdowski, 2006). Another natural product, quercetin was reported to act as an inhibitor of apical facilitated glucose transporter 2 (GLUT2) (Kwon, 2007; Song, 2002). It is known that the Cree plants contain polyphenols with a structure similar to phlorizine (Harbilas, 2009; Spoor, 2006) and we hypothesized that plants may act in a similar manner.

We selected Caco-2/15 cells derived from human colon adenocarcinoma for intestinal absorption studies because these cells express the morphological characteristics and most of the functional properties of differentiated small-intestinal enterocytes (Mahraoui, 1994; Delie, 1997). Since these cells express both the Na⁺ dependent glucose cotransporter and the facilitative glucose transporter GLUT2 (Mahraoui, 1994), we have used them to screen Cree plant extracts for their inhibitory activity on intestinal glucose transport. Certain plant extracts were also tested in normal Wistar rats using an oral glucose tolerance test (OGTT). Finally, we have also determined the effect of selected plants on Glut2 and SGLT1 protein content in CaCo-2 cells.

Materials and methods

Plant materials

The 17 medicinal plant species used in this study are listed in Table 1. Several samples of each specimen were collected in the regions of Mistissini and Whapmagoostui in Northern Quebec, Canada, as previously described (Spoor 2006, Harbilas 2009). Species were identified by a plant taxonomist (Dr. Alain Cuerrier) and voucher specimens were deposited at the Marie-Victorin Herbarium of the Montreal Botanical Garden, Montreal, QC. Plant material was extracted at the University of Ottawa. Material from each species was dried in a fruit dryer at 35 °C, cleaned, and ground using a Wiley Mill with a mesh size of 2 mm. Ground material was extracted twice for 24 h in 80 % ethanol (10 ml per g dry material) on a mechanical shaker at ambient temperature and then filtered through Whatman #1 paper. The supernatants of first and second extractions were pooled, evaporated to dryness in a rotary evaporator (RE500; Yamamoto Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan) with a water bath temperature of 40 °C, and lyophilized in a Super Modulyo freeze dryer (Thermo Fisher, Ottawa, ON) to produce a crude ethanol extract (referred to as crude extract from this point on). Dried crude extracts were preserved at 4 °C in a dessicator and protected from light until further use. Extracts were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich, Oakville, ON) at 1000 x their final working concentration, filter sterilized, aliquoted, and stored at -20 °C. On the day of an experiment, an aliquot was thawed and diluted in culture medium at 1:1000. Phytochemical characterization of the extracts, including determination of total concentration of phenolics and identification and quantification of marker compounds, has been described previously (Spoor 2006; Harbilas 2009).

Cell culture

Stock cultures of Caco-2/15 cells (ATCC, Rockville, MD) were grown at 37°C in an atmosphere of 95% air, 5% CO₂ in minimal essential medium (MEM) (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) (Flow, McLean, VA), 1% nonessential amino acids and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Grand Island, NY). The cells were cultured in plastic flasks (75-cm²) (Corning Glass Works, Corning, NY) until 90% confluence, when they were detached from the flasks by treatment with 0.05% trypsin-0.5 mM EDTA (GIBCO-BRL).

For transepithelial electrical resistance (TEER) and cytotoxicity assays, cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/well on 24-mm polyester Transwell filter inserts with 0.4- μ m pores (Costar, Cambridge, MA), in MEM supplemented with 5% FBS and grown for 21 days. For uptake studies the cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/ml in 12 well plates (Falcon) in the same conditions as above. The culture medium was renewed twice a week. TEER, an index of cell confluence and tight junction formation, was measured using a Millicel-ERS electrode (Millipore, Bedford, MA) before and 6 hours after treatment with plant extracts.

Cytotoxicity LDH assay

Lactate dehydrogenase (LDH) tests were performed to investigate the possible reduction of viability of Caco-2 cells following treatments with plant extracts. LDH is a stable cytoplasmic enzyme that is rapidly released into the extracellular fluid upon damage of the plasma membrane. LDH activity was determined using the Cytotoxicity

Detection Kit (Roche Applied Science, Germany). Cells attached to the bottom of plate wells were placed in serum-free medium and incubated with vehicle (0.1% DMSO), and plant extracts at 100 µg/ml in serum-free medium for 10 min., or vehicle and plant extracts at 100; 50; 25; 12,5 µg/ml in serum-free medium for 6 hours. The medium was collected and cells lysed with 500µl of 1% triton X-100 solution prepared in PBS (Gibco, Grand Island, NY) and sonicated. 100µl of media or lysate were collected, placed in a 96 well plate and incubated with the same volume of the reaction mixture from the kit. The plate was then read in a spectrophotometer at 490nm and LDH activity in media and lysate reported in arbitrary fluorescence units. Total LDH activity was determined by adding fluorescence values in media and lysate after adjustment for background fluorescence in 100µl serum-free media or triton X-100 lysis solution respectively. The cellular damage was calculated as a percentage obtained from the ratio of the LDH released (media fluorescence) compared with total LDH (media plus lysate fluorescence). The viability of Caco-2 cells was calculated to be >90% for all plant extracts. Hence, none of the studied extract showed any immediate toxicity. Final working concentrations of extracts selected after 6h of treatment are listed in table1. Final DMSO concentration was 0.1 % in all experiments.

Glucose uptake by Caco-2 cell monolayers

The uptake studies were performed using Caco-2 cell monolayers attached to the bottom of 12-well plates. 24 h prior to the treatment, the cells were placed in serum-free medium. The cells were rinsed twice with warm uptake buffer (pH 7.4) containing (in mmol/l) 137 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 4 glutamine, 10

HEPES and 0.1mg/ml bovine serum albumin (Bissonnette, 1996). The uptake studies were initiated by the addition of 1 ml uptake buffer containing plant extracts or controls and 0.5 $\mu\text{Ci/mL}$ 2-deoxy-D-(1- ^3H)-glucose (TRK-383, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Que.), for exactly 10 min at 37 °C. Inhibitors of glucose absorption Cytochalasin B (10 μM ; Sigma), Phlorizin (100 μM ; Sigma) and Phloretin (100 μM ; Sigma)(Johnston, 2005) were first tested. A combination of phloretin and phlorizin was used as positive controls giving optimal inhibition of glucose transport.

For chronic experiments, the cells were pre-incubated with vehicle, extracts or positive control solubilised in vehicle for 6 hours. The treatment was performed in serum-free medium. Following this incubation period, the cells were rinsed twice with warm uptake buffer and incubated for 10 min at 37 °C in 1ml uptake buffer containing 0.5 $\mu\text{Ci/mL}$ 2-deoxy-D-(1- ^3H)-glucose in the presence or absence of extracts. Cells were then placed on ice and rapidly rinsed three times in ice-cold uptake buffer containing 0.5mmol/l D-glucose. Cells were lysed in 500 μl of lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton-X-100, 0.1% SDS, 0.5% sodium desoxycholate) supplemented immediately before use with 10 $\mu\text{l/ml}$ pepstatine A, 10 $\mu\text{l/ml}$ leupeptine, 10 $\mu\text{l/ml}$ PMSF. Cells were lysed on ice, and were then scraped, vortexed, and sonicated. 50 μl of lysate was added to 10 mL of liquid scintillation cocktail (Ready-Gel 586601; Beckman Coulter Inc., Fullerton, Calif.), and incorporated radioactivity was measured in a scintillation counter (Beckman no. LS5000 TD, ON, Canada). The remainder was used for protein determination. Protein concentrations were

determined as described by Bradford (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard.

Oral glucose tolerance test (OGTT)

Male Wistar rats weighing 200-280 g were obtained from Charles River (St. Constant, Québec). Animals were housed two by cage with free access to standard laboratory diet and water. After overnight fasting the animals were randomly divided into groups and an oral glucose tolerance test was performed. Glucose (3g/Kg body weight) was administered by intragastric gavage 5 minutes after oral administration of 250 mg/kg of the respective plant extract in DMSO: H₂O (1:1) solution. Animals in the control group received DMSO: H₂O (1:1) solution as the solvent control. Blood glucose was assessed before the glucose administration and at 10, 20, 30, 40, 50, 90, 120 minutes via the tail vein with a glucometer. Glycemic responses to OGTT were calculated from areas under the curve (AUC) of glycemia over the first 30, 50 and 120 minutes of observation. Animals were treated in accordance with the guidelines of the Canadian Council for the Care and Protection of Animals. All experimental protocols involving animals were approved by the Université de Montréal Animal Ethics and Experimentation Committee.

Western blot analysis

Human Caco2 cells were cultured in 6-well plates at a density of 1×10^6 cells/well and they were left to undergo differentiation for 21 days. The cells were

placed in serum-free medium 24 h prior to the treatment. After 6 hours of incubation with plant extract, plates were placed on ice and immediately washed three times in ice-cold PBS and lysed in 250 μ l of lysis buffer (M-Per Mammalian Protein Extraction Reagent from Thermo Scientific) containing a commercial cocktail of protease inhibitors (Roche). Cells were allowed to lyse on ice, and were then scraped, vortexed, and sonicated before being stored at -80 °C until further analysis. Protein concentrations were determined as described by Bradford (Bradford MM, 1976) using bovine serum albumin as standard. Proteins were denatured in sample buffer containing SDS and β -mercaptoethanol, separated on an 8.75% SDS-PAGE gel, and blotted onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 1 h at room temperature with 5 % defatted milk proteins in Tris-buffered saline (20 mM Tris-HCl, pH 7.6 and 137 mM NaCl) containing 0.1 % Tween 20 (TBST). Membranes were then incubated overnight at 4 °C in blocking buffer with anti-human antibodies for GLUT2 (Santa Cruz), SGLT1 (Alpha Diagnostic) and β -actin (Sigma). Membranes were washed with TBST and incubated 60 min at room temperature in TBST with appropriate secondary antibodies. Revelation was performed using the enhanced chemiluminescence reagent and blue-light-sensitive film (Amersham Biosciences). Densitometric analysis of films was performed using Hewlett-Packard scanner equipped with a transparency adaptor and UN-SCAN-IT (Silk Scientific Corporation) software. Experiments were repeated on 3 different passages of cells.

Results

Phlorizin, Phloretin and cytochalasin B modulate glucose uptake activity in Caco 2/15 cells.

Radiolabelled 2-Deoxyglucose was used to study glucose uptake in Caco-2 cells. The effect of phlorizin, phloretin and cytochalasin B on glucose uptake in human Caco-2 cells was first studied. As shown in figure 1, phlorizin decreased glucose uptake by 25%, while phloretin and cytochalasin B exerted 60-70% of inhibition. The effect of phlorizin and phloretin in combination was about 75% and this was chosen as the positive control for inhibition of intestinal glucose transport.

Cellular damage

The LDH cytotoxicity assay showed that, at a dose of 100µg/ml, none of the studied extracts showed any toxicity over a 10 min incubation period. For longer term incubations (see below), the maximal non-toxic concentration of each extract was determined using LDH release and TEER. These optimal concentrations are shown in Table 1 and plant extracts at these concentrations did not cause problems in monolayer integrity (transepithelial electrical resistance TEER). The transwell inserts with a resistance exceeding a blank membrane by 400 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ were utilized in the experiments. Prior to the onset of experiments, TEER values ranged between 830-970 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ and

after 6 hours of treatment TEER values between 733-920 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ were measured (data not illustrated).

Acute effects of plant extracts on glucose absorption in Caco 2/15 cells.

To investigate the acute inhibitory effects of medicinal plant extracts on glucose uptake, cells were co-incubated with plant extract at three different concentrations (25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and the radioactive tracer for 10 minutes. As shown in Figure 2 (Panels A and B), thirteen of the seventeen extracts significantly inhibited intestinal glucose absorption in a dose-dependent manner and at all doses tested. Generally, glucose uptake was reduced by more than 40%. The inhibitory effect of seven extracts (*J. communis*, *K. angustifolia*, *L. clavatum*, *P. glauca*, *R. tomentosum*, *S. purpurea*, *V. vitis*) surpassed that induced by the combination of positive controls (75%).

Oral glucose tolerance test (OGTT)

To validate the acute inhibitory effects in-vivo, we selected four plant extracts and assessed their impact in an Oral glucose tolerance test; *R. tomentosum* and *V. vitis*, represented powerful inhibitory plants; *P. banksiana*, represented plants having a more modest inhibitory effect; and *P. mariana*, represented plants having no statistically significant impact on intestinal glucose transport. The positive control Phlorizin was also tested. The results of such OGTT in normal Wistar rats are shown in Figure 3 (Panels A and B). Administration of a single dose (250 mg/Kg) of *R. tomentosum*, *P.*

mariana and 100 mg/Kg Phlorizin five minutes before an oral bolus of glucose (3g/Kg) significantly reduced the AUC of blood glucose levels compared with vehicle control in the periods 0-30 min, 0-50 min, 0-120 min after glucose administration (Table 2). *P. banksiana* and *V. vitis* showed no significant effect on oral glucose tolerance test as compared with vehicle control.

Effects of 6h pre-incubation with plant extracts on glucose absorption in Caco-2/15 cells.

Because different antidiabetic effects of plant extracts have previously been observed upon short and long term incubation (Spoor, 2006; Harbilas, 2009), we also assessed the effects of the 17 plant extracts on Caco-2 cells after longer term treatment. For this study, cells were pre-incubated with plant extract, at the maximal non toxic concentration (Table 1), for 6 hours prior to the onset of the glucose uptake assay. Figure 4 shows that five extracts (*L. clavatum*, *P. mariana*, *R. tomentosum*, *S. purpurea*, *S. decora*) significantly decreased glucose absorption in Caco2/15 cells by 25 to 50% in such experimental conditions. Of these five extracts, four were among plants exhibiting an acute inhibitory effect on glucose absorption (Figure 2). One of them, *P. mariana* exerted an inhibitory effect only after 6 h of pre-treatment.

Effects of pre-incubation followed by co-incubation of cells with plant extracts and ³H 2-deoxy-glucose

Because plant extracts had been removed prior to the glucose uptake assay in the long term experiments just described, we sought to determine if their absence may have prevented proper assessment of their inhibitory potential. Three plant extracts

representing strong, medium and weak inhibitory potential in the acute glucose transport test, respectively *R. tomentosum*, *P. banksiana* and *P. mariana*, were tested for their acute, chronic or combined effects on glucose uptake activity. The cells were pre-incubated for 6h with plant extracts followed by 10 minutes of co-incubation with radioactive tracer in the presence or absence of plant extracts. As illustrated in Figure 5 and reported in Table 1, *R. tomentosum* reduced glucose absorption in the cells by 37% after 6h of pre-incubation, but the effect was amplified if the plant extract was also present during the glucose transport assay (88%). Conversely, *P. mariana* reduced glucose absorption by 69% after 6h of pre-incubation and co-incubation during glucose uptake failed to exert any additional effect. *P. banksiana*, on the other hand, did not significantly reduce glucose absorption in either case.

Modulation of protein expression of SGLT1 and GLUT2 by selected plant extracts

Caco2 cells are known to express many glucose transporters including SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3, and GLUT5 (Mahraoui, 1994). Because SGLT1 and GLUT2 are the most prominent transporters involved in vectorial glucose transport across the intestine (Wright, 2004), we analysed their protein expression in Caco-2/15 cells. In this clone, we found SGLT1 to be localized in apical membranes, whereas GLUT2 protein was observed in both the apical and basolateral membranes (results not shown). The effect of *P. mariana* and *R. tomentosum* on glucose uptake after 6h of pre-incubation suggested that these extracts may exert their effect through modulating the expression of glucose transporters. The results shown in figure 6 demonstrate that *R. tomentosum* was able to significantly reduce the protein expression of SGLT1, whereas *P. mariana*

reduced that of GLUT2. The combination of positive controls, Phloridzin and Phloretin, did not modulate the expression of either glucose transporters.

Discussion

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) and obesity are disorders caused by a combination of genetic predisposition and environmental factors (Hamman, 1992) with an increased prevalence in aboriginal populations (Zimmet, 1998; Campbell, 1994). Environmental factors including changes in lifestyle like physical inactivity and adopting a Western-type diet contribute to developing type 2 diabetes or diabetes complications. In the Western-type diet, glucose is present in a large proportion (Dyer, 2002) and contributes to the increase in postprandial glycemia. Chronic hyperglycemia in T2DM is associated with an increase of glycosylation products and the generation of oxidative stress that leads to vascular complications (Ceriello, 2005). These complications are increased in aboriginal populations due to an inadequate control of hyperglycemia as a consequence of the cultural inadequacy of modern therapies (Young, 2000).

To address this problem in Canadian native populations and in concordance with ethnobotanical studies, our team is testing the traditional pharmacopeia of the James Bay Cree for anti-diabetic and anti-obesity activities. Ethnobotanical surveys, carried out with the precious collaboration of Elders and healers of CEI, indicated that several medicinal plants are used by this population to treat the symptoms associated with diabetes (Leduc, 2006; Fraser, 2007; Harbilas, 2009). Two *in vitro* screening studies, based principally on cellular bioassays, revealed that most selected species exhibited some form of anti-diabetic activity in insulin-responsive cell lines (Spoor, 2006; Harbilas, 2009). The action of these plants on the intestinal glucose absorption was not

studied, yet it represents an important component in the fight against T2DM. Indeed, a better understanding of the mechanisms involved in the intestinal absorption of monosaccharides may contribute to a better management of the disease (Dyer, 2002).

Dietary carbohydrates are broken down into monosaccharides in the gut through the action of pancreatic enzymes and intestinal brush border hydrolases, such as sucrase and maltase, before they can be absorbed. D-Glucose, resulting from the digestive process, is transported across the BBM by the Na⁺-dependent glucose transporter (SGLT1). The facilitative transporter GLUT2 transports sugars accumulated in the enterocytes across the basolateral membrane to the blood (Drozdowski, 2006). The capacity of the small intestine to absorb D-glucose increases in patients with type 2 diabetes and in rats with experimentally induced diabetes (Dyer, 2002). This is a consequence of the increase in the expression of monosaccharide transporters SGLT1 and GLUT2 (Dyer, 1997; Fedorak, 1991). Recent studies also propose an increase in levels of the luminal GLUT2 and the recruitment of GLUT2 to the BBM of rat jejunum after a sugar rich meal, where it can participate in glucose absorption in addition to SGLT1 (Kellet, 2005; Helliwell, 2000).

Several inhibitors of α -amylase or β -glucosidase were proposed as a way to control postprandial hyperglycemia, but they are not able to prevent glucose absorption when glucose itself has been ingested in a large proportion (Hanamura, 2006). Hence, the direct inhibition of intestinal glucose absorption could represent a novel mechanism for an antidiabetic drug.

The present study investigated the potential of seventeen Boreal forest medicinal plants (stemming from CEI traditional pharmacopeia and used to treat symptoms of T2DM; Leduc, 2006; Fraser, 2007; Harbilas, 2009) to decrease the intestinal glucose absorption by using Caco-2/15 cells. The clone used in our study expresses SGLT1 in apical membranes and GLUT2 in both apical and basolateral membranes (results not shown). Our results show that thirteen extracts exhibit significant inhibitory actions on glucose uptake, when administered simultaneously with ^3H - deoxyglucose and seven of them even surpass the effect of the combination of positive controls, phlorizin and phloretin. The appreciable instantaneous inhibition of glucose absorption by medicinal Cree plants argues for their beneficial potential if used during/with meals.

Flavonoids glucosides like phloridzine can be hydrolysed by the enzymes located in the BBM (Ioku, 1998; Day, 2000). Glucose, potentially liberated after an enzymic or spontaneous hydrolysis, could have been responsible for the observed inhibitory effect in the Caco-2 cells. In contrast to phloridzine, which can be hydrolyzed by glucosidase, other phenolic compounds are absorbed and found in the blood as intact glycosides (Meezan, 2005).

This observation warrants further investigations to identify active molecules contained in the active plant extracts and to determinate their mechanisms of action.

Four plant extracts representing strong, medium and weak inhibitory potential, respectively *R. tomentosum* and *V. vitis*, *P. banksiana* and *P. mariana*, were further tested in normal Wistar rats subjected to an OGTT. OGTT using normoglycemic rats is a simple test used to screen the capacity of substances to interfere with glucose

homeostasis but it does not give any indication on their mechanism of action (Verspohl, 2002). After an oral ingestion of glucose, the maintenance of glucose tolerance depends on insulin secretion, hepatic glucose production, the glucose absorption rate in the digestive tract and the glucose uptake by peripheral tissues (Ndong, 2007). We found that two extracts significantly decreased the area under the curve of blood glucose levels compared with vehicle control (*R. tomentosum*, *P. mariana*). In contrast with the strong instantaneous inhibitory effect found *in vitro*, *V. vitis* had no effect in this test as compared with the vehicle control. Conversely, *P. mariana* extract was without effect *in vitro*, yet significantly reduced the AUC of an OGTT *in vivo*. A possible explanation for the differences in these observations is the differences in the ratio of test substance to substrate in each experimental setting. *In vitro*, the ratio of test substance to substrate (radiolabelled glucose) was 1000:1, whereas *in vivo* the ratio was 1:1000 (extract to glucose bolus). Further studies are necessary to elucidate the mechanism of action of the plant extracts in *in vitro* and *in vivo* experimental models.

We also assessed the effects of plant extracts in longer term incubations since our previous screening studies demonstrated different actions in short and long term treatments (Spor, 2006; Harbilas, 2009). Five extracts, namely *L. clavatum*, *R. tomentosum*, *S. purpurea*, *S. decora* and *P. mariana*, significantly decreased glucose absorption in Caco-2/15 cells after 6h pre-incubation. The first four plants were also active in the instantaneous inhibitory test of intestinal glucose absorption. As for the OGTT studies mentioned above, *P. mariana* was found to exert its effect after 6h of treatment and the concurrent administration with radioactive tracer after the 6h treatment period was without effect; in agreement with its lack of instantaneous effect

on intestinal glucose absorption. The plant extract was further found to be the only one tested to significantly reduce the protein expression of GLUT2 in CaCo2/15 cells. *P. mariana* therefore warrants further study to clearly assess its usefulness as a potential oral hypoglycaemic.

R. tomentosum was another interesting plant extract since it was one of the most potent instantaneous inhibitors of CaCo2/15 cell glucose absorption, yet only mildly inhibited the same after 6h incubation. However, if the plant extract was allowed to also be present during the subsequent glucose uptake assay, inhibition was significantly amplified. Finally, *R. tomentosum* was the only plant extract tested found to decrease SGLT1 protein expression. It is interesting to note that *R. tomentosum* was the top plant in the ethnobotanical ranking of antidiabetic potential based on a set of 15 symptoms (Harbilas, 2009). With potent inhibitory activity against intestinal glucose absorption both *in vitro* and *in vivo*, *R. tomentosum* represents one of the most promising plant extracts to assess further for oral hypoglycaemic potential in CEI populations.

Crude ethanol extracts of medicinal plants used in this study have a composition rich in polyphenols like quercetine (Spoor, 2006; Harbilas, 2009). This and other polyphenols, such as phloridzine and phloretin used herein as positive controls, are known to decrease or inhibit intestinal glucose absorption (Johnston, 2005; Newey, 1959; Kwon, 2007) by interfering with glucose transporters. It was noted that micromolar concentrations of phlorizin inhibited sugar transport in both the kidney and the small intestine (Alvarado, 1962) while higher concentrations interfered with aerobic metabolism and produced mitochondrial swelling (Keller, 1959). Alvarado and Crane (1962) demonstrated that phlorizin blocks glucose absorption by competitive inhibition for a transport site on a

carrier in the brush border membranes. Its clinical applications are limited because phlorizin is less effective if administered orally probably due to intestinal hydrolysis by β -glucosidase (Tsujihara, 1996; Malathi, 1969). Phlorizin derivatives have been synthesized and tested as SGLT1 inhibitors (Hongu, 1998; Tsujihara, 1999; Castaneda, 2007). Removal of the glucose moiety from phlorizin yields phloretin (Ehrenkranz, 2005). Phloretin can uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation (DeJonge, 1983), and blocks GLUT 2 facilitative transport (Ehrenkranz, 2005; Drozdowski, 2006). Surprisingly, the combination of phlorizin and phloretin did not change the protein expression of glucose transporters in our experimental conditions. This suggests that either their instantaneous effect is predominant or that they may require longer treatment times to modulate protein expression. Previous studies reported that phlorizin and phloretin at 1mM decreased both SGLT1 and GLUT2 protein expression in brush-border membrane vesicles stimulated with 100mM of glucose (Kellett, 2000), a mechanism mediated by PKC β II. Further studies will be necessary to address clarify this point.

Finally, quercetine, a natural product abundantly present in several Boreal forest plants tested and of the same phytochemical family as phlorizin and phloretin, was reported to act as a specific noncompetitive inhibitor of apical GLUT2 (Kwon, 2007; Song, 2002) in studies with Caco-2 cells and diabetic rats. Hence, it may represent a potential candidate active compound for inhibition of intestinal glucose transport. Future bioassay-guided fractionation approaches should help determine the most bioactive molecules present in the plant extracts examined in the present studies.

In summary, several potential antidiabetic plants derived from CEI traditional pharmacopeia and identified through a novel ethnobotanical approach (Leduc, 2006) have been found to exert potent instantaneous inhibitory action toward glucose transport in the intestinal CaCo2/15 cell line. *R. tomentosum* and *P. mariana* were also found to decrease glucose absorption during an OGTT *in vivo* in normoglycemic rats. The same two plants were found to significantly decrease the protein expression of SGLT1 and GLUT2 in CaCo2/15 cells respectively. We conclude that certain Boreal medicinal plants of the CEI may be useful to ingest with or during a meal in order to restrict intestinal glucose absorption and hence help Cree diabetics to achieve better glucose homeostasis in a culturally relevant manner. Future clinical studies in these populations are therefore warranted.

Bibliography:

Alvarado F.C., Crane R.K. 1962. Phlorizin as a competitive inhibitor of the active transport of sugars by hamster small intestine in vitro. *Biochim Biophys Acta* 56: 170–172.

Bonadonna R.C. 2004. Alterations of glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. An overview. *Rev Endocr Metab Disord.* 5: 89-97.

Campbell M.L., Diamant R.M.F., MacPherson B.D. et al. 1994. Energy and nutrient intakes of men (56-74 years) and women (16-74 years) in three northern Manitoba Cree communities. . *J Can Diet Assoc;*55(4):167-174.

Castaneda F., Burse A., Boland W., Rolf K-H. Kinne R.K-H. 2007. Thioglycosides as inhibitors of hSGLT1 and hSGLT2: Potential therapeutic agents for the control of hyperglycemia in diabetes. *Int. J. Med. Sci.* 2007, 4(3):131-139.

Ceriello A. 2005. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes* 54:1-7.

Drozdowski L.A, Thompson A.B.R. 2006. Intestinal sugar transport. *World J Gastroenterol;* 12(11):1657-1670.

Dyer J., Hosie K.B., and Shirazi-Beechei S.P. 1997. Nutrient regulation of human intestinal sugar transporter (SGLT1) expression. *Gut* 41:56-59.

DyerJ., Wood I.S., Palejwala A., Ellis A., and Shirazi-Beechey S.P. 2002. Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans . *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G241-G248, .

Ehrenkranz J.R., Lewis N.G., Kahn C.R.,et al. 2005. Phlorizin: a review. *Diabetes Metab Res Rev.*21:31-38.

Fedorak R.N., Cheeseman C.I., Thomson A.B. and Porter V.M. 1991. Altered glucose carrier expression: mechanism of intestinal adaptation during streptozocin-induced diabetes in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 261: G585-G591,.

Haffner S.J., and Cassells H. 2003. Hyperglycemia as a cardiovascular risk factor. *The American Journal of Medicine.* Vol. 115, 6S-11S.

Hamman R.F. 1992. Genetic and environmental determinants of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetes Metab Rev* 8:287-338.

Hanamura T, Mayama C., Aoki H., Hirayama Y., and Shimizu M. 2006. Antihyperglycemic Effect of Polyphenols from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Biosci.Biotechnol. Biochem.*, 70 (8), 1813-1820,.

Harbilas D., Martineau L.C., Harris C.S., Adeyiwola-Spoor D.C.A., Saleem A., Lambert J., Caves D., Johns T., Prentki M., Cuerrier A., Arnason J.T., Bennett S.A.L., and Haddad P.S. 2009. Evaluation of the anti-diabetic 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.

Helliwell P.A., Richardson M., Affleck J. and Kellett G.L. 2000. Stimulation of fructose transport across the intestinal brush-border membrane by PMA is mediated by GLUT2 and dynamically regulated by protein kinase C. *Biochem.J.* 350, 149:154.

Hongu M., Funami N., Takahashi Y., et al. 1998. Na(+)-glucose cotransporter inhibitors as antidiabetic agents. III. Synthesis and pharmacological properties of 4'-dehydroxyphlorizin derivatives modified at the OH groups of the glucose moiety. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. 46: 1545-1555.

Isomaa B., Almgren P., Tuomi T., Forsén B., Lahti K., Nissén M., Taskinen MR. and Groop L. 2001. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, 24, 683-689.

Johnston K., Sharp P., Clifford M., Morgan L.. 2005. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters* 579, 1653-1657.

Kellett G.L., Laroche E.B. 2005. Apical GLUT2 A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption. *DIABETES, VOL. 54*.

Kellett G.L., Helliwell P.A. 2000. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush border membrane. *Biochem J* 2000; 350 Pt 1: 155-162.

Kwon O., Eck P., Chen S., Corpe C. P., Lee J-H., Kruhlak M., Levine M. 2007. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. . *FASEB J.* 21, 366–377 .

Laakso M. 1999. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999; 48:937-42.

Lebovitz H.E. 1992. Oral antidiabetic agents: the emergence of α -glucosidase inhibitors. *Drugs* 44(suppl.3):2 1 -8.

Leduc C., Coonishish J., Haddad P., and 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(1-2): 55-63.

Lee M. 1996. Metformin in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Pharmacotherapy* 16(3):327-S 1 .

Li J.M., Che C.T., Lau C.B.S., Leung P.S. and Cheng C.H.K. 2006. Desoxyrhaponticin (3,5-Dihydroxy-4'-methoxystilbene 3-O- β -D-glucoside). *JPET*. 320:38-46.

Mahraoui L., Rodolosse A., Barbat A., Dusaulx E., Zweibaum A., Rousset M., Laroche E.B. 1994. Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochem. J.* (1 994) 298, 629-633 .

Malathi P., and Crane R.K. 1969. Phlorizin hydrolase: A β -glucosidase of hamster intestinal brush border membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 173, 245-256.

Meezan E., Meezan E.M., Jones K., Moore R., Barnes S. and Prasain J.K. 2005. Contrasting Effects of Puerarin and Daidzin on Glucose Homeostasis in Mice. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 8760-8767.

Ndong M., Uehara M., Katsumata S. and Suzuki K. 2007. Effects of oral administration of *Moringa oleifera* Lam on glucose tolerance in Goto-Kakizaki and Wistar rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 40, 229-233.

Newey H., Parsons B.J. and Smyth D. H. 1959. The Site of action of phloridzine in inhibiting intestinal absorption of glucose. *J. Physiol.* (1959) 148, 83-92.

Song J., Kwon O., Chen S., Daruwala R., Eck P., Park J.B., and Levine M. 2002. Flavonoid inhibition of Sodium-dependent Vitamin C Transporter 1 (SVCT1) and Glucose Transporter isoform 2 (GLUT2), Intestinal Transporters for vitamin C and Glucose. *The Journal of Biological Chemistry*. 277,18: 15252-15260.

Spoor D.C., Martineau L.C., Leduc C., Benhaddou-Andaloussi A., Meddah B., Harris C., Burt A., Fraser MH., Coonishish J., Joly E., Cuerrier A., Bennett S.A.L., Johns T., Prentki M., Arnason J.T., and Haddad P.S. 2006. "Selected plant species from the Cree pharmacopoeia of northern Quebec possess anti-diabetic potential." *Can J Physiol Pharmacol*. Vols. 84(8-9): 847-58.

Swanston-Flatt S.K., Day C., Flatt P.R. and Bailey C.J. 1995. Evaluation of the antihyperglycaemic properties of traditional plant treatments for diabetes. *In Frontiers in Diabetes Research: Lessons from Animal Diabetes*, vol. 3, pp. 286–293 [E Shafrir, editor]. London: Smith-Gordon and Company.

Thouez J.P., Ekoé J.M., Foggin P.M., Verdy M., Nadeau M., Laroche P., Rannou A., Ghadirian P. 1990. Obesity, hypertension, hyperuricemia and diabetes mellitus among the Cree and Inuit of northern Québec. *Arctic Med Res.* 1990 Oct;49(4):180-8.

Tsujihara K., Hongu M., Saito K., et al. 1999. Na(+)-glucose cotransporter (SGLT) inhibitors as antidiabetic agents. 4. Synthesis and pharmacological properties of 4'-dehydroxyphlorizin derivatives substituted on the B ring. *Journal of Medicinal Chemistry.* 42: 5311-5324.

Tsujihara K., Hongu M., Saito K., et al. 1996. Na(+)-glucose cotransporter inhibitors as antidiabetics. I. Synthesis and pharmacological properties of 4'-dehydroxyphlorizin derivatives based on a new concept. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 44: 1174-1180.

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):561-6.PMID:11006768.

Verspohl, E.J. 2002. Recommended testing in diabetes research. *Planta Med* 68:581-590.

Vinson J.A., Zhang J. 2005. Black and green teas equally inhibit diabetic cataracts in a streptozotocin- induced rat model of diabetes. *J Agric Food Chem* 53:3710-3713.

Wright E.M. 1993. The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Annu Rev Physiol* 55:575—589.

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

Figure legends

Figure 1:

Effects of known inhibitors on ^3H -deoxyglucose uptake in differentiated CaCo-2/15 intestinal cells. Cells were treated with vehicle, cytochalasin B (10 μM), phlorizin (100 μM), Phloretin (100 μM), or a combination of Pz and Phl for 10 min. in the presence of ^3H -deoxyglucose, as described in Materials and Methods. Results are expressed as means \pm SEM relative to the vehicle control for 3 separate experiments each with 3 to 4 replicates. * denotes significantly decreased uptake as compared to vehicle control (ANOVA, *post-test* Turkey, $p \leq 0.05$).

Figure 2:

Instantaneous effect of extracts on ^3H -deoxyglucose uptake in differentiated CaCo 2/15 intestinal cells. Cells were treated with vehicle, extract, or a combination of positive controls for 10 min. in the presence of ^3H -deoxyglucose, as described in Materials and Methods. Results are expressed as means \pm SEM relative to the vehicle control for 3 separate experiments each with 3 to 4 replicates. * denotes significantly decreased uptake as compared to vehicle control (ANOVA, *post-test* Turkey, $p \leq 0.05$).

Figure 3:

Oral glucose tolerance test (OGTT) after acute treatment in Wistar rats. Four extracts representing strong, medium and weak inhibitory potential *in vitro*, respectively *R. tomentosum* (A), *V.vitis* (B), *P.banksiana* (A) and *P. mariana* (B), were tested. Rats were gavaged with glucose solution (3g/Kg) 5 min. after administration with vehicle, phlorizin (100mg/kg) or the indicated extracts (250 mg/Kg). Blood glucose level was measured as described in Materials and Methods. Values are expressed as means \pm SEM from 5 rats.

Figure 4:

Chronic effect of selected plant extracts on ^3H -deoxyglucose uptake in differentiated CaCo-2/15 intestinal cells. Cells were treated with vehicle, the indicated extract, at the maximal non toxic concentration (Table 1) or a combination of positive controls for 6 hours, as described in Materials and Methods. Results are expressed as means \pm SEM relative to the vehicle control for 3 separate experiments each with 3 to 4 replicates. * denotes significantly decreased uptake as compared to vehicle control (ANOVA, *post-test* Turkey, $p \leq 0.05$).

Figure 5:

Effect of chronic plus instantaneous administration of selected plant extracts on ^3H -deoxyglucose uptake in differentiated CaCo-2/15 cells. Cells were treated with vehicle,

the indicated extract or a combination of positive controls for 6 hours followed by co-incubation with radioactive tracer, as described in materials and methods. Results are expressed as means \pm SEM relative to the vehicle control for 3 separate experiments each with 3 to 4 replicates. * denotes significantly decreased uptake as compared to vehicle control; δ denotes significantly decreased uptake for comparison of chronic plus instantaneous conditions (shaded bars) with the chronic conditions (white bars) (ANOVA, *post-test* Turkey, $p \leq 0.05$).

Figure 6:

Effect of selected plant extracts on protein expression level of SGLT1 (A, B) or GLUT2 (C, D). Caco-2 differentiated cells were treated 6h with 0.1% DMSO (lane 1), 100 μ g/ml P. Mariana (lane 3), 100 μ g/ml R. Tomentosum (lane 4), 25 μ g/ml P. Banksiana (lane 5), lysed and analysed by immunoblotting by use of antibodies against SGLT1, GLUT2 and β -actin. A combination of Phlorizin and Phloretin (lane 2) was used as positive control. Protein expression levels of SGLT1 and GLUT2 were normalized with respect to the level of β actin and expressed as relative changes in comparison to the vehicle control. A) Representative SGLT1 immunoblots. B) Quantitation of SGLT1 immunoblots C) Representative GLUT2 immunoblots. D) Quantitation of GLUT2 immunoblots. Results are means \pm SEM for n=3 passages of cells. * indicates significantly different from vehicle control (ANOVA, *post-test* Turkey, $p \leq 0.05$).

Figure 1:

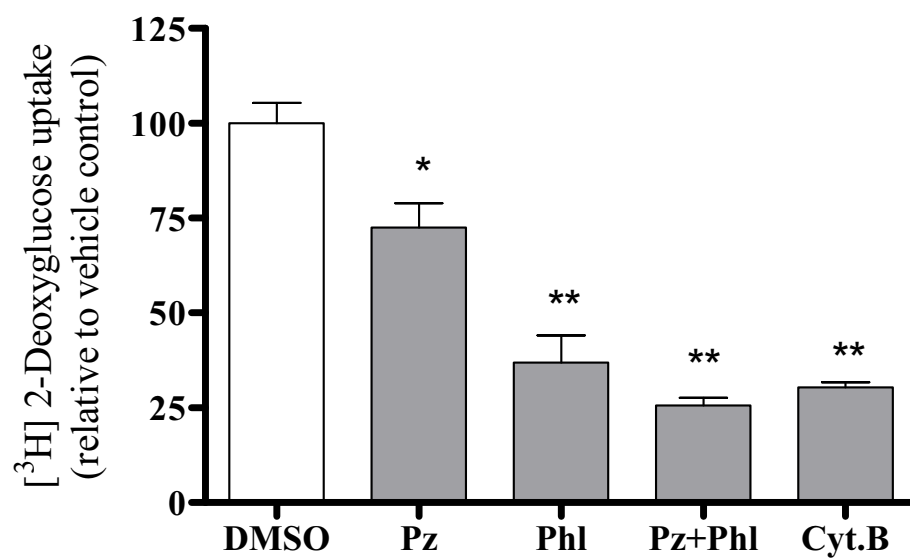


Figure 2:

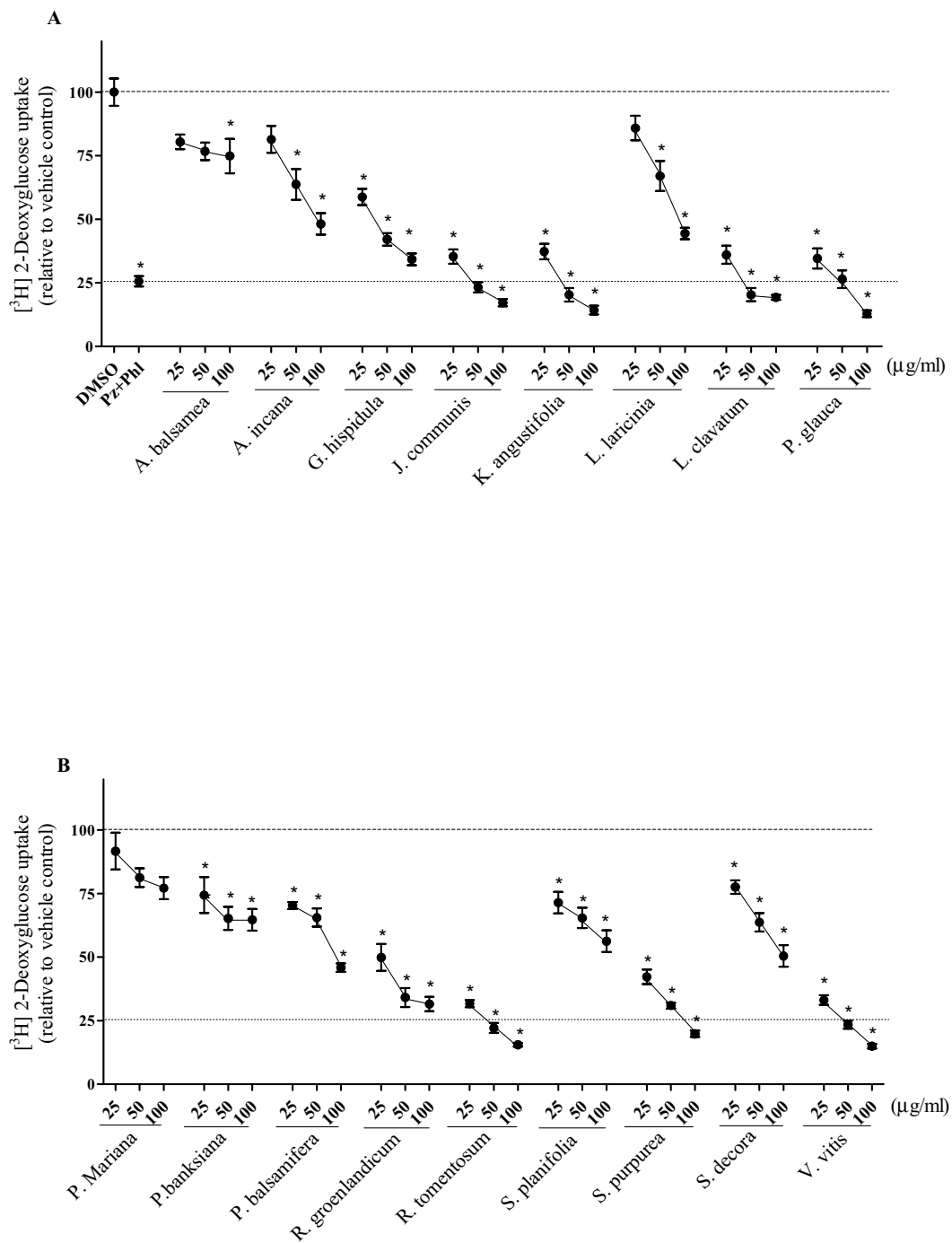


Figure 3 :

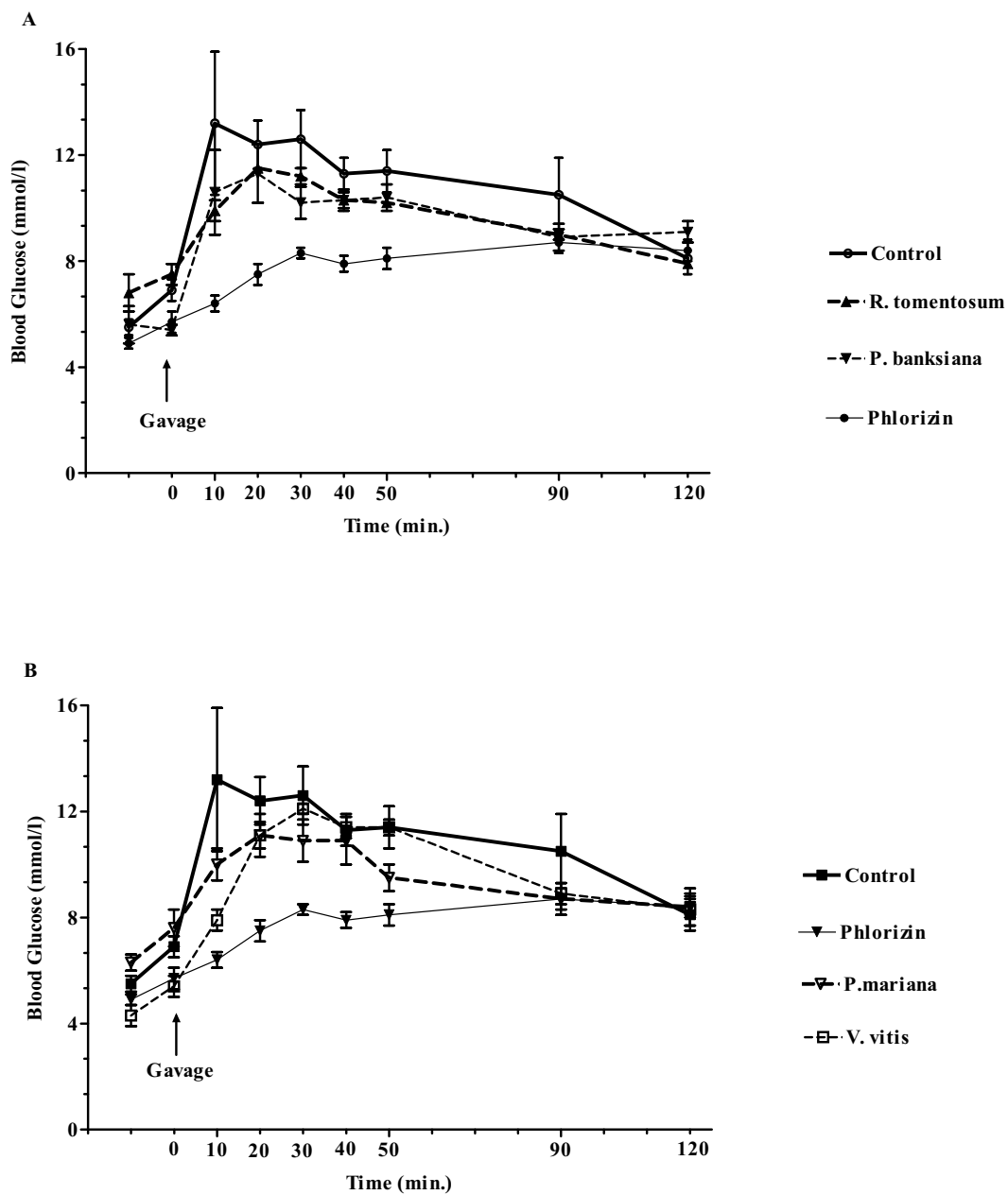


Figure 4 :

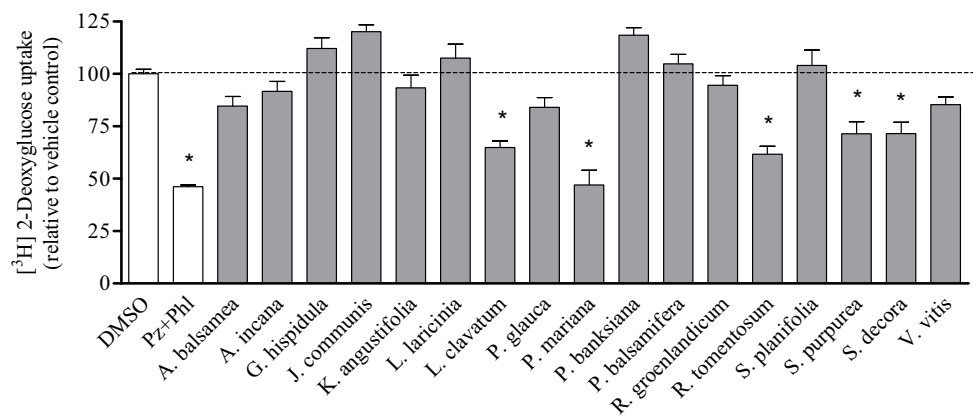


Figure 5.

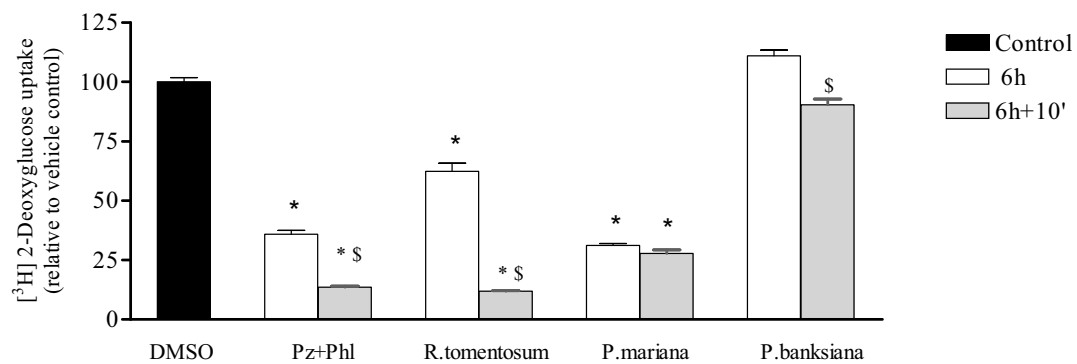
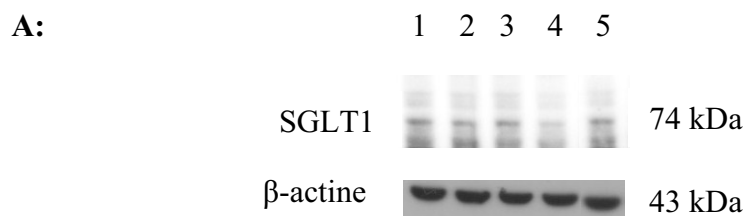
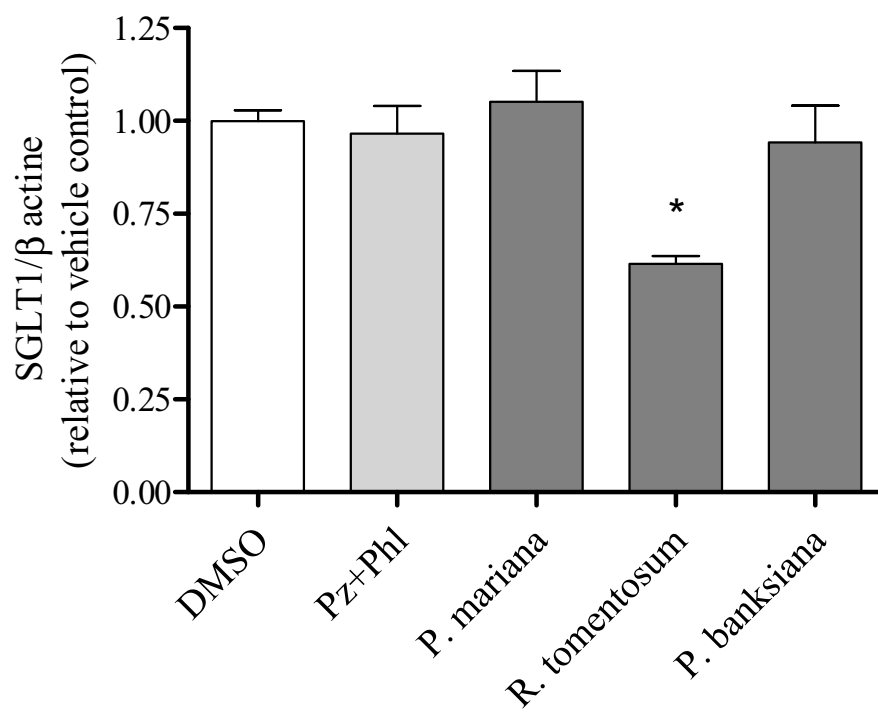


Figure 6.



B:



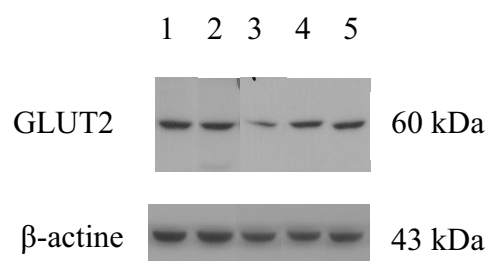
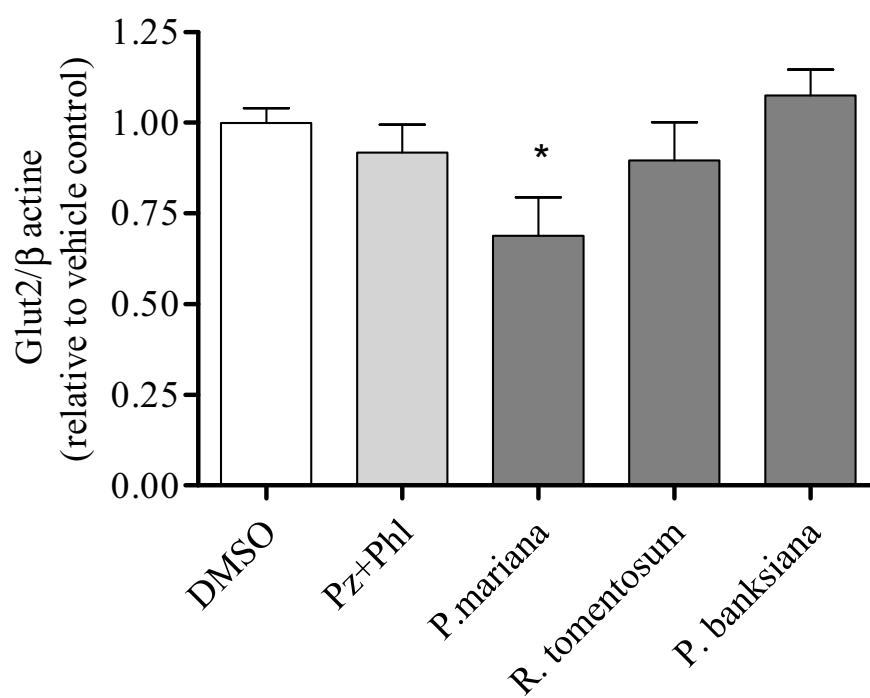
C :**D:**

Table 1: List of plant species investigated, their respective concentrations tested and results of their effect on glucose uptake activity in Caco-2/15 cells.

<u>Species</u> (<u>alphabetical order</u>)	<u>Abbreviations</u>	<u>Maximal non toxic</u> <u>concentration</u> (<u>µg/ml</u>)	<u>10 min. co-</u> <u>incubation effect</u> (<u>% uptake</u>)	<u>6h pre-incubation</u> <u>effect (% uptake)</u>	<u>pre-incubation followed</u> <u>by co-incubation</u> (<u>% uptake</u>)
<i>Abies balsamea</i>	<i>A. balsamea</i>	50	77±3	85 ± 4	n.d.
<i>Alnus incana</i>	<i>A. incana</i>	50	64±6*	92 ± 5	n.d.
<i>Gaultheria hispidula</i>	<i>G. hispidula</i>	100	34±2*	112 ± 5	n.d.
<i>Juniperus communis</i>	<i>J. communis</i>	25	35±3*	120 ± 3	n.d.
<i>Kalmia angustifolia</i>	<i>K. angustifolia</i>	12.5	n.d.	93 ± 6	n.d.
<i>Larix laricina</i>	<i>L. laricina</i>	25	86±5	108 ± 7	n.d.
<i>Lycopodium clavatum</i>	<i>L. clavatum</i>	100	49±14*	65 ± 3*	n.d.
<i>Picea glauca</i>	<i>P. glauca</i>	50	26±3*	84 ± 5	n.d.
<i>Picea mariana</i>	<i>P. mariana</i>	100	77±4	31 ± 1.2*	28 ± 2.0*
<i>Pinus banksiana</i>	<i>P. banksiana</i>	25	74±7*	111 ± 2.4	90 ± 2.7
<i>Populus balsamifera</i>	<i>P. balsamifera</i>	25	70±1*	105 ± 4	n.d.
<i>Rhododendron groenlandicum</i>	<i>R. groenlandicum</i>	12.5	n.d.	95 ± 5	n.d.
<i>Rhododendron tomentosum</i>	<i>R. tomentosum</i>	100	16±1*	63 ± 3.8*	12 ± 0.3*
<i>Salix planifolia</i>	<i>S. planifolia</i>	100	56±4*	104 ± 7	n.d.
<i>Sarracenia purpurea</i>	<i>S. purpurea</i>	50	31±1*	71 ± 6*	n.d.
<i>Sorbus decora</i>	<i>S. decora</i>	100	50±4*	71 ± 5*	n.d.
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	<i>V. vitis</i>	100	15±1*	85 ± 4	n.d.
<i>Phlorizin + phloretin</i>	Pz+Phl	100µM	26±2*	36 ± 1.6*	14 ± 0.5*

Values are expressed as mean ± SEM relative to the vehicle control (set of 100% uptake) from results shown in Fig.2, Fig.4, and Fig.5. * denotes significantly decreased uptake as compared to vehicle control (ANOVA, *post-test* Turkey, $p \leq 0.05$).

Table 2. Blood glucose calculated from areas under the curve at different time periods.

	AUC 30 min.	AUC 50 min.	AUC 120 min.
Control	196.6 ± 20.4	319.8 ± 17.2	650.7 ± 52.7
V. vitis	153.6 ± 9.3	298.6 ± 19.2	664 ± 39.5
P. banksiana	133.3 ± 30.8	227.2 ± 44.1	492.3 ± 95.9
P. mariana	122.3 ± 16.6*	207.4 ± 26.2*	386.3 ± 64.3*
R.Tomentosum	109.3 ± 19.4*	184.2 ± 34.8*	348.6 ± 72.5*
Phlorizin	68.2 ± 6.6*	132.0 ± 10.5*	382.6 ± 35.8*

Values are means from 5 rats. * denotes significantly decreased in glycaemia as compared to vehicle control (ANOVA, *post-test* Turkey, $p \leq 0.05$).

3. Discussion générale

La prévalence du diabète de type 2 et de ses complications chez les populations autochtones Cris a augmenté dans les dernières années suite aux changements de leur mode de vie et de leur diète, résultant en partie de l'urbanisation. Étant donné la difficulté d'adhérer aux traitements de la médecine moderne, il s'avère crucial de trouver des traitements efficaces qui s'adaptent plus harmonieusement à leur culture.

Le but de ce mémoire de maîtrise a été d'identifier, parmi les 17 plantes reconnues suite à des études ethnobotaniques (Leduc, 2006), celles qui ont un effet régulateur sur l'absorption intestinale du glucose. Si cette approche fonctionnait, elle aurait le mérite non seulement de réduire l'apport glucidique, mais aussi d'abaisser la quantité énergétique, ce qui exercerait un effet direct sur le poids corporel et, donc, l'obésité. La stratégie de limiter la biodisponibilité des nutriments par l'inhibition de la digestion ou de l'absorption est souvent utilisée dans des approches thérapeutiques pour de nombreux désordres tels que l'hypercholestérolémie et les maladies cardiovasculaires (Grundy, 2005). Dans nos études, cette même démarche a été employée pour tester l'efficacité des plantes au bénéfice des patients diabétiques.

Ce projet de criblage a commencé par des études à court terme qui ont permis d'identifier l'effet instantané des plantes médicinales Cris sur l'absorption intestinale du glucose. La lignée cellulaire Caco-2 a servi de modèle expérimental puisqu'il a fait ses preuves lors d'essais évaluant la cinétique de nutriments et de médicaments (Hubatsch, 2007; Delie, 1997).

Les résultats démontrent que treize parmi les dix-sept extraits ont inhibé de façon significative l'absorption intestinale du $^3\text{H-D-glucose}$ à tous les trois doses testées. L'inhibition a été dose-dépendante et, dans quelques cas, a dépassé l'effet induit par une combinaison des deux inhibiteurs connus, soit phlorizine et phloretine. Cet effet instantané est probablement dû à une compétition des composantes phénoliques de ces plantes pour le site de liaison du glucose au transporteur ou à une dissipation du gradient de sodium à travers la BBM (Dinda, 1987). La phlorizine et certains composés phénoliques comme l'acide chlorogénique et l'acide tannique, qui sont présents dans certaines extraits de plantes (Tableau II, p. 25), sont connus d'exercer leur effet inhibiteur via ces mécanismes (Dinda, 1987; Welsch, 1989).

Par la suite, on a vérifié la tolérance au glucose des rats normaux après l'administration d'une dose unique d'extraits de plante, suivie d'un bolus de glucose. Quatre plantes soit *R. tomentosum*, *V. vitis*, *P. banksiana* et *P. mariana* ont été choisies pour cette expérience en fonction de leur efficacité démontrée dans les expériences antérieures *in vitro*. En fait, *R. tomentosum* et *V. vitis* ont significativement inhibé l'absorption du glucose dans les cellules Caco-2, exhibant même un effet supérieur à celui induit par la combinaison des deux contrôles positifs. Par contre, *P. banksiana* n'a révélé qu'un effet modéré sur l'absorption du glucose tandis que *P. mariana* n'a démontré aucune activité de modulation. Les aires sous la courbe des OGTT diminuent d'une façon significative suite au traitement avec *R. tomentosum* et *P. mariana*. La phlorizine, utilisée comme référence dans cette étude, diminue de façon significative la glycémie des rats normaux suite à une prise de glucose. Ce composé est connu pour son effet inhibiteur de

l'absorption intestinale du glucose mais aussi de la réabsorption rénale du glucose (Stumpel, 2001; Zhao, 2004).

L'effet hypoglycémiant du *R. tomentosum* et *P. mariana* observé *in vivo* peut donc être attribué en partie à une inhibition du transport intestinal du glucose. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour vérifier si une diminution de la réabsorption rénale du glucose contribue aussi à cet effet.

La variété et complexité des composés phénoliques identifiés dans ces extraits explique en partie les différences observées entre les résultats obtenus *in vitro* et ceux *in vivo*. Ces composés peuvent subir des modifications structurales pendant leur passage à travers la muqueuse intestinale (Li, 2006). En plus ils présentent des mécanismes d'action différents en fonction de leur structure (Johnston, 2005; Kwon, 2007). Finalement, il importe de rappeler que le rapport entre l'extrait et le substrat (glucose) était de 1000 fois en faveur de l'extrait dans les études *in vitro* alors que l'inverse était vrai *in vivo*. Des études plus poussées permettront de mieux comprendre les différences de résultats entre les conditions *in vitro* et *in vivo*.

Par ailleurs, on a voulu vérifier si ces plantes ont un effet sur l'absorption du glucose à plus long terme. Les résultats obtenus montrent que 5 plantes soit *P. mariana*, *R. tomentosum*, *L. clavatum*, *S. purpurea* et *S. decora* ont le pouvoir de réduire l'absorption du glucose après 6h d'incubation des cellules Caco-2. Nous avons vérifié par Western Blot si la réduction de l'absorption du glucose dans les cellules Caco-2/15 est due à une diminution de l'expression protéique du SGLT1 ou du GLUT2. Les résultats supportent

le déclin de l'expression protéique du GLUT2 en présence de *P. mariana*. Cette plante est la seule parmi les 17 étudiées à exercer un impact sur l'absorption après 6h de traitement sans avoir un effet inhibiteur aigu. Ce fait suggère qu'un mécanisme d'action différent intervient lorsque les cellules intestinales sont exposées à la plante *P. mariana*. Il serait important de déterminer l'action de cette plante sur la voie de la MAP kinase, PI 3-kinase et PKC impliquées dans la régulation, l'activité intrinsèque et le recrutement du GLUT2 dans la membrane apicale des entérocytes (Helliwell, 2000 b).

D'autre part, l'expression protéique de SGLT1 a été réduite uniquement par la plante *R. tomentosum*, qui a eu un effet inhibiteur instantané sur l'absorption du glucose plus important que celui observé à long terme.

Deux études ont démontré l'effet insulino-mimétique *in vitro* des plantes médicinales provenant de la Pharmacopée Cris (Spoor 2006; Harbilas 2009). Les résultats de ces deux études de criblage montrent que onze parmi les dix-sept extraits soit *A. balsamea*, *A. incana*, *G. hispidula*, *L. laricina*, *P. banksiana*, *R. groenlandicum*, *R. tomentosum*, *S. planifolia*, *S. purpurea*, *S. decora* and *V. vitis* ont favorisé la captation basale de glucose par les cellules musculaires et les adipocytes. Dans la présente étude on a démontré que tous ces extraits diminuent significativement l'absorption intestinale du glucose. Généralement, l'action hypoglycémiant de l'insuline est due à une stimulation de la translocation du GLUT4 vers la membrane plasmique des cellules musculaires et des adipocytes (Huang, 2007). De plus, l'effet de l'insuline sur l'absorption intestinale du glucose a été aussi étudié. L'étude de Pennington (Pennington 1994) montre que l'inhibition instantanée de l'absorption du glucose est attribuée à un effet au niveau de

SGLT1. Un autre rapport plus récent démontre que l'inhibition de l'absorption intestinale du glucose par l'insuline est due à l'internalisation du GLUT2 de la membrane plasmique dans vésicules intracellulaires dans les Caco-2 (Tobin, 2007).

La combinaison de la phlorizine et la phloretine n'a pas changé l'expression protéique des transporteurs de glucose dans nos conditions expérimentales. La phloretine est connu comme découpleur de la respiration mitochondriale (DeJonge, 1983) et comme inhibiteur non compétitif du GLUT2 (Ehrenkranz, 2005). En ce qui concerne la phlorizine, elle exerce un effet inhibiteur sur l'absorption intestinale du glucose en favorisant la dissipation du gradient électrochimique de Na^+ (Dinda, 1987). Ce mécanisme pourrait être responsable de l'effet inhibiteur aigu et chronique de ces composés sur l'absorption du glucose dans les cellules Caco-2.

De façon intéressante, nous avons observé que le transport du glucose dans les cellules Caco-2/15 a été diminué de 63% et 70% sous l'action de la phloretine et Cytochalasin B (inhibiteurs connus du GLUT2), respectivement, tandis que la phlorizine qui est un inhibiteur plus spécifique du SGLT1 a eu un effet de 27% (voir Figure 1 de l'article). Dans les cellules Caco 2/15, les deux transporteurs de glucose sont présents dans les membranes apicales (résultats non illustrés), ce qui a été observé par d'autres études rapportant la présence du Glut2 dans les membranes apicales des cellules Caco-2 (Kwon, 2007; Tobin, 2008).

4. Conclusions et perspectives

L'effet hypoglycémiant des plantes médicinales et des flavonoïdes qui les composent avaient déjà fait l'objet de différentes études. Les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* se montrent prometteurs puisque nos travaux suggèrent que les extraits de plantes ont un potentiel intéressant pour traiter les diabétiques Cris et pour développer de nouveaux agents hypoglycémians. Dans cette étude nous avons montré que les plantes médicinales provenant de la médecine traditionnelle des Cris de la Baie James ont un effet régulateur de l'absorption du glucose dans les cellules Caco-2/15. Cet effet pourrait s'expliquer par l'inhibition instantanée due à la compétition des composantes de ces plantes avec le site de liaison du glucose sur le transporteur ou une inhibition due à l'expression protéique du GLUT2 ou SGLT1. Il a été démontré que l'absorption intestinale du glucose chez les patients et les animaux diabétiques de type 2 est augmentée (Dyer, 2002) comme conséquence de la surexpression des transporteurs du glucose SGLT1 et GLUT2 (Dyer, 1997; Fedorak, 1991). Nos données sont des plus intéressantes, mais d'autres études devraient être effectuées afin de définir les mécanismes d'action. En outre, des travaux *in vivo* supplémentaires devront être menés pour valider les résultats des Caco-2.

Il serait également intéressant d'explorer l'effet de ces plantes sur l'absorption intestinale du glucose chez les animaux diabétiques étant donné la surexpression des transporteurs du glucose dans ces modèles (Fedorak, 1991) et la présence de GLUT2 sur la membrane apicale des entérocytes des rats diabétiques (Corpe, 1996).

Enfin, nos études appuient la sélection de certaines plantes issues de la médecine traditionnelle Cri pour des études cliniques visant à déterminer leur innocuité et leur utilité dans le contexte du contrôle de la glycémie dans le diabète de type 2.

Références:

Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson, Sayegh MH. 2008. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells A Potential Therapeutic Strategy for Type 1 Diabetes. *Diabetes* 57:1759–1767.

American Diabetes Association. 2004. Medical Management of Type 2 Diabetes. 5th ed. Alexandria, VA.

American Diabetes Association. 2006. Pancreas and Islet Transplantation in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care, Volume 29, Number 4.*

Alvarado FC, Crane RK. 1962. Phlorizin as a competitive inhibitor of the active transport of sugars by hamster small intestine in vitro. *Biochim Biophys Acta* 56: 170–172.

Bonadonna RC. 2004. Alterations of glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. An overview. *Rev Endocr Metab Disord.* 5: 89-97.

Bouché C, Serdy S, Kahn CR and Goldfine AB. 2004. The cellular fate of glucose and its relevance in Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*, doi:10.1210/er.2003-0026.

Calne R. 2005. Cell transplantation for diabetes. *Phil. Trans. R. Soc. B* (2005) 360, 1769–1774.

Campbell ML, Diamant RMF, MacPherson BD et al. 1994. Energy and nutrient intakes of men (56-74 years) and women (16-74 years) in three northern Manitoba Cree communities. *J Can Diet Assoc*;55(4):167-174.

Castaneda F, Burse A, Boland W, Rolf K-H, Kinne RK-H. 2007. Thioglycosides as inhibitors of hSGLT1 and hSGLT2: Potential therapeutic agents for the control of hyperglycemia in diabetes. *Int. J. Med. Sci.* 2007, 4(3):131-139.

Ceriello A. 2005. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes* 54:1-7.

Chang L, Chiang SH, Saltiel AR. 2004. Insulin signalling and the regulation of glucose transport. *Molecular Medicine*, 10(7-12): 65-71.

Delie F, Rubas W. 1997. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 14: 221-86.

Dinda PK and Beck IT. 1987. Phlorizin increases the permeability of intestinal mucosal membrane to sodium. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65(4): 579–586.

Drozdowski LA, Thompson ABR. 2006. Intestinal sugar transport. *World J Gastroenterol*; 12(11):1657-1670.

Dyer J, Hosie KB, and Shirazi-Beechei SP. 1997. Nutrient regulation of human intestinal sugar transporter (SGLT1) expression. *Gut* 41:56-59.

Dyer J, Wood I S, Palejwala A, Ellis A, and Shirazi-Beechei SP. 2002. Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans . *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G241-G248, .

Ducobu, J. 2003. Oral antidiabetic drugs in 2003. *Rev Med Brux*, 24, pp.361-368.

Ehrenkranz JR, Lewis NG, Kahn CR, et al. 2005. Phlorizin: a review. *Diabetes Metab Res Rev.* 21:31-38.

Fedorak RN, Cheeseman CI, Thomson AB and Porter VM. 1991. Altered glucose carrier expression: mechanism of intestinal adaptation during streptozocin-induced diabetes in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 261: G585-G591.

Gaborit B and Andreelli F. 2008. Anti-hyperglycemic effects of thiazolidinediones. *Nutrition Clinique et Métabolisme Volume 22, issue 2, p.84-87.*

Gautier JF, Choukem SP. 2008. Incretins. *Nutrition Clinique et Métabolisme Volume 22, issue 2, p.59-65.*

Haffner SJ, and Cassells H. 2003. Hyperglycemia as a cardiovascular risk factor. *The American Journal of Medicine.* Vol. 115, 6S-11S.

Hamman RF. 1992. Genetic and environmental determinants of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetes Metab Rev* 8:287-338.

Hanamura T, Mayama C, Aoki H, Hirayama Y, and Shimizu M. 2006. Antihyperglycemic Effect of Polyphenols from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (8), 1813-1820.

Harbilas D, Martineau LC, Harris CS, Adeyiwola-Spoor DCA, Saleem A, Lambert J, Caves D, Johns T, Prentki M, Cuerrier A, Arnason JT, Bennett SAL, and Haddad PS. 2009. Evaluation of the anti-diabetic 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.

Helliwell PA, Richardson M, Affleck J and Kellett GL. 2000 (a). Stimulation of fructose transport across the intestinal brush-border membrane by PMA is mediated by GLUT2 and dynamically regulated by protein kinase C. *Biochem.J.* 350, 149:154.

Helliwell PA, Richardson M, Affleck J and Kellett GL. 2000 (b). Regulation of GLUT5, GLUT2 and intestinal brush-border fructose absorption by the extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase intracellular signalling pathways: implications for adaptation to diabetes. *Biochem. J.* 350, 163±169.

Hongu M, Funami N, Takahashi Y, et al. 1998. Na(+)-glucose cotransporter inhibitors as antidiabetic agents. III. Synthesis and pharmacological properties of 4'-dehydroxyphlorizin derivatives modified at the OH groups of the glucose moiety. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo).* 46: 1545-1555.

Hubatsch I, Ragnarsson EG, Artursson P. 2007. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc* 2: 2111-9.

Jian Mei Li, Chun Tao Che, Clara B. S. Lau, Po Sing Leung and Christopher H.K. Cheng. 2006. Desoxyrhaponticin (3,5-Dihydroxy-4'-methoxystilbene 3-O-β-D-glucoside). *JPET.* 320:38-46.

Johnston K, Sharp P, Clifford M, Morgan L. 2005. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters* 579, 1653-1657.

Kellett GL, Laroche EB. 2005. Apical GLUT2 A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption. *Diabetes, Vol. 54.*

Kellett GL, Helliwell PA. 2000. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush border membrane. *Biochem J.* 350 Pt 1: 155-162.

Kwon, O., Eck, P., Chen, S., Corpe, C. P., Lee, J-H., Kruhlak, M., Levine, M. 2007. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J.* 21, 366–377.

Lamounier RN, Pareja JC, Tambascia MA, Geloneze B. 2007. Incretins: Clinical physiology and bariatric surgery – correlating the entero-endocrine system and a potentially anti-dysmetabolic procedure. *Obesity Surgery, 17, 569-576.*

Leduc, C., J. Coonishish, et al. 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(1-2): 55-63.

Lee DD, Grossman E, Chong AS, Scherbaum WA. 2008. Cellular Therapies for Type I Diabetes. *Horm Metab Res.* 40(2): 147–154.

Light PE. 2002. The ABCs of sulfonylurea receptors, islet K_{ATP} channels and the control of insulin secretion. *Canadian Journal of Diabetes*, 26(3):223-231.

Mahraoui L, Rodolosse A, Barbat A, Dusaulx E, Zweibaum A, Rousset M, Laroche EB. 1994. Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochem. J.* (1 994) 298, 629-633 .

Malathi, P., & Crane, R.K. 1969. Phlorizin hydrolase: A B-glucosidase of hamster intestinal brush border membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 173, 245-256.

Meezan E, Meezan EM, Jones K, Moore R, Barnes S and Prasain JK. 2005. Contrasting Effects of Puerarin and Daidzin on Glucose Homeostasis in Mice. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 8760-8767.

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

Mueckler M. 1994. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem*, 219, pp. 713-25.

De Munter JSL, Hu FB, Spiegelman D, Franz M, Van Dam RM. 2007. Whole grain, bran, and germ intake and risk of Type 2 diabetes: A Prospective Cohort Study and Systematic Review. *PLoS Medicine*. Volume 4, issue 8, e261.

Ndong M, Uehara M, Katsumata S, and Suzuki K. 2007. Effects of oral administration of *Moringa oleifera* Lam on glucose tolerance in Goto-Kakizaki and Wistar rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 40, 229-233.

Newey H, Parsons BJ, and Smyth DH. 1959. The site of action of phloridzine in inhibiting intestinal absorption of glucose. *J. Physiol.* (1959) 148, 83-92.

Song J, Kwon O, Chen S, Daruwala R, Eck P, Park JB, and Levine M. 2002. Flavonoid inhibition of Sodium-dependent Vitamin C Transporter 1 (SVCT1) and Glucose Transporter isoform 2 (GLUT2), Intestinal Transporters for vitamin C and Glucose. *The Journal of Biological Chemistry*. 277,18: 15252-15260.

Spoor DC, Martineau LC, Leduc C, Benhaddou-Andaloussi A, Meddah B, Harris C, Burt A, Fraser MH, Coonishish J, Joly E, Cuerrier A, Bennett SAL, Johns T, Prentki M, Arnason JT, and Haddad PS. 2006. "Selected plant species from the Cree

pharmacopoeia of northern Quebec possess anti-diabetic potential.". *Can J Physiol Pharmacol*. Vols. 84(8-9): 847-58.

Steyn NP, Mann J, Bennett PH, Temple N, Zimmet P et al. 2004. Diet, nutrition and the prevention of type 2 diabetes. *Public Health Nutr* 7: 147–165.

Street NC and Korbitt GS. 2002. Stem Cells as a Source of Islets for Transplantation in Type 1 Diabetes: Scientific and Ethical Considerations. *Canadian Journal of Diabetes* 27(3):262-270.

Swanston-Flatt SK, Day C, Flatt PR and Bailey CJ. 1995. Evaluation of the antihyperglycaemic properties of traditional plant treatments for diabetes. In *Frontiers in Diabetes Research: Lessons from Animal Diabetes*, vol. 3, pp. 286–293 [E Shafrir, editor]. London: Smith-Gordon and Company.

Thouez JP, Ekoé JM, Foggin PM, Verdy M, Nadeau M, Laroche P, Rannou A, Ghadirian P. 1990. Obesity, hypertension, hyperuricemia and diabetes mellitus among the Cree and Inuit of northern Québec. *Arctic Med Res*. 1990 Oct;49(4):180-8.

Tortora GJ and Grabowski SR. 2001. Principes d'anatomie et de physiologie. *Éditions du Renouveau Pédagogique Inc.*

Tsujihara K, Hongu M, Saito K, et al. 1999. Na(+)-glucose cotransporter (SGLT) inhibitors as antidiabetic agents. 4. Synthesis and pharmacological properties of 4'-dehydroxyphlorizin derivatives substituted on the B ring. *Journal of Medicinal Chemistry*. 42: 5311-5324.

Tsujihara K, Hongu M, Saito K, et al. 1996. Na(+)-glucose cotransporter inhibitors as antidiabetics. I. Synthesis and pharmacological properties of 4'-dehydroxyphlorizin derivatives based on a new concept. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 44: 1174-1180.

Verspohl EJ. 2002. Recommended testing in diabetes research. *Planta Med* 68:581-590.

Vinson JA, Zhang J. 2005. Black and green teas equally inhibit diabetic cataracts in a streptozotocin- induced rat model of diabetes. *J Agric Food Chem* 53:3710-3713.

Welsch CA, Lachance PA, Wasserman BP. 1989. Dietary phenolic compounds: inhibition of Na⁺-dependent D-glucose uptake in rat intestinal brush border membrane vesicles. *J Nutr*. 119(11):1698-704.

WHO. 2007. Prevalence of diabetes in the WHO Region of the Americas. World Health Organization, Geneva.
Available from http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index3.html.

Wu X and Woo M. 2008. Les stratégies fondées sur les cellules souches pour la régénération des cellules β -pancréatiques: de la recherche à la pratique clinique. *Endocrinologie Conférences Scientifiques. Volume 8, numéro 4.*

Wright EM. 1993. The intestinal Na^+ /glucose cotransporter. *Annu Rev Physiol* 55:575—589.

Young TK, Reading J, Elias B, O'Neil JD. 2000. Type 2 diabetes mellitus in Canada's First Nations: status of an epidemic in progress. *CMAJ* 2000;163(5):561-6. *PMID:11006768.*

Zhao H, Yakar S, Gavrilova O, Sun H, Zhang Y, Kim H, Setser J, Jou W, LeRoith D. 2004. Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 2901-2909.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414:782-78.

