

Université de Montréal

**Validation des effets antidiabétiques de *Rhododendron  
groenlandicum*, une plante médicinale des Cri de la Baie  
James, dans le modèle *in vitro* et *in vivo*  
Élucidation des mécanismes d'action et identification des composés actifs**

par

Meriem Ouchfoun

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en pharmacologie

Décembre, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Validation des effets antidiabétiques de *Rhododendron groenlandicum*, une plante  
médicinale des Cri de la Baie James dans le modèle *in vitro* et *in vivo* :  
Élucidation des mécanismes d'action et identification des composés actifs

Présenté par :  
Meriem Ouchfoun

Évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Martin G. Sirois, président-rapporteur  
Dr. Pierre Haddad, directeur de recherche  
Dr. Jean-François Gauchat, membre du jury

## Résumé

Le diabète est un syndrome métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique due à un défaut de sécrétion de l'insuline, de l'action de l'insuline (sensibilité), ou une combinaison des deux. Plus d'un million de canadiens vivent actuellement avec le diabète. La prévalence de cette maladie est au moins trois fois plus élevée chez les autochtones que dans la population canadienne en général. Notre équipe vise à étudier les effets potentiellement antidiabétiques de certaines plantes médicinales utilisées par les Cris d'Eeyou Istchee (Baie James, Québec) où l'adhérence aux traitements médicamenteux est faible, en partie à cause de la déconnection culturelle de ces derniers. Grâce à une approche ethnobotanique, notre équipe a identifié 17 plantes médicinales utilisées par cette population pour traiter des symptômes du diabète. Parmi ces plantes, l'extrait éthanolique de *Rhododendron groenlandicum* (Thé du Labrador) a montré un fort potentiel antidiabétique chez plusieurs lignées cellulaires, notamment les adipocytes (3T3-L1). Cette plante induit la différenciation adipocytaire probablement par l'activation du *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR  $\gamma$ ). Cette stimulation améliore la résistance à l'insuline et constitue un mécanisme privilégié pour une classe de médicaments antidiabétiques, les thiazolidinediones.

Le but de la présente étude est de valider l'efficacité et l'innocuité de *R. groenlandicum in vivo*, dans un modèle animal de résistance à l'insuline, d'élucider les mécanismes par lesquels cet extrait exerce ses effets antidiabétiques et d'identifier les principes actifs responsables de son activité.

L'isolation et l'identification des constituants actifs ont été réalisées à l'aide d'une approche de fractionnement guidé par bioessai; en l'occurrence, l'adipogénèse. Cette approche, réalisée dans la lignée adipocytaire 3T3-L1, a pour but de mesurer leur teneur en triglycérides. Des études *in vivo* ont été réalisées sur le modèle de souris DIO (*diet induced obesity*). L'extrait éthanolique du *R. groenlandicum* a été incorporé à la nourriture grasse (35% d'apport calorique lipidique) à trois doses différentes (125, 250 et 500 mg / kg) sur

une période de 8 semaines. Des tissus cibles de l'insuline (foie, muscle squelettique et tissus adipeux) ont été récoltés afin de faire des analyses d'immunobuvardage de type western.

La quercétine, la catéchine et l'épicatéchine ont été identifiées comme étant les composés actifs responsables de l'effet antidiabétique du *R. groenlandicum*. Seules la catéchine et l'épicatéchine activent l'adipogénèse uniquement à forte concentration (125-150  $\mu$ M), tandis que la quercétine l'inhibe.

L'étude *in vivo* a montré que le traitement avec *R. groenlandicum* chez les souris DIO réduit le gain de poids de 6%, diminue l'hyperglycémie de 13% et l'insulinémie plasmatique de 65% et prévient l'apparition des stéatoses hépatiques (diminution de 42% de triglycéride dans le foie) sans être toxique. Les analyses d'immunobuvardage ont montré que *R. groenlandicum* stimule la voie de l'insuline via la phosphorylation de l'Akt et a augmenté le contenu protéique en Glut 4 dans les muscles des souris traitées. Par contre, dans le foie, le *R. groenlandicum* passerait par deux voies différentes, soit la voie insulino-dépendante par l'activation de l'AKT, soit la voie insulino-indépendante par la stimulation de l'AMPK. L'amélioration observée des stéatoses hépatiques chez les souris DIO traitées, a été confirmée par une baisse du facteur de transcription, SREBP-1, impliqué dans la lipogénèse *de novo*, ainsi qu'une diminution de l'inflammation hépatique (diminution de l'activité d'IKK  $\alpha/\beta$ ).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats soutiennent le potentiel thérapeutique de *Rhododendron groenlandicum* et de ses composants actifs dans le traitement et la prévention du diabète de type 2. Nous avons validé l'innocuité et l'efficacité de cette plante issue de la médecine traditionnelle Cri, qui pourrait être un traitement alternatif du diabète de type 2 dans une population ayant une faible adhérence au traitement pharmacologique existant.

**Mots-clés** : Thé du Labrador, diabète de type 2, insulino-résistance, DIO, Akt, AMPK, Glut 4, PPAR  $\gamma$ , SREBP-1, produits de santé naturels.

## Abstract

Diabetes is a metabolic syndrome characterized by chronic hyperglycemia due to a defect in insulin secretion, insulin action (sensitivity), or both. More than one million Canadians are currently living with diabetes. The prevalence of this disease is at least three times higher among indigenous people than in the general Canadian population. Our team studied the potential effects of certain anti-diabetic medicinal plants used by the Cree nation of Eeyou Istchee (James Bay, Quebec) where compliance to western treatment is low due in part to the cultured disconnect of the latter. Using an ethnobotanical approach, we identified 17 medicinal plants used by this population to treat symptoms of diabetes. Among these plants, the ethanol extract of *Rhododendron groenlandicum* (Labrador Tea) showed strong anti-diabetic potential in several cell lines, including adipocytes (3T3-L1) where it induced differentiation probably by stimulating the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR  $\gamma$ ). Such stimulation has been shown to improve insulin resistance, a mechanism used by a class of anti-diabetic drugs, the thiazolidinediones.

The aim of the present study is to validate the effectiveness and the safety of *R. groenlandicum* *in vivo* in a mouse model of insulin resistance, to elucidate the mechanisms by which it exerts its effects and to identify the active principles responsible for its activity.

Isolation and identification of active constituents of *R. groenlandicum* were performed using a fractionation approach guided by the increase of triglyceride content in the adipocyte (3T3-L1). *In vivo* studies were performed on a DIO (diet induced obesity) mouse model. The ethanolic extract of *R. groenlandicum* was incorporated into the high fat diet (35% energy derived from lipids) at three different doses (125, 250 and 500 mg / kg) over a period of 8 weeks. Western immunoblot analysis was performed on different tissues (liver, skeletal muscle, adipose tissue) collected at the end of the study.

Quercetin, catechin and epicatechin were identified as the active compounds responsible for the anti-diabetic effect of *R. groenlandicum*. Alone, catechin and epicatechin activate adipogenesis only at high concentrations (125-150  $\mu$ M) while quercetin inhibits it.

*In vivo*, treatment of DIO mice with *R. groenlandicum* diminished weight gain by 6 %, reduced blood glucose by 13%, insulin plasma by 65% and prevented hepatic steatosis (triglycerides levels decreased by 42%) without significant toxicity. Western blot analysis showed that *R. groenlandicum* increased Glut 4 protein content in skeletal muscle by activating the insulin dependent pathway implicating Akt. Effects of *R. groenlandicum* on hepatic steatosis seems to involve both pathways; the insulin dependent Akt and insulin independent AMPK pathways. This correlated with decreased SREBP-1 hepatic content, a transcription factor involved *in de novo* lipogenesis, and with a reduction of inflammation (decrease in the activity of IKK alpha / beta).

Taken together, these results support the therapeutic potential of *Rhododendron groenlandicum* and its active compounds in the treatment and prevention of type 2 diabetes. We validated the safety and efficacy of this plant from traditional Cree medicine. It could represent an alternative treatment of type 2 diabetes in a population that has a poor compliance to pharmacological treatments.

**Keywords** : Labrador tea, type 2 diabetes, insulin resistance, DIO, Akt, AMPK, Glut4, PPAR  $\gamma$ , SREBP-1, natural health products.

# Table des matières

## Chapitre A : Introduction

Page titre .....	i
Page d'identification du jury .....	ii
Résumé.....	iii
Abstract.....	vi
Table des matières.....	viii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures .....	xii
Liste des abréviations.....	xiv
Dédicace.....	xvi
Remerciements.....	xvii
Chapitre A: Introduction.....	1
1. Introduction.....	1
1.1 Homéostasie énergétique .....	3
1.1.1 Homéostasie du glucose.....	3
1.1.1.1 Régulation hormonale de la glycémie.....	3
1.1.1.1.1 Insuline.....	4
1.1.1.1.2 Glucagon .....	4
1.1.1.2 Régulation de la glycémie par le foie.....	4
1.1.1.3 Régulation du transport du glucose.....	6
1.1.2 Homéostasie des lipides .....	7
1.1.2.1 Régulation du métabolisme lipidique par la diète.....	8
1.1.2.2 Régulation hormonale du métabolisme lipidique .....	8
1.1.2.3 Régulation du métabolisme lipidique par la famille de PPARs.....	9
1.2 L'AMPK: un «senseur» énergétique .....	11
1.2.1 AMPK et métabolisme des glucides .....	11



1.2.2 AMPK et métabolisme des lipides.....	13
1.3 Insuline: contrôleur métabolique .....	14
1.3.1 Biosynthèse et sécrétion de l'insuline.....	14
1.3.2 Signalisation de l'insuline.....	15
1.3.3 Effets physiologiques de l'insuline.....	18
1.3.3.1 Métabolisme des glucides .....	18
1.3.3.2 Métabolisme des lipides.....	19
1.3.3.3 Métabolisme des protéines.....	19
1.3.4 La résistance à l'insuline .....	20
1.4 Diabète: un syndrome métabolique.....	22
1.4.1 Définition et symptômes .....	22
1.4.2 Classification .....	23
1.4.2.1 Les diabètes primaires.....	23
1.4.2.2 Les diabètes secondaires .....	24
1.4.3 Physiopathologie du diabète .....	26
1.4.3.1 Dysfonction des cellules $\beta$ pancréatiques .....	26
1.4.4 Les complications du diabète de type 2 .....	27
1.4.5 Prévalence et incidence.....	29
1.4.5.1 Le diabète chez la population autochtone .....	30
1.5 Prévention et traitements du diabète de type 2.....	31
1.5.1 Habitudes de vie.....	31
1.5.2 Traitements pharmacologiques .....	32
1.5.3 Médecine traditionnelle et utilisation de plantes médicinales.....	39
1.6 <i>Rhododendron groenlandicum</i> .....	40
1.7 Modèle animal de l'insulino-résistance .....	41
1.7.1 Importance du modèle DIO dans l'étude des maladies métaboliques.....	42
2. Objectifs du projet .....	43
Chapitre B: Article 1 .....	44
Chapitre C: Article 2.....	68

Chapitre D: Discussion générale..... 106  
Chapitre E: Perspectives et conclusion ..... 111  
Bibliographie..... 114

## Liste des tableaux

### Article 1

<u>Tableau I</u> : Yield of <i>R. groenlandicum</i> constituents in the crude extract and fraction RGE-5 resulting from bioassay-guided fractionation.....	60
--	----

### Article 2

<u>Tableau I</u> : <i>General composition of the high-fat and CHOW diet used in this study</i> .....	88
<u>Tableau II</u> : <i>Body and organ weights at the end of treatment</i> .....	89
<u>Tableau III</u> : <i>Blood parameters in DIO mice at the end of the treatment</i> .....	90
<u>Tableau IV</u> : <i>Histological grade of liver steatosis and hepatic triglyceride (TG) levels</i> .....	91

## Liste des figures

### Introduction

<u>Figure 1</u> : Mécanisme d'action des PPARs et effets sur les tissus cibles .....	10
<u>Figure 2</u> : Voie de signalisation de l'AMPK; rôle dans le métabolisme des glucides et des lipides .....	12
<u>Figure 3</u> : Les principales voies intracellulaires de l'insuline.....	16
<u>Figure 4</u> : Activation du transporteur de glucose GLUT 4 dans les cellules musculaires (A) via la voie de la PI3K et dans les cellules adipocytaires (B) via la voie de la TC10 .....	18
<u>Figure 5</u> : Physiopathologie du diabète de type 2 .....	25
<u>Figure 6</u> : Courbe de Starling du pancréas pour la sécrétion d'insuline .....	27
<u>Figure 7</u> : Les complications du diabète de type 2.....	29
<u>Figure 8</u> : Estimation de la prévalence mondiale du diabète en 2015 selon la Fédération Internationale du Diabète (IDF).....	30
<u>Figure 9</u> : Mécanisme d'action des biguanides .....	33
<u>Figure 10</u> : Mécanisme d'action des glitazones .....	35
<u>Figure 11</u> : Mécanisme d'action des sulfonyles .....	36
<u>Figure 12</u> : Mécanisme d'action des glitinides .....	37
<u>Figure 13</u> : Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'alpha-glucosidase .....	38
<u>Figure 14</u> : Effet incrétine réalisé par des analogues de la GLP-1 et les inhibiteurs de la DPP-4 .....	39
<u>Figure 15</u> : Présentation de la fleur (A) et des feuilles (B) de <i>Rhododendron groenlandicum</i> .....	41
<u>Figure 16</u> : Souris C57BL/6 nourris avec une diète standard (CHOW) à gauche et souris C57BL/6 nourris avec une diète grasse (DIO) à droite.....	42

## **Article 1**

<b><u>Figure 1:</u></b> <i>Phytochemical fractionation (A) of the crude ethanol extract of Rhododendron groenlandicum (RGE-CEE) guided by an in vitro assay measuring the increase of triglycerides content in the 3T3-L1 adipocyte model cell line. Dose-response analysis (B) of the adipogenic action of active compounds found in fraction RGE-5</i> .....	61
<b><u>Figure 2:</u></b> <i>Adipogenic profile of R. groenlandicum's crude ethanol extract and fraction RGE-5</i> .....	62
<b><u>Figure 3:</u></b> <i>HPLC chromatograms of R. groenlandicum crude ethanol extract (A) and of fraction RGE-5 (B) resulting in three major compounds listed in Table I</i> .....	63
<b><u>Figure 4:</u></b> <i>Dose-response analysis of the adipogenic action of active compounds found in fraction RGE-5</i> .....	64

## **Article 2**

<b><u>Figure 1:</u></b> <i>R. groenlandicum treatment for 8 weeks decreases blood glucose levels and tends to lower body weight of DIO mice</i> .....	92
<b><u>Figure 2:</u></b> <i>Treatment with R. groenlandicum improves hepatic steatosis induced by HFD in DIO mouse model</i> .....	93
<b><u>Figure 3:</u></b> <i>R.groenlandicum increases GLUT4 protein content by stimulating the Akt pathway but not the AMPK pathway in skeletal muscle of treated mice</i> .....	94
<b><u>Figure 4:</u></b> <i>R. groenlandicum activates the AKT and AMPK pathways and tends to decrease SREBP-1 levels in the liver of DIO mice</i> .....	95
<b><u>Figure 5:</u></b> <i>R. groenlandicum is a weak activator of PPAR<math>\gamma</math></i> .....	97
<b><u>Figure 6:</u></b> <i>R. groenlandicum has weak effects on adipogenesis in WAT of DIO mice</i> .....	98

## Liste des abréviations

ACC: Acetyl-CoA carboxylase

ADA: *American Diabetes Association* / Association Américaine du Diabète

AG: Acides Gras

AMP: adenosine monophosphate

AMPK: *AMP-activated protein kinase*

ATP: Adenosine triphosphate

CAMKK: *Calmodulin-dependent protein kinase kinase*

CFTR: *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

DIO: *Diet induced obesity*

DMSO: Dimethyl sulfoxide

EF-2: *Elongation factor 2*

FAS: *Fatty Acid Synthase*

FAT: *Fatty acid transport*

FDA: *Food and Drug Administration (USA)*

FFAs: *Free fatty acids* / Acides gras libres (AGL)

G-6-P: Glucose 6-phosphate

G-6-Pase: Glucose 6-phosphatase

GLUT: *Glucose transporters* / Transporteur de glucose

GPAT: Glycerol-3-phosphate acyltransferase

GS: Glycogène synthase

GSK-3: Glycogène synthase kinase 3

HMG-CoA Reductase: hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

HSL: *hormone-sensitive lipase*

IDF: *International Diabetes Federation* / Fédération Internationale du Diabète (FID)

IKK: *Inhibitor of kappa B kinase*

IL: Interleukine

IR: *Insulin receptor* / Récepteur à l'insuline

IRS: *Insulin receptor substrate family* / Famille des substrats des récepteurs à l'insuline

LDL: *Low density lipoprotein*

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

mTOR: *mammalian Target of Rapamycin*

OGTT: *Oral glucose tolerance test*

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxykinase

PFK2 : Phosphofructokinase 2

PGC-1: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1*

PKC: Proteine kinase C

PPAR: *Peroxisome-proliferator-activated receptor*

R.g: *Rhododendron groenlandicum*

SOS: *Son of Sevenless*

SREBPs: *Sterol regulatory element-binding proteins*

T1D: *Type 1 diabetes* / Diabète de type 1 (DT1)

T2D: *Type 2 diabetes* / Diabète de type 2 (DT2)

TG: Triglycerides

TNF- $\alpha$ : *Tumor necrosis factor*

TZDs: Thiazolidinediones

VLDL: *Very low density lipoprotein*

*À mon mari Pascal Joly,  
À ma sœur Lila et  
à mes parents bien-aimés,  
Lioudmilla et Taoufik*



## Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier **Dr. Pierre Haddad** de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné l'opportunité de mener à terme un excellent projet de maîtrise. Je le remercie également pour sa très grande gentillesse, son écoute et je lui souhaite bon courage pour les dures épreuves de la vie.

Merci à tous les membres du jury d'avoir pris le temps de corriger et de donner des suggestions constructives afin d'améliorer la qualité du mémoire.

Je tiens à remercier également Antoine Brault et Diane Vallerand pour leur gentillesse, leur conseil et bien sûr pour leur précieuse aide, surtout, *in vivo*. Je n'oublierai jamais de la folle semaine de chirurgie que nous avons passé ensemble, juste avant le temps des fêtes, et parfois de nos folies lorsqu'on était « surpassé ».

Un gros merci pour l'équipe Arnason (Jose Antonio Guerrero et Ammar Saleem) de l'Université d'Ottawa, pour leur aide dans le fractionnement et l'analyse des composantes pures.

Je remercie aussi Lina Musallam pour son aide dans les corrections d'articles et ses précieux conseils pour l'écriture du mémoire.

De plus, j'ai eu la chance de faire connaissance d'une fille extraordinaire durant ma maîtrise, qui m'a soutenue autant lors de moments tristes que joyeux. Son amitié est un cadeau que je chérirai longtemps, merci Abir!

Un gros merci à toute l'équipe, surtout Hoda, pour son amitié et ses pensées, Despi, Nan, Caroline et Amine.

Finalement, je tiens à souligner et à remercier les organismes financiers IRSC (bourse offerte par le laboratoire Haddad) et la bourse de recrutement du département de pharmacologie qui m'ont permis de réaliser ce travail.

## Chapitre A : Introduction

### 1 INTRODUCTION

Les maladies métaboliques, plus précisément le diabète, furent signalées dès l'Antiquité où le plus ancien texte, le papyrus, a été retrouvé 1500 ans avant J.-C. Il y est fait mention que cette maladie est caractérisée par les symptômes d'abondance anormale des urines ainsi qu'une soif excessive. Ce n'est que 275 ans avant J.-C. que le terme «diabète», signifiant «qui passe à travers», fut utilisé par le grec Demetrios d'Apnée. Cette maladie ne fut décrite et étudiée qu'au premier siècle après J.-C. (1). Jusqu'à présent, le diabète est une maladie encore mal connue étant donné son étiologie complexe. Plus de 300 millions de personnes sont touchées et/ou à risque de développer le diabète, et ce nombre ne cesse de croître, selon la Fédération internationale du diabète (IDF). Le diabète est devenu la 4<sup>e</sup> ou la 5<sup>e</sup> cause de mortalité dans la plupart des pays développés selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Au Canada, la prévalence des personnes diabétiques atteint environ 6% de la population, selon l'Enquête Nationale sur la Santé de la Population (ENSP, Santé Canada 2006). Ce taux est encore plus important chez la population autochtone où la prévalence est près de 4 à 5 fois plus élevée. Ceci est dû à un mode de vie plutôt sédentaire, une prédisposition génétique, un régime alimentaire ainsi qu'une faible adhérence aux traitements médicamenteux (2). Le diabète est devenu un véritable fléau du XXI<sup>e</sup> siècle. Il doit être étudié d'une manière plus rigoureuse afin de freiner son ascension fulgurante.

Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par un défaut de sécrétion ou de l'action de l'insuline qui altère la régulation de la glycémie. Cette maladie touche davantage les adultes, mais de nos jours de plus en plus de jeunes adolescents en souffrent également. Outre l'exercice physique et un régime alimentaire adéquat qui peuvent réduire et prévenir la prévalence du diabète de type 2 de près de 42% (3), certains traitements médicaux diminuent aussi les impacts de cette maladie. Le but de ces traitements est de

réduire l'hyperglycémie en activant la sécrétion endogène de l'insuline (sulfamides et glitinides) ou en renforçant ses effets (thiazolidinediones et biguanides). Les populations autochtones touchées de plein fouet par ce fléau, n'adhèrent pas facilement aux traitements pharmacologiques conventionnels en partie à cause de leurs croyances ancestrales (4). C'est pourquoi, il est primordial de trouver une solution alternative qui tient compte de leurs aspirations culturelles.

Parmi la population Aborigène, la communauté Cri est la plus importante au Canada, avec une population joignant près de 72 000 individus (statistique Canada, 2002). Au Québec, il existe 9 communautés Cri réparties dans le Nord de la province, sur des territoires appelés Eeyou Istchii. Notre équipe vise à étudier leur médecine traditionnelle connue pour l'utilisation de plantes à fort potentiel thérapeutique. L'approche ethnobotanique prise par les membres de notre laboratoire fut basé sur un questionnaire distribué à 109 aînés provenant de 4 différentes communautés (5). Ce questionnaire englobait 15 symptômes associés au diabète tels qu'une augmentation de la soif et de l'appétit, une augmentation de la miction, des douleurs rénales, des engourdissements aux membres inférieurs, ainsi qu'une cicatrisation lente des plaies, etc... (4). Suite à cette étude, 17 plantes ont été identifiées comme ayant un potentiel thérapeutique. Leurs activités antidiabétiques étaient criblées à l'aide d'essais *in vitro* utilisant différentes lignées cellulaires (6, 7). Plusieurs paramètres tels que la capacité de captation du glucose dans la lignée musculaire C2C12, la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques INS 832/13, la stimulation d'adipogénèse chez les cellules adipocytaires 3T3-L1, ainsi que leur pouvoir antioxydant ont été évalués.

Parmi ces 17 plantes, l'extrait éthanolique du *Rhododendron groenlandicum* a démontré une très forte capacité à stimuler la différenciation cellulaire chez les 3T3-L1. Ce bioessai a servi de référence pour orienter le fractionnement de la plante, afin d'isoler et d'identifier les composantes actives responsables de son effet. De plus, des études *in vivo* sur le modèle animal d'insulino-résistance, DIO, ont été effectuées afin de déterminer les mécanismes d'action et de valider l'innocuité de la plante.

## **1.1 HOMÉOSTASIE ÉNERGÉTIQUE**

Les aliments consommés fournissent les macronutriments, tels que les glucides, les lipides et les protéines qui assurent l'apport nécessaire en substrat et composés biochimiques à l'ensemble des cellules de l'organisme.

Les glucides et les lipides sont les deux sources principales couvrant les besoins énergétiques de l'homme. Elles se regroupent et sont complémentaires du point de vue énergétique. Par contre, lors d'apport de nutriments, chacune d'elles présente des rendements de production différents, où des excès peuvent conduire à des troubles métaboliques tels que le diabète et l'obésité. Une régulation étroite de leurs métabolismes est donc primordiale pour la prévention de la résistance à l'insuline qui est à l'origine de ces deux affections métaboliques.

### **1.1.1 HOMÉOSTASIE DU GLUCOSE**

Le glucose est la source d'énergie principale des cellules. Il est métabolisé dans la plupart des cellules du corps pour former des molécules d'adénosine triphosphate (ATP), nécessaires à de nombreux processus cellulaires. Les molécules de glucose sont distribuées aux cellules via la circulation sanguine. Il est donc essentiel que la glycémie soit maintenue à des niveaux relativement constants se situant entre 4 et 7 mM (valeur à jeun). Cette glycémie est régulée par plusieurs mécanismes et organes. Le pancréas sécrète l'insuline qui permet l'absorption du glucose par les muscles et le tissu adipeux. Le foie, par contre, est capable de produire et sécréter du glucose ou, au contraire, de l'emmagasiner dépendamment des taux de glycémie dans le sang (8).

#### **1.1.1.1 Régulation hormonale de la glycémie**

Il existe deux principales hormones sécrétées par le pancréas qui régulent différemment la glycémie. Ces hormones sont l'insuline, hormone hypoglycémiant sécrétée lorsque les taux de glucose sanguin sont élevés et le glucagon, hormone à action hyperglycémiant, relâchée lorsque la glycémie est basse.

#### **1.1.1.1.1 Insuline**

Jusqu'à aujourd'hui, l'insuline est la seule hormone pancréatique connue à pouvoir abaisser les taux de glucose sanguin. Cette petite protéine de 51 acides aminés est sécrétée par les cellules  $\beta$  pancréatiques vers la circulation sanguine afin d'augmenter la captation et l'utilisation du glucose par les tissus périphériques. Sa biosynthèse, sa sécrétion ainsi que ses effets biologiques et voies de signalisation seront discutées en détails dans la section 1.3.

#### **1.1.1.1.2 Glucagon**

L'autre hormone qui régule l'homéostasie du glucose est le glucagon. Cette hormone est sécrétée par les cellules  $\alpha$  du pancréas et possède des propriétés antagonistes de l'insuline. Constitué d'un polypeptide de 29 acides aminés, le glucagon est relâché lorsque le taux de glucose sanguin baisse de façon significative dans l'organisme. C'est pour cela qu'on parle d'une hormone hyperglycémisante.

Son action se fait surtout durant le jeûne en se liant sur ses récepteurs spécifiques au niveau du foie. Elle stimule la glycogénolyse et la néoglucogenèse pour libérer le glucose vers la circulation sanguine et ainsi augmenter la glycémie (9, 10)

### **1.1.1.2 Régulation de la glycémie par le foie**

Le foie est le principal organe de réserve et de production de glucose. Par sa localisation, le foie est le premier organe à recevoir le glucose absorbé par l'intestin et il l'emmagasine sous forme de glycogène (glycogénogenèse). Cela permet de prévenir les fluctuations de la glycémie sanguine suite à une prise alimentaire (11). D'autre part, lorsque la glycémie baisse durant le jeûne, par exemple, le foie produit du glucose soit à partir du glycogène (glycogénolyse) soit par la synthèse *de novo* à partir des composés non glucidiques (néoglucogenèse).

**Glycogénogenèse :** La glycogène synthétase (GS) est l'enzyme responsable de l'incorporation de glucose dans les chaînes d'élongation du glycogène. L'activité de cette

enzyme est régulée par phosphorylation. En effet, lorsqu'elle est phosphorylée par les sérines/thréonine kinases, GSK-3 (*glycogen synthase kinase 3*) et PKA (*protein kinase A*), elle est inactive. Par contre, sa déphosphorylation par les PP1 (*protein phosphatase 1*), par exemple, l'active.

**Glycogénolyse :** Sous l'action de la glycogène phosphorylase, une unité de glucose-1-phosphate (G1P) est clivée de la chaîne du glycogène. Ce G1P est converti en glucose-6-phosphate (G6P) par l'enzyme phosphoglucomutase, puis déphosphorylé par la glucose-6-phosphatase (G6Pase) pour libérer du glucose dans la circulation sanguine. Cette dernière étape de déphosphorylation est l'étape limitant la relâche du glucose par le foie. L'activité de la G6Pase est contrôlée, entre autres, par deux facteurs de transcription soit le Foxo-1 et le PGC1 $\alpha$ , qui régulent son expression.

**Néoglucogénèse :** Lorsque les réserves en glycogène sont épuisées, le foie est capable de produire lui-même du glucose à partir des composés non glucidiques tels que le glycérol (provenant de la dégradation des triglycérides lors de la lipolyse), les acides aminés glucoformateurs (par la dégradation de certaines protéines) et du lactate (provenant du muscle) (12). Deux enzymes importantes contrôlent cette voie : la G6Pase et la phosphoénol-pyruvate carboxykinase (PEPCK), dont l'expression est aussi régulée par la Foxo-1 et la PGC1 $\alpha$ . Cette régulation passe par la voie insulino-dépendante de la PI3K /Akt qui phosphoryle et inhiberait Foxo-1. Ce facteur de transcription est caractérisé par un domaine de liaison à l'ADN, appelé domaine *forkhead* (13) qui dépend de la présence d'autres co-activateurs tels que la PGC-1 pour être activé.

Ainsi, le foie est capable d'utiliser ses réserves ou même lorsqu'elles sont épuisées, produit lui-même du glucose afin de contrer les effets de l'hypoglycémie. Non seulement il joue un grand rôle dans l'homéostasie du glucose, mais il est aussi impliqué dans celle des lipides.

### 1.1.1.3 Régulation du transport du glucose

Le glucose est une molécule hydrophile qui ne peut pas traverser la bicouche lipidique des membranes par simple diffusion. Il lui faut donc des protéines de transport membranaires appelées Glut qui vont assurer son transfert de la circulation sanguine vers le milieu intracellulaire des tissus périphériques, dépendamment du gradient de concentration. Les GLUTs sont composés de 12 domaines transmembranaires et comprennent environ 500 acides aminés (14). Il existe plusieurs isoformes dont la fonction, la spécificité du substrat (type d'hexose) et la cinétique diffèrent de même que l'expression tissulaire. Glut 4 a été démontré comme le transporteur prédominant au niveau du muscle squelettique et du tissu adipeux. Il joue donc un rôle important dans l'homéostasie du glucose.

**Le muscle squelettique** est le tissu majeur de l'organisme. Il constitue près de 45% de la masse corporelle chez l'homme. C'est pourquoi près de 80% du glucose circulant utilisé ou métabolisé est capté par les muscles squelettiques (15). Cette captation est assurée par l'activité des Glut 4 qui sont mobilisés sous l'action de l'insuline et de la contraction musculaire. Il y a alors translocation du transporteur du milieu cytoplasmique (site de stockage à l'état basal) vers la surface des membranes des myocytes (16). La translocation insulino-dépendante du Glut 4 est régulée surtout par la voie de la PI3K et de l'AKT (section 1.3.2) qui entraîne la phosphorylation de l'AS160 (17). Par ailleurs, la translocation induite par l'exercice et la contraction musculaire fait intervenir d'autres médiateurs intracellulaires, tels que le calcium, le monoxyde d'azote et la protéine kinase C (18-20).

L'insuline joue un rôle important dans la régulation du transport du glucose en modulant l'activité des GLUT 4 des tissus cibles. Ceci dit, cette hormone n'est pas la seule à pouvoir moduler sa translocation. L'AMPK (section 1.2), un complexe protéique présent en grande quantité dans le foie et le muscle, déclenche aussi le signal de translocation des Glut 4 à la surface membranaire, favorisant ainsi la captation du glucose par ces tissus.

**Le tissu adipeux** constitue lui aussi un important site d'absorption du glucose. Sa captation sanguine se fait aussi via la translocation des Glut 4 qui sont moins présents dans ce tissu que dans le muscle squelettique (21). La translocation des Glut 4 dans les adipocytes n'est pas régulée uniquement par la voie de la PI3K. Une nouvelle voie CAP/Cbl de la protéine TC10 (section 1.3.2) récemment découverte, stimule aussi sa translocation vers la surface membranaire (22) maximisant ainsi la captation du glucose insulino-dépendante dans le tissu adipeux (23, 24).

La modulation de l'activité des transporteurs de glucose, Glut 4, est gravement altérée chez les insulino-résistants et chez les diabétiques. Cela a pour conséquence une diminution de la captation et de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques. Il y a alors un surplus de glucose accumulé dans le sang qui a pour effet d'augmenter la glycémie (25).

### 1.1.2 Homéostasie des lipides

Les lipides constituent la plus importante réserve énergétique de l'organisme des mammifères. Ils proviennent essentiellement de l'alimentation (acides gras alimentaires) ou de la lipogenèse obtenue à partir de substrats non-lipidiques, tels que les acides aminés, le glycérol et le glucose. Leur biosynthèse se fait surtout dans le foie et dans le tissu adipeux et répondent à deux impératifs de la cellule; soit la synthèse des lipides de structure à partir d'acides gras (AG); soit la mise en réserve sous forme d'énergie lorsque les aliments ingurgités sont trop riches et excèdent les besoins de l'organisme.

L'accumulation de graisse est déterminée par l'équilibre entre la lipogenèse et la lipolyse (oxydation des acides gras). La lipogenèse est stimulée par une diète riche en hydrates de carbone, par l'insuline ainsi que par des facteurs de transcriptions tels que le SREBP-1c (*sterol regulatory element-binding protein-1c*) et le PPAR  $\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor gamma*). Quant à la lipolyse, elle est stimulée par le jeûne,



par le complexe AMPK (section 1.2) et par certaines hormones telles que la leptine et les hormones de croissance.

Les anomalies au niveau du métabolisme des lipides conduit souvent à l'insulino-résistance, à l'obésité, au diabète de type 2 et aux maladies cardiovasculaires (22).

#### **1.1.2.1 Régulation du métabolisme lipidique par la diète**

La diète et l'alimentation influencent beaucoup la glycémie et le taux de lipidémie dans l'organisme. Les gras polyinsaturés diminuent la lipogénèse par la suppression de l'expression de certains gènes du foie tels que le FAS (*Fatty acid synthase*). Par contre, une diète riche en glucides stimule la lipogénèse dans le foie et dans le tissu adipeux. Cela mène à une élévation de la glycémie et des taux de triglycérides (TG) plasmatiques.

Les taux de glucose sanguin stimulent la lipogénèse via plusieurs mécanismes. Tout d'abord, le glucose lui-même est un substrat de la lipogénèse. Par la glycolyse, le glucose est converti en acétyl-CoA, puis en malonyl-CoA, deux substrats de la synthèse des AG. Cette réaction déterminante est catalysée par l'enzyme clé qui est l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). De plus, le glucose, sans être converti, est aussi capable d'induire l'expression de plusieurs gènes lipogéniques tels que le FAS et l'ACC (26). Et finalement, il stimule la lipogénèse en activant la relâche de l'insuline et en inhibant celle du glucagon, deux hormones impliquées dans la régulation de la synthèse des AG (27).

#### **1.1.2.2 Régulation hormonale du métabolisme lipidique**

**L'insuline** régule le métabolisme lipidique en favorisant la synthèse des lipides et en inhibant leur dégradation (lipolyse). Son action sur la lipogénèse se fait principalement via la stimulation du facteur de transcription SREBP-1c (12, 28) dans les adipocytes et les hépatocytes (section 1.3.3.2).

**La leptine**, une adipokine synthétisée principalement par le tissu adipeux, est impliquée dans la lipogenèse. Elle joue un rôle dans la régulation de la prise alimentaire en contrôlant la satiété. Lorsque la leptine est relâchée, elle induit l'oxydation des AG et inhibe la lipogenèse via la stimulation de l'AMPK (27, 29).

**L'adiponectine**, une autre adipokine sécrétée principalement par le tissu adipeux, améliore la sensibilité à l'insuline. Cette hormone de 247 acides aminés se trouve soit dans le plasma, où son activité est régulée par le domaine C-terminal (30), soit dans le tissu adipeux. La synthèse de l'adiponectine est induite durant l'adipogenèse, où le préadipocyte se différencie en adipocyte mature. Ainsi, elle régule le métabolisme lipidique en augmentant la captation périphérique des AG et stimule leur l'oxydation musculaire. Cela permet de réduire les concentrations plasmatiques d'AG libres et de TG (31). L'expression de l'adiponectine plasmatique est significativement réduite chez les diabétiques et les obèses (32), mais par contre les taux de leptine y sont plus élevés. Ainsi, le ratio leptine/adiponectine est utilisé comme indice de l'apparition de troubles métaboliques.

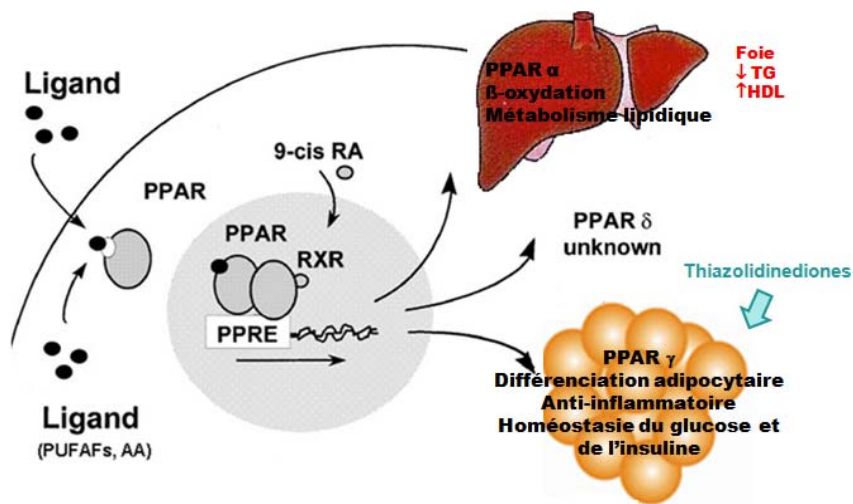
### 1.1.2.3 Régulation du métabolisme lipidique par la famille de PPARs

Les PPARs (*peroxisome proliferator activated receptors*) font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires stéroïdiens. Ils régulent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'homéostasie glucidique et lipidique (figure 1). Jusqu'à présent, trois différents isoformes ont été identifiés; PPAR  $\alpha$ , PPAR  $\delta$  et PPAR  $\gamma$ . Lorsque ces récepteurs nucléaires sont activés, ils forment des hétérodimères avec des récepteurs rétinoïques (RXR) afin de moduler la transcription des gènes cibles.

PPAR  $\alpha$  est exprimé majoritairement dans le foie et est responsable de la dégradation oxydative des AG. Son activation favorise la perte de la masse graisseuse par la stimulation du catabolisme lipidique. De ce fait, les agonistes spécifiques des PPAR  $\alpha$  tels que les fibrates améliorent la sensibilité à l'insuline (33).

Le PPAR  $\gamma$ , quant à lui, est responsable du stockage des AG et des TG dans les adipocytes. Il est exprimé dans plusieurs tissus, mais principalement dans les tissus adipeux où il est indispensable pour la différenciation adipocytaire. Les ligands naturels de PPAR  $\gamma$  sont des AG insaturés tels que l'acide arachidonique. Il existe aussi des ligands synthétiques et spécifiques provenant d'une classe de médicaments antidiabétiques oraux, connus sous le nom de thiazolidinediones.

Ainsi l'activation des PPAR  $\gamma$ , entre autre par l'insuline et le SREBP-1c (34, 35), améliore la sensibilité périphérique à l'insuline. Il régule l'expression de Glut 4, de l'acyl-CoA synthase (oxydation des AG), de la lipoprotéine lipase (LPL, responsable de l'hydrolyse des TG) et de la FATP (*Fatty acid transport protein*, responsable du captage des AG dans les tissus) (36). La stimulation du récepteur nucléaire PPAR  $\gamma$  permet la captation des AG circulants en favorisant leur stockage dans les tissus adipeux. Cela permet de diminuer le taux de lipidémie et permettre alors à l'insuline de capter le glucose sanguin par les tissus périphériques.



**Figure 1** : Mécanisme d'action des PPARs et leurs effets sur les tissus cibles. Modifié et adapté de (37).

## 1.2 L'AMPK : un « senseur » énergétique

La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) est une enzyme qui agit comme un détecteur du statut énergétique cellulaire. Elle participe à la coordination des signaux nutritionnels et hormonaux. L'AMPK est un complexe hétérotrimérique constitué d'une sous-unité catalytique  $\alpha$  contenant un domaine kinase (Ser/Thr), et de deux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ .

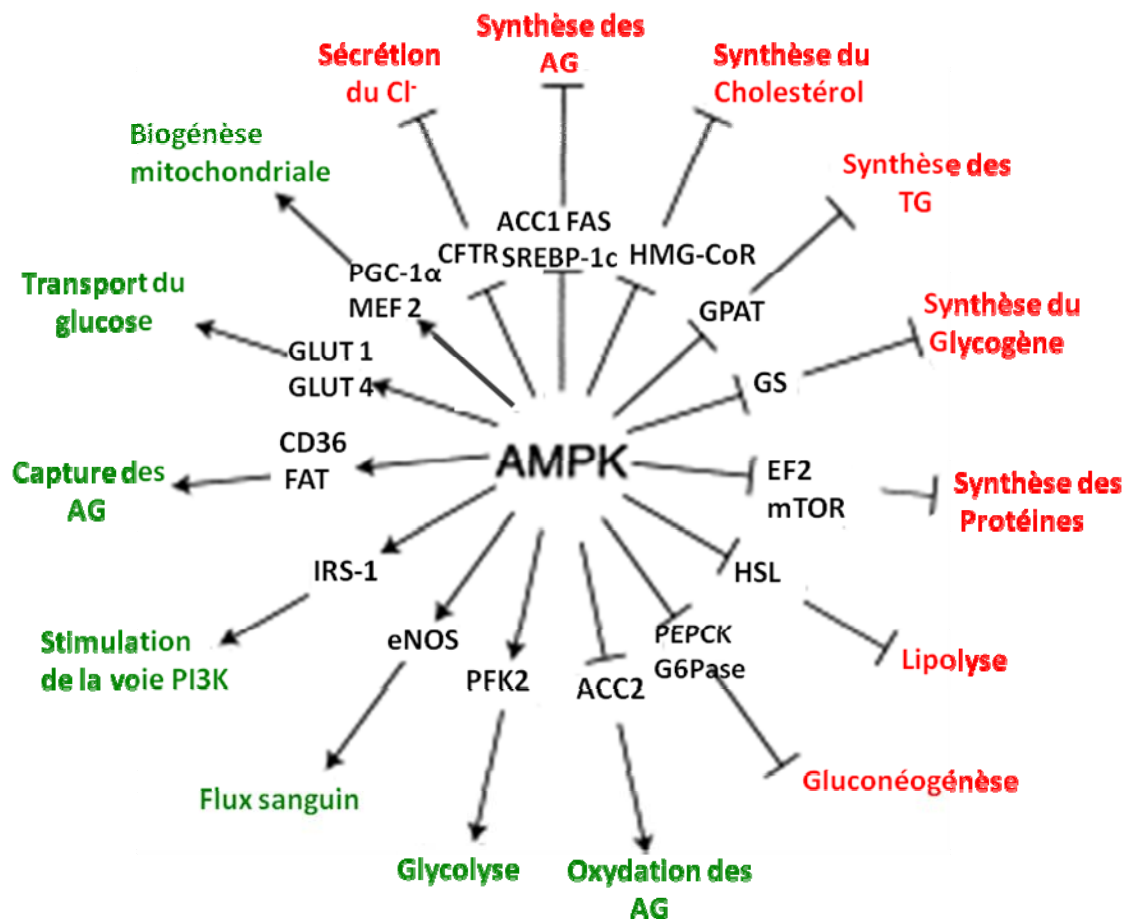
L'activation de l'AMPK dépend du ratio AMP/ATP. L'AMP en se liant à la sous-unité  $\gamma$ , induit un changement conformationnel de la sous-unité catalytique, exposant ainsi la thréonine 172 à la surface. La phosphorylation de ce résidu par la protéine kinase suppresseur de tumeur LKB1 (38) ou par le système Calmoduline, CaMKKs (39), activent l'AMPK. Par contre, la liaison de l'ATP sur la sous-unité  $\gamma$  produit l'effet inverse et inhibe l'activation de l'AMPK.

L'AMPK se retrouve un peu partout dans l'organisme et ses effets biologiques diffèrent quelque peu, dépendamment de sa localisation. Son rôle principal du maintien de l'homéostasie énergétique reste toutefois inchangé. Ainsi, l'AMPK favorise l'activation des voies cataboliques productrice d'ATP, nécessaire au fonctionnement cellulaire et inhibe les voies anaboliques consommatrices d'ATP (40).

### 1.2.1 AMPK et métabolisme des glucides

L'AMPK joue un rôle important dans la régulation du métabolisme glucidique (figure 2). L'activation de cette kinase stimule la translocation du Glut 4 à la membrane, en phosphorylant directement l'AS160 (41), augmentant ainsi la capture du glucose au niveau du muscle squelettique. D'autre part, la stimulation de l'AMPK inhibe le stockage du glucose sous forme de glycogène (réaction coûteuse en ATP) en inhibant la glycogène synthase via la phosphorylation de la GSK-3 (42). Au niveau hépatique, l'AMPK réprime l'expression des deux enzymes clés de la néoglucogenèse, soit la G6Pase et la PEPCK (43).

Compte tenu des ces effets sur le métabolisme du glucose, l'activation de l'AMPK pourrait être une nouvelle cible pharmacologique dans le traitement du diabète de type 2 et de l'insulino-résistance. En effet, ces propriétés métaboliques sont exercées et stimulées par deux grandes classes de médicaments antidiabétiques, à savoir les biguanides (Metformine) et les thiazolidinédiones (Rosiglitazone) qui activent chacun l'AMPK (44).



**Figure 2 :** Voie de signalisation de l'AMPK et son rôle dans le métabolisme des glucides et des lipides. En rouge, les voies inhibées et en vert les voies activées par l'AMPK. Adapté de (45).

### 1.2.2 AMPK et métabolisme des lipides

L'AMPK régule plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. Elle inhibe le HMG-CoA reductase (*3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl-CoA Reductase*) et l'ACC, deux enzymes limitantes de la synthèse du cholestérol et des AG. L'ACC catalyse la conversion d'acétyl-CoA en malonyl-CoA, substrat essentiel à la synthèse des AG dans les tissus lipogéniques. De plus, c'est un important régulateur de l'oxydation des AG dans plusieurs tissus incluant le muscle et le foie.

Il existe deux isoformes majeurs dans l'organisme, soit l'ACC1 et l'ACC2. L'ACC1 est surtout exprimé dans les tissus adipeux, le foie et les glandes mammaires et serait responsable de la synthèse des AG. L'ACC2 est exprimé en moindre quantité dans le muscle squelettique, le foie, le tissu adipeux et le cœur. Contrairement à l'ACC1, l'ACC2 jouerait un rôle dans l'oxydation des AG (lipolyse). Leur régulation se fait par modulation allostérique ou par phosphorylation / déphosphorylation. Ainsi, la phosphorylation par des protéines kinases telles que l'AMPK induit l'inactivation de l'ACC, alors que la déphosphorylation par les phosphatases induit leur stimulation (40, 46).

## 1.3 Insuline : contrôleur métabolique

L'insuline est une hormone peptique qui joue un rôle central dans la régulation des glucides et des lipides. Elle stimule l'utilisation du glucose comme source d'énergie, tout en empêchant l'utilisation des lipides.

### 1.3.1 Biosynthèse et sécrétion de l'insuline :

À l'état basal, l'insuline est sécrétée selon un mode pulsatile avec des pics de périodicité comprise entre 10 et 15 min (phase aigue) et des oscillations lentes et amples, comprises entre 60 et 120 min (47). La sécrétion de l'insuline est principalement stimulée par l'augmentation des taux sanguins de glucose. Cependant, certains stimuli neuronaux (e.g. l'odeur et la vue de la nourriture) ainsi que l'augmentation des taux sanguins d'acides aminés et des acides gras suite à l'ingestion d'un repas, sont capables de stimuler sa sécrétion.

Il est à noter que la synthèse et la sécrétion d'insuline sont deux événements indépendants l'un de l'autre. En effet, l'insuline est synthétisée, à tout moment, par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas à partir d'une molécule précurseur, la pro-insuline. Cette dernière subit de nombreuses modifications post-transcriptionnelles dans le réticulum endoplasmique. Sous l'action de nombreuses endopeptidases spécifiques, la partie centrale de la pro-insuline, peptide C, est clivée pour générer l'insuline mature : soit 51 acides aminés repartis en deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  reliées par des ponts disulfures (48). L'insuline mature est incorporée dans des vésicules de sécrétion avec le peptide C au niveau de l'appareil de Golgi. Ces vésicules s'accumulent dans le cytoplasme jusqu'à ce qu'il y ait un signal pour sécréter l'insuline. On remarque un taux élevé du rapport de la pro-insuline sur l'insuline mature chez les patients insulino-résistants (section 1.3.4), ce qui suggère qu'un dysfonctionnement au niveau du clivage du précurseur de l'insuline peut contribuer à cette pathologie (49).

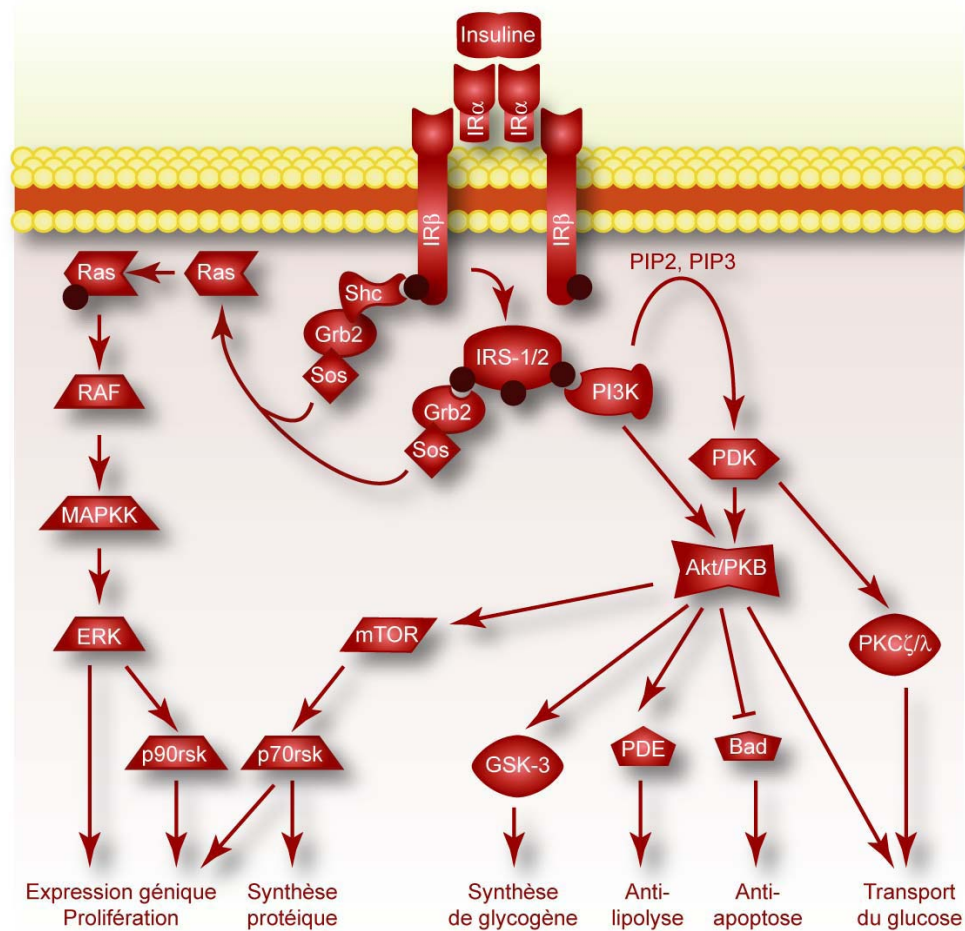
### 1.3.2 Signalisation de l'insuline:

Comme de nombreuses hormones, l'insuline exerce son action en se liant à des récepteurs spécifiques présents sur de nombreuses cellules de l'organisme. Ces récepteurs appartiennent à la famille des protéines à activité tyrosine kinase qui comprennent le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF), hépatique (HGF) et analogue à l'insuline (IGF-I). Ces récepteurs sont des protéines tétramériques constituées de deux chaînes  $\alpha$  extracellulaires qui sont reliées par des ponts disulfures à deux chaînes  $\beta$  transmembranaires. Chaque chaîne  $\beta$  contient le domaine tyrosine kinase dans sa partie intracellulaire responsable de l'activité catalytique du récepteur.

La liaison de l'insuline à son récepteur induit un changement de conformation des sous-unités  $\alpha$ , ce qui provoque l'activation des sous-unités  $\beta$  qui s'auto-phosphorylent mutuellement au niveau des résidus tyrosines et par conséquent, sont responsables de l'activité catalytique du récepteur. Ceci permet le dégagement des sites de fixation de l'ATP et d'autres substrats permettant la phosphorylation de plusieurs protéines cytoplasmiques dont les molécules IRS (*insulin receptor substrate*) et l'enzyme Shc (figure 3). Plusieurs domaines d'interaction tels que SH2 (Src-Homology-2) et PTH (PhosphoTyrosine Homology) permettant la connexion du récepteur à l'insuline et l'activation des voies de signalisation intracellulaire. Ces domaines d'interactions possèdent une très haute affinité pour des séquences spécifiques, déterminées par les acides aminés entourant les tyrosines phosphorylées. Ils se retrouvent dans plusieurs protéines adaptatrices comme celles de la famille d'IRS (22, 50) et ceux faisant partie de la cascade signalétique tel que la PI3K, PTP, p60, Cbl et APS (51).

Les principales voies de signalisation de l'insuline sont la voie des MAPK (*mitogen activated protein kinase*) et la voie des PI3K (*Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase*). Ces deux voies sont interconnectées et s'activent mutuellement (figure 3). Une autre voie a récemment été découverte et implique la protéine TC10. Elle a été retrouvée surtout au niveau des adipocytes (figure 4).





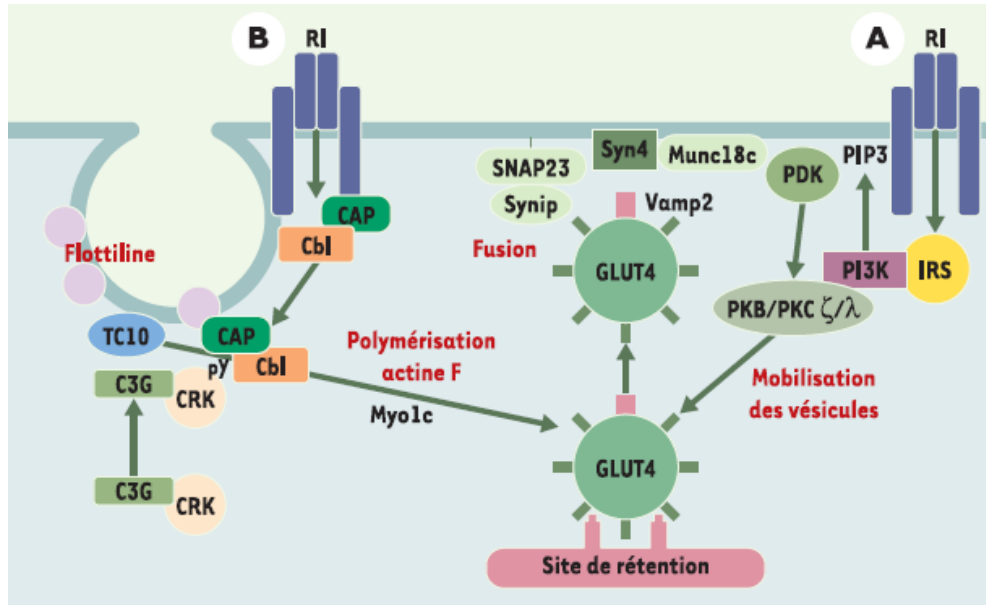
**Figure 3** : les principales voies intracellulaires de l'insuline. On distingue 2 voies majoritaires; Voies des PI3K et des MAPK (adapté de (48)).

**La voie des MAPK** est impliquée dans les actions mitogéniques de l'insuline. Elle peut être activée soit via les protéines IRS ou via la protéine adaptatrice SHC (*src homologous and collagen protein*) qui sont phosphorylées par le domaine tyrosine kinase du récepteur. Pour ce faire, ces protéines recrutent le complexe Grb 2 et le facteur d'échange nucléotidique SOS (*son of sevenless*). Ce complexe active la petite protéine G, Ras, qui recrute la protéine kinase Raf-1 à la membrane et l'active. Ce dernier phosphoryle et active la MAP kinase kinase (MEK). MEK à son tour va activer les deux protéines MAP kinases, ERK 1 et ERK 2. Une partie de ces protéines est transloquée au noyau où elles

activent des facteurs de transcription responsables de la prolifération et de la différenciation cellulaire (22, 48).

**La voie des PI3K** est responsable des effets métaboliques et de survie de l'insuline. La PI3K est une famille d'enzymes qui phosphorylent les phosphoinositides dans la membrane plasmique. Les produits générés peuvent ainsi moduler l'activité de plusieurs effecteurs cellulaires comme la PKC, la PKB/Akt et la PI3K elle-même. La PI3K est composée d'une unité régulatrice (contenant les domaines SH2, SH3 et PH) et d'une unité catalytique. Lorsque le récepteur de l'insuline est phosphorylé, l'IRS-1 est recruté ainsi que la PI3K. L'activation de cette dernière, par phosphorylation, génère la PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-tri-phosphate) responsable du recrutement de l'Akt et de son activation. Cette protéine, sérine/thréonine kinase, phosphoryle à son tour, plusieurs protéines intracellulaires impliquées dans l'action métabolique de l'insuline (en particulier le transport du glucose et la synthèse du glycogène) et dans la régulation négative de l'expression de gènes.

**La voie de TC10** est une autre voie secondaire de la signalisation de l'insuline impliquée au niveau des transporteurs de glucose (figure 4). Le récepteur à l'insuline phosphoryle également d'autres protéines telles que l'adaptateur moléculaire, ASP, et le pro-oncogène Cbl. La phosphorylation de l'ASP permet le recrutement et l'activation de c-Cbl qui interagit d'autre part avec l'adaptateur CAP qui n'est exprimé que dans les adipocytes. Cette liaison permet la migration du complexe CAP-Cbl vers les zones particulières de la membrane appelées radeaux lipidiques. Cbl recrute alors la protéine Crk II et le facteur d'échange C3G qui activent la petite GTPase, la TC10, favorisant la polymérisation de l'actine (48). Cette activation va permettre la translocation de la Glut 4 en réponse à l'insuline dans le tissu adipeux, indépendamment de l'activation de la voie PI3K (26).



**Figure 4** : Activation et translocation du transporteur de glucose, GLUT 4, dans les cellules musculaires (A), via la voie de la PI3K et dans les cellules adipocytaires (B), via la voie de la TC10 (adapté de (48)).

### 1.3.3 Effets physiologiques de l'insuline :

L'insuline est une hormone primordiale et essentielle à l'organisme. Elle possède plusieurs fonctions vitales, dont les plus importantes sont la régulation du glucose et des lipides.

#### 1.3.3.1 Métabolisme des glucides

L'action de l'insuline a pour but de diminuer l'hyperglycémie postprandiale. Pour atteindre cet objectif, elle active la voie de la PI3K/AKT. Ceci résulte en l'activation de la translocation du transporteur Glut 4 du compartiment membranaire intracellulaire vers la surface de la membrane plasmique et la captation du glucose dans les muscles squelettiques et les tissus adipeux. De plus, l'insuline favorise l'utilisation du glucose en stimulant la phosphorylation oxydative mitochondriale des muscles squelettiques, ce qui résulte en

l'augmentation de la production de l'ATP (52). Au niveau hépatique et musculaire, l'insuline induit la phosphorylation de la GSK-3 activant la GS et par conséquent, la synthèse du glycogène (glycogénogénèse).

L'insuline agit aussi au niveau de la synthèse *de novo* du glucose hépatique en diminuant l'expression de la PEPCK et de la G6Pase, enzymes clés de la néoglucogenèse. Cette régulation se fait via l'inhibition des facteurs de transcription FOXO-1 et PGC-1  $\alpha$ .

### **1.3.3.2 Métabolisme des lipides**

Pour assurer l'utilisation des glucides comme source d'énergie, l'insuline inhibe l'utilisation des lipides. Ainsi, cette hormone stimule la lipogenèse au niveau du foie et inhibe la lipolyse au niveau du tissu adipeux.

L'activation de la voie PI3K/AKT par l'insuline, stimule l'expression et l'activation du SREBP-1c et par le fait même, induit l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse, la synthèse des AG (ACC, FAS) et la synthèse des TG (GPAT : *Glycerol-3-phosphate acyltransferase*) (53).

Une surexpression au niveau du SREBP-1c, observée dans certains modèles de rongeurs diabétiques dont les DIO, mène à une augmentation de TG dans le foie, ayant pour conséquence l'apparition de stéatoses hépatiques (54). Celles-ci peuvent être l'origine de maladies métaboliques et causer la résistance à l'insuline.

### **1.3.3.3 Métabolisme des protéines**

L'insuline stimule la synthèse des protéines en augmentant l'entrée des acides aminés dans les cellules de l'organisme. D'autre part, elle agit sur la phosphorylation des protéines ribosomales, augmentant leur synthèse (55, 56).

### 1.3.4 La résistance à l'insuline

L'insulino-résistance est définie par une diminution de la sensibilité à l'insuline au niveau des tissus cibles (le muscle, le tissu adipeux et le foie). Donc l'insuline, à des concentrations normales, est incapable de produire une réponse biologique adéquate, c'est-à-dire, le contrôle de la glycémie. Cette anomalie de l'insuline a pour conséquence, une accumulation du glucose sanguin, stimulant le pancréas à sécréter davantage l'insuline pour compenser la hausse de la glycémie, créant ainsi une hyperinsulinémie jusqu'à l'épuisement complet de l'organe (57).

**Tissus affectés :** L'insulino-résistance affecte principalement trois tissus cibles soit; le tissu adipeux, le muscle et le foie.

Au niveau du **tissu adipeux**, l'action inhibitrice de l'insuline sur la lipolyse est altérée créant une augmentation des concentrations plasmatiques des acides gras libres (AGL). Ceux-ci se retrouvent dans la circulation sanguine et sont responsables de la stimulation de la néoglucogenèse hépatique. De plus, la diminution de la captation des AG au niveau du tissu adipeux, affecte le taux de lipidémie sanguin. Cet excès se retrouve emmagasiné ailleurs, notamment dans le muscle et/ou dans le foie.

**Le muscle squelettique**, endroit essentiel de mise en réserve des glucides lors des repas, est le principal site de la résistance à l'insuline. La perte de sensibilité à l'insuline au niveau du muscle est liée à des altérations spécifiques de la transduction du signal de l'hormone. Ceci comprend une défaillance au niveau de la phosphorylation des substrats de l'insuline (IRS) et de leur expression, ainsi qu'une réduction de l'activité de la PI3K (22). La résistance à l'insuline affecte aussi les transporteurs de glucose, en particulier les Glu 4. En effet, il y a une diminution de l'expression des Glu 4 et une diminution de leur translocation basale. Par conséquent, la captation du glucose et son métabolisme sont altérés. Il y a alors moins de synthèse du glycogène ainsi qu'une réduction de l'oxydation des glucides (49).

**Le foie**, par son rôle dans le métabolisme glucidique et lipidique, régule la glycémie en inhibant la néoglucogenèse et en activant la glycogénogenèse sous l'action de l'insuline.

De ce fait, une insulino-résistance au niveau de ce tissu, mène à une altération du métabolisme glucidique et lipidique, ayant pour conséquence une diminution de l'emmagasinage de glucose sous forme de glycogène et une production excessive de glucose hépatique. De plus, le surplus de lipides emmagasiné au niveau du foie peut causer de l'inflammation et des stéatoses hépatiques, aggravant ainsi l'état de l'organe.

L'inflammation joue un rôle important dans l'insulino-résistance. En effet, l'accumulation de gras dans les tissus cibles de l'insuline, crée un stress au réticulum endoplasmique. Ce stress mène à la production de nombreuses cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (58).

L'insulino-résistance est donc un état pathologique qui affecte plusieurs tissus importants, résultant en une hyperglycémie et une dyslipidémie. De plus, un autre facteur qui est l'obésité, bien mis en évidence aujourd'hui, prédispose à la résistance à l'insuline et par conséquent à l'apparition du diabète de type 2.

## 1.4 Diabète : un syndrome métabolique

Le mode de vie d'aujourd'hui dans les pays développés et en voie de développement contribue à une augmentation de la prévalence des maladies métaboliques. En effet, la sédentarité, le manque d'exercice physique et un régime riche en calorie débalancent l'homéostasie énergétique. Ce déséquilibre peut engendrer un surplus de poids et un désordre du système métabolique.

Le syndrome métabolique est défini comme étant un ensemble de facteurs qui accroît le risque de développer le diabète de type 2, les maladies cardiaques et les accidents cérébraux vasculaires (ACV). Parmi ces facteurs, on retrouve un surplus de poids ou une obésité au niveau abdominal, un taux élevé de triglycérides sanguins ( $> 1,7$  mM), une hypertension artérielle, un taux bas de cholestérol HDL ( $<1,3$  mM) ainsi qu'un taux élevé de glucose sanguin ( $> 7$  mM à jeun). Ces facteurs mènent à une résistance à l'insuline (59). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) rajoute d'autres facteurs à cette liste soit; la présence de l'inflammation, mesuré par le taux de la protéine C-réactive (60), et la présence d'une microalbuminurie, c'est-à-dire un taux élevé d'albumine dans les urines.

Pour qu'un individu soit considéré comme ayant le syndrome métabolique, il faut qu'il possède au moins 3 des facteurs mentionnés ci-haut. Le suivi de l'apparition de ces symptômes permet de diagnostiquer les désordres métaboliques et remédier à la situation par les traitements adéquats.

### 1.4.1 Définition et symptômes

Le diabète mellitus (sucré) est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique. Une surproduction de glucose au niveau du foie, une diminution de l'absorption du glucose au niveau des muscles et un défaut de stockage d'acides gras aux niveaux des tissus adipeux augmentent le risque de développer le diabète de type 2

(figure 5). En effet, ces facteurs contribuent à l'établissement d'un état d'insulino-résistance, caractéristique majeure du syndrome métabolique.

Le diabète de type 2 est diagnostiqué par un taux de glycémie supérieur à 7 mM (126 mg/dl) à jeun ou à un taux surpassant les 11 mM (200 mg/ dl) après stimulation par l'ingestion de sucre (glycémie postprandiale) ou à n'importe quel moment de la journée (WHO 1999). Plus la glycémie est élevée sur une longue période, plus les lésions et les complications seront sévères et nombreuses, affectant même les artères et touchant les nerfs. Le diabète est une maladie multifactorielle avec une étiologie complexe, d'autant génétique (mutation au niveau des récepteurs de l'insuline, défaut au niveau des Glut 4) qu'acquise (mode de vie, sédentarité, diète calorique et vieillissement).

## 1.4.2 Classification

La classification du diabète a longuement été revue et révisée depuis sa première classification en 1979 (61). Finalement, l'Association Américaine du Diabète (ADA) a proposé de nouveaux critères de diagnostic ainsi qu'une nouvelle classification selon laquelle le diabète est primaire ou secondaire (62).

### 1.4.2.1 Les diabètes primaires

Les diabètes primaires sont classés en 3 types; le diabète de type 1 (environ 5 à 10% de la population diabétique), le diabète de type 2 (90 à 95%) et le diabète gestationnel.

Le diabète de type 1, autrement appelé diabète insulino-dépendant ou diabète juvénile, est une maladie majoritairement auto-immune (90% des cas). Elle est le résultat de la destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. Dans de cas rares, ce type de diabète est considéré comme étant idiopathique, où les causes restent encore inconnues. La destruction des cellules  $\beta$  conduit à une carence quasi complète de l'insuline et par conséquent, une élévation de la glycémie sanguine. Lorsque cette hyperglycémie se manifeste cliniquement, près de 80 % des cellules  $\beta$  sont ravagées. C'est une maladie silencieuse qui débute souvent vers le jeune âge (enfance ou adolescence) et se manifeste la



plupart du temps vers la vingtaine. Elle est diagnostiquée par une glycémie élevée ainsi que par la présence d'auto-anticorps (contre les îlots pancréatiques et contre l'insuline) dans la circulation sanguine (61). Le diagnostic de la maladie doit se faire rapidement pour débiter l'insulinothérapie (injection d'insuline exogène) et préserver le maximum et le plus longtemps possible, le peu de cellules  $\beta$  restantes intactes.

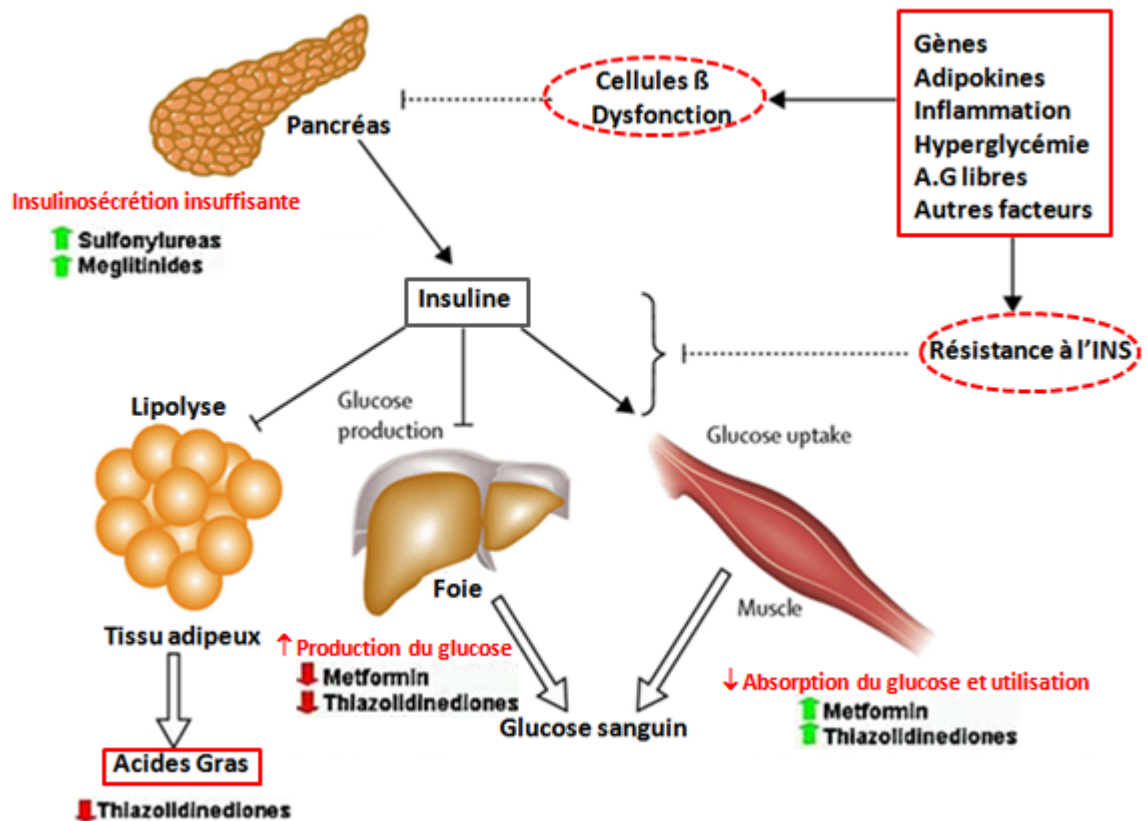
Le diabète de type 2 (DT2) souvent appelé diabète adulte ou insulino-indépendant, affecte habituellement les adultes âgés de plus de 40 ans. Par contre, de plus en plus de jeunes enfants ayant un surplus de poids en souffrent également (63). L'état de résistance à l'insuline accompagné d'un dysfonctionnement de sécrétion de l'insuline joue un rôle déterminant et causal dans le développement de ce type de diabète. De plus, le diabète de type 2 est très souvent associé à l'obésité. En effet, plus de 80% des diabétiques de type 2 sont obèses. Bien que le mode de vie et la suralimentation semblent être les principaux facteurs déclencheurs de cette maladie, des éléments génétiques sont aussi impliqués. En effet, l'hérédité augmente d'environ 2 à 4 fois (64) le risque de contracter ce type de diabète, si un des parents en a souffert.

Le diabète gestationnel ou diabète de grossesse est une préoccupation croissante. Au Canada, il touche environ 7% des femmes enceintes et ce taux est encore plus important chez les femmes autochtones où la prévalence atteint les 13% (65). Ce type de diabète survient au cours de la grossesse, surtout pendant le 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> trimestre où les besoins en insuline sont beaucoup plus importants qu'en temps normal. De plus, certains facteurs tels que les hormones de croissance et placentaires diminuent l'action de l'insuline (66). Le diabète gestationnel est détecté par la présence élevée de glucose sanguin chez la femme enceinte. Il expose la mère ainsi que l'enfant à plusieurs risques et voir même la possibilité d'être atteint de diabète de type 2 au cours de leur vie.

#### **1.4.2.2 Les diabètes secondaires**

Les autres types de diabètes sont souvent appelés diabètes spécifiques, puisqu'ils sont liés à une cause bien définie. Ces causes peuvent être de nature génétique, comme le diabète MODY (*Maturity Onset Diabetes Of the Young*), et affecter la fonction des cellules

β. Le diabète secondaire peut aussi être découlé de l'évolution d'une autre maladie, tels que les maladies endocrines (Syndrome de Cushing, hyperthyroïdie), les maladies du pancréas (pancréatite, cancer du pancréas) et les maladies du foie (cirrhose, hépatite C). Certains médicaments comme les corticoïdes peuvent aussi induire ce type de diabète.



**Figure 5 :** Physiopathologie du diabète de type 2. Le diabète de type 2 touche principalement 4 principaux organes; Le pancréas, le tissu adipeux, le foie et le muscle. Une dysfonction au niveau des cellules β engendre une sécrétion insuffisante de l'insuline (INS). Une altération au niveau du foie mène à une surproduction du glucose hépatique. Aux niveaux des tissus adipeux, on remarque une activation de la lipolyse menant à un taux anormal des acides gras (A.G). Une anomalie au niveau du muscle conduit à une diminution de l'absorption du glucose et de son utilisation. Tous ces facteurs mènent à une hyperglycémie (adapté de (64)).

### 1.4.3 Physiopathologie du diabète

Le diabète de type 2 est le résultat de l'association d'un déficit de sécrétion de l'insuline, due à une anomalie des cellules  $\beta$  pancréatiques, et d'un déficit de l'action de celle-ci menant à sa résistance (expliqué à la section 1.3.4). Un autre facteur vient s'y ajouter, il s'agit d'une production accrue du glucose par le foie. Cette production excessive contribue certainement à élever la glycémie sanguine des diabétiques et est impliquée dans l'étiologie de la maladie (figure 5).

#### 1.4.3.1 Dysfonction des cellules $\beta$ pancréatiques

Les anomalies de la sécrétion de l'insuline est un dénominateur commun de toutes les formes du diabète. Le dysfonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques apparaissent au tout début de la maladie, aux stades modérés de l'hyperglycémie à jeun et de l'intolérance au glucose.

On remarque chez les diabétiques une relation entre la sécrétion de l'insuline et la glycémie à jeun, formant une courbe appelée « courbe de Starling » (figure 6). Cette courbe en forme de cloche représente l'insulinémie (en ordonnées) et la glycémie à jeun (en abscisse). L'insulinémie augmente en fonction de la glycémie jusqu'à l'atteinte du seuil limite fixé à 7,2 mM (1,30 g/L), où l'insulino-sécrétion diminue avec l'ascension de la glycémie (49). Ce seuil de transition représente l'incapacité des cellules  $\beta$  pancréatiques à libérer les granules d'insuline et à s'adapter à cette hyperglycémie. Ceci marque le début du diabète de type 2.

Il est à noter que la sécrétion basale de l'insuline chez les individus sains s'effectue selon un mode pulsatile (47) avec des oscillations plus ou moins amples. Cette sécrétion pulsatile s'avère être beaucoup plus faible chez les diabétiques après ingestion d'un repas. Il y a alors perte du rythme oscillatoire rapide de la sécrétion de l'insuline.

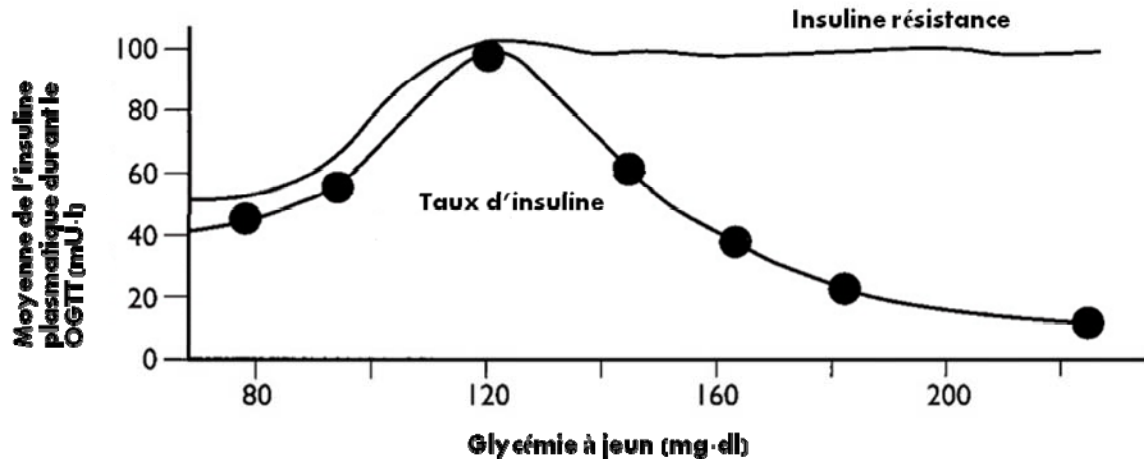


Figure 6 : Courbe de Starling du pancréas pour la sécrétion d'insuline (adapté et modifié de(67))

Plusieurs facteurs mènent aux dysfonctionnements des cellules  $\beta$ . Premièrement, l'exposition chronique de ces cellules à l'hyperglycémie et aux acides gras diminuent progressivement la sécrétion de l'insuline en réponse aux stimuli de glucose (68, 69). D'autre part, les radicaux libres, la glycation des protéines ainsi que les plaques amyloïdes retrouvées sur les îlots de Langerhans (70) contribuent à la réduction de la masse des cellules  $\beta$  et par conséquent la perte de leurs fonctions. En effet, le nombre des cellules  $\beta$  est environ 20 à 40% plus faible chez les diabétiques de type 2 comparativement aux individus sains (71).

#### 1.4.4 Les complications du diabète de type 2

Un diabète mal contrôlé et mal suivi peut avoir des conséquences lourdes pour la santé de l'individu (figure 7). Les complications sont principalement vasculaires touchant les petits vaisseaux (microvasculaires) et les plus gros (macrovasculaires). Les mécanismes par lesquels ces complications surviennent comprennent; la glycosylation des protéines

sériques avec formation de produits terminaux de glycosylation (*advanced glycation endproducts*), la production de radicaux libres (superoxydes), l'activation de la protéine kinase C qui augmente la perméabilité vasculaire et cause la dysfonction endothéliale, ainsi que l'activation de la voie d'hexosamine (63).

Les atteintes microvasculaires mènent à 3 principales pathologies; la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie. Les atteintes macrovasculaires sont causées par une dyslipidémie, ainsi qu'une insulinémie et une glycémie élevées. Ces atteintes peuvent mener à des affections plus graves pouvant même être mortelles. En effet, plus de 3 diabétiques sur 4 meurent à la suite de complications de l'athérosclérose (72). De plus, le diabète aggrave le risque de voir survenir des accidents cardiovasculaires par l'obstruction des vaisseaux sanguins du cœur (infarctus) et du cerveau, entraînant des accidents vasculaires cérébraux (AVC).

D'autres types de complications peuvent apparaître au cours de la maladie telles qu'une sensibilité accrue aux infections bactériennes et mycosiques, provoquant des infections urinaires et cutanées. Aussi, un taux élevé de corps cétoniques et de sucre dans les urines provoque souvent une acidocétose qui peut être sérieuse et grave, pouvant entraîner un coma.

Un contrôle adéquat et rigoureux de la glycémie et des lipides chez les diabétiques peut prévenir ces complications. Cependant une fois atteintes, elles ne peuvent être renversées et guéries facilement.

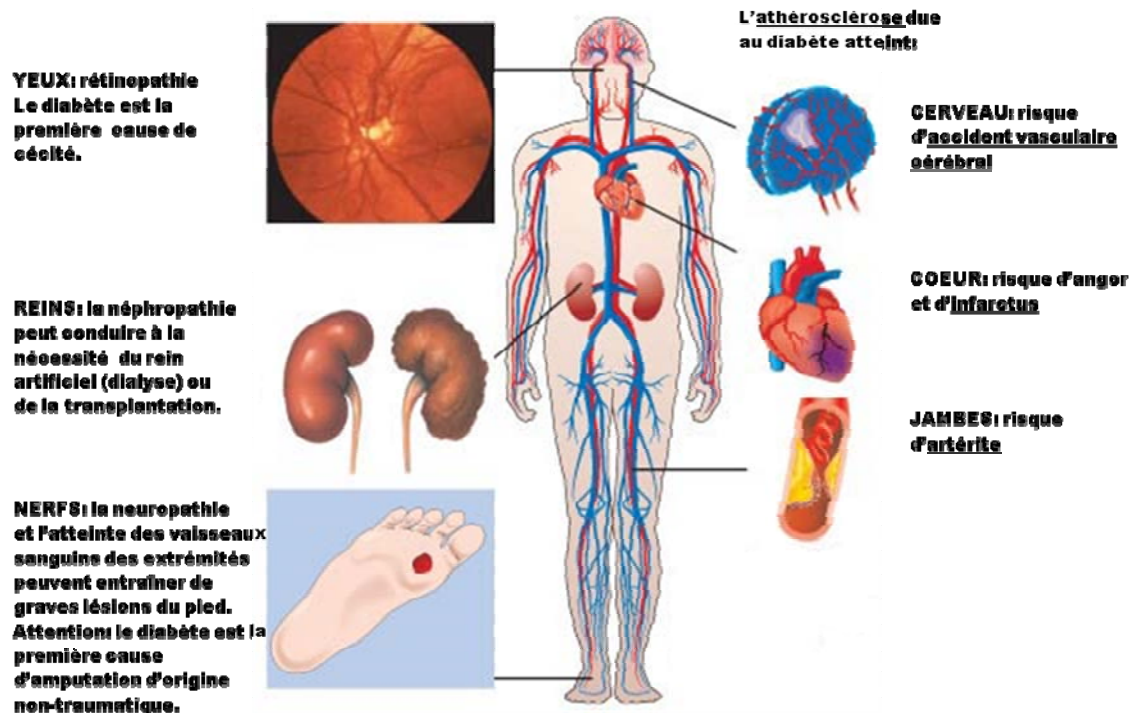


Figure 7 : Les complications du diabète de types 2 (adapté et modifié (73))

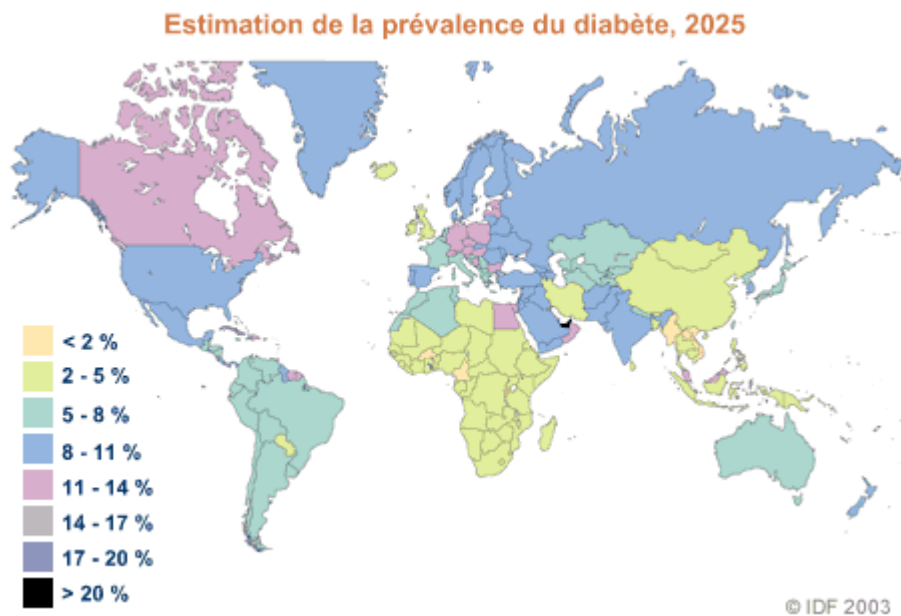
Une hyperglycémie causée par le diabète endommage autant les petits vaisseaux sanguins que les plus gros tels que les artères. Avec le temps, le diabète accroît les risques de graves complications touchant les organes vitaux.

### 1.4.5 Prévalence et incidence

Le diabète atteint des proportions épidémiques depuis déjà quelques décennies. Sa prévalence augmente à un rythme alarmant à travers le monde. En 2003, la Fédération Internationale du Diabète (IDF) a estimé que près de 200 millions de personnes dans le monde étaient atteintes de diabète. Ce chiffre devrait passer à 333 millions en 2025, représentant environ 6,3% de la population mondiale (figure 8). Le diabète s'est d'abord développé dans les pays riches, mais se propage de plus en plus dans les pays en voie de

développement. En effet, d'ici 25 ans le nombre de personnes atteint de diabète dans ces pays augmentera de 150% (74).

Cette hausse de la prévalence est un véritable fardeau économique. En effet, le diabète coûte à l'économie mondiale environ 376 milliard \$, soit 11,6% des dépenses mondiales totales de la santé (75).



**Figure 8 :** Estimation de la prévalence mondiale du diabète en 2025 selon la Fédération International du Diabète (IDF).

#### 1.4.5.1 Le diabète chez la population autochtone

De toutes les régions du monde, l'Amérique du Nord est celle la plus touchée par le diabète de type 2. En effet, près de 10,2% de sa population adulte en est atteint (75). Au Canada, c'est chez la population autochtone que l'on retrouve le plus grand taux de diabétiques, où la prévalence atteint 21,6% (76). Le diabète est une maladie qui a fait son apparition récemment chez les autochtones puisque, autrefois, ils avaient un mode de vie

nomade et actif avec une alimentation plus saine. Par contre, avec l'acquisition du mode de vie actuel, plutôt sédentaire, et les habitudes alimentaires riches en calories (77), le risque d'être atteint d'un syndrome métabolique est augmenté énormément. Outre ces facteurs environnementaux, les autochtones sont génétiquement prédisposés à emmagasiner davantage l'énergie que leur procure leur alimentation, ce qui augmente le risque qu'ils deviennent obèses, s'ils ne la dépensent pas adéquatement (78). De plus, au Canada, les autochtones vivent principalement dans des communautés éloignées des grands centres urbains et par conséquent, l'accès aux services de santé y est restreint. De plus, par leurs culture et croyances ancestrales, les autochtones adhèrent mal aux traitements médicamenteux. Cette inobservance diminue leur chance de contrôler la glycémie et d'éviter les complications, une fois la maladie installée.

## **1.5 Prévention et traitements du diabète de type 2**

La prévention et le traitement du diabète de type 2 ont pour objectif de maintenir une glycémie stable et d'éviter les complications et / ou de retarder l'évolution de la maladie.

### **1.5.1 Habitudes de vie :**

Le diabète de type 2 est une maladie causée en grande partie par un mode de vie sédentaire et par une alimentation non adéquate. Connaissant les facteurs de risque au développement de cette maladie, il est plus facile de prévenir son apparition en mangeant sainement (entre autre en augmentant la quantité de fibre) et en contrôlant le poids corporel par la pratique régulière d'activités physiques.



### 1.5.2 Traitements pharmacologiques :

Si les changements de style de vie qui sont difficiles à mettre en place et à maintenir, ne suffisent pas au contrôle de la glycémie, il est alors important de faire appel aux traitements médicamenteux.

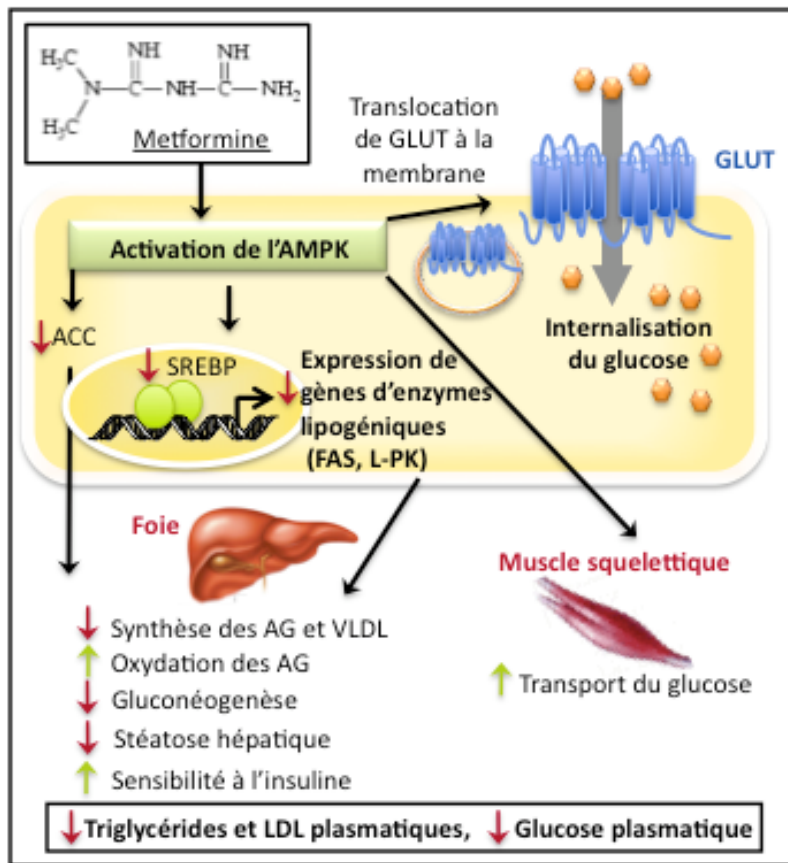
Le principal traitement est l'insuline exogène utilisée lors des traitements aigus de la maladie ou lorsque les antidiabétiques oraux ne suffisent plus. L'injection de l'insuline est utilisée pour compenser la déficience ou l'absence de la sécrétion endogène. Les antidiabétiques oraux, quant à eux, activent la sécrétion de l'insuline endogène (sulfamides hypoglycémiant, répaglinide) ou renforcent ses effets (metformine). Ils peuvent aussi modifier l'absorption intestinale du glucose et ainsi abaisser les taux de glycémie sanguine.

Actuellement sur le marché, il existe principalement 5 classes de médicaments antidiabétiques; les biguanides, les glitazones, les glitinides, les sulfonylurées, les inhibiteurs de l'alpha-glucosides (79) et les incrétines (analogues GLP-1 et inhibiteurs DPP-4).

#### Les biguanides

Les biguanides agissent comme des potentialisateurs des effets de l'insuline. La metformine (Glucophage®) est le plus important médicament de cette classe et le seul à être disponible sur le marché. Il agit en augmentant la sensibilité à l'insuline au niveau du métabolisme glucidique et lipidique. D'une part, il stimule la captation du glucose en induisant la translocation basale des Glut4 dans le muscle squelettique. D'autre part, elle diminue la production hépatique du glucose et stimule son stockage sous forme de glycogène dans le foie. De plus, la metformine joue un rôle dans le métabolisme des lipides en activant l'oxydation des AG et en inhibant les enzymes de la lipogenèse via l'activation de l'AMPK, aidant à abaisser les taux de TG sanguins (figure 9). Elle vise donc à diminuer la résistance de l'insuline et à abaisser la glycémie sanguine. Son efficacité pourrait être optimale si combinée avec les sulfonylurées, les glitinides, les glitazones, les inhibiteurs de la DPP-4 et l'insuline (80).

La metformine n'est pas métabolisée par biotransformations; elle est présente dans le plasma sous forme libre et est éliminée par le rein (sécrétion tubulaire et filtration glomérulaire). Donc, en cas d'insuffisance rénale, la metformine risque de s'accumuler et est donc une contre-indication à sa prescription (81).



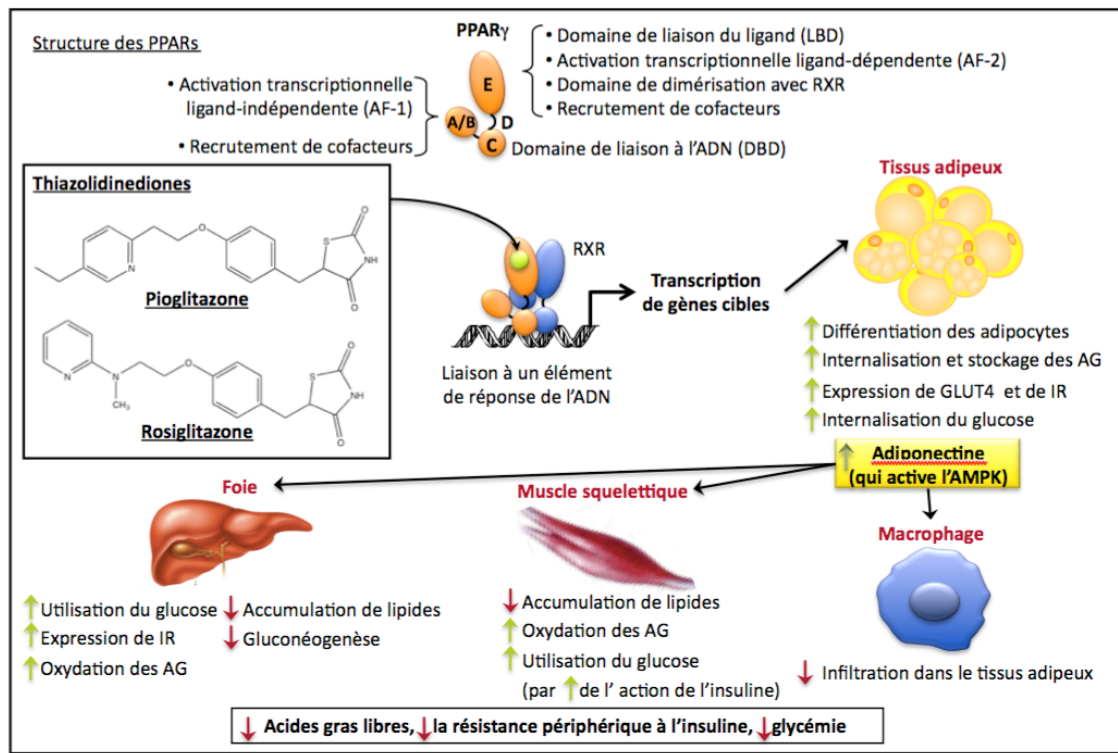
**Figure 9** : Mécanisme d'action des biguanides (adaptée et modifiée de (80)).

### Les glitazones

Les glitazones ou les thiazolidinédiones tels que la rosiglitazone (Avandia®) sont classés comme agents insulinosensibilisateurs. Ce sont des agonistes des récepteurs PPAR  $\gamma$  qui modulent la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose (activation des Glut 4 et diminution de la gluconéogenèse hépatique (82)) et dans le

métabolisme des lipides (stimulation de l'adipogenèse et augmentation du stockage des AG). L'activation des PPAR  $\gamma$  stimule aussi la libération d'adiponectine par le tissu adipeux (83) et active la voie de l'AMPK dans le foie et le muscle squelettique (section 1.1.2.3). Les glitazones améliorent aussi le profil lipidique en stabilisant les ratios cholestérol total / HDL et en diminuant les AG libres circulants. Ils diminuent donc les taux de glycémie en diminuant la résistance à l'insuline au niveau des tissus périphériques (figure 10).

Par contre, les glitazones augmentent le poids corporel (2 à 3 kg) par accumulation de lipides au niveau sous cutané (augmentation de la lipogenèse et adipogénèse, et diminution de la lipolyse), ce qui pourrait être problématique pour les personnes souffrant déjà d'embonpoint (84). Elle est aussi responsable de la réduction de la masse osseuse qui pourrait augmenter l'incidence de fracture des membres supérieurs (main, humérus) et inférieurs (pieds, chevilles) surtout chez les femmes postmenopausées sous traitements de glitazone. De plus, plusieurs études ont rapportés que la prise de rosiglitazone augmente le risque d'insuffisance cardiaque en induisant une rétention de fluide avec œdèmes chez certains patients et par conséquent pourrait induire le risque d'infarctus du myocarde (85-87). En Europe, L'EMA (Agence européenne du médicament) a évalué le rapport bénéfices/risques de la prise de la rosiglitazone dans le traitement du diabète de type 2 et a recommandé la suspension des autorisations de mise sur le marché des ces médicaments en raison de l'augmentation du risque cardiovasculaire engendré (88). Au Canada et aux États-Unis, les effets secondaires cardiovasculaires ont poussé les organismes sanitaires respectifs de ces deux pays (Santé Canada et le FDA) à émettre un avis concernant son utilisation et à restreindre ses indications officielles (89, 90). La rosiglitazone est donc prescrite avec le consentement du patient et en dernier lieu, lorsqu'aucun autre antidiabétique ne suffit pour contrôler adéquatement la glycémie sanguine.



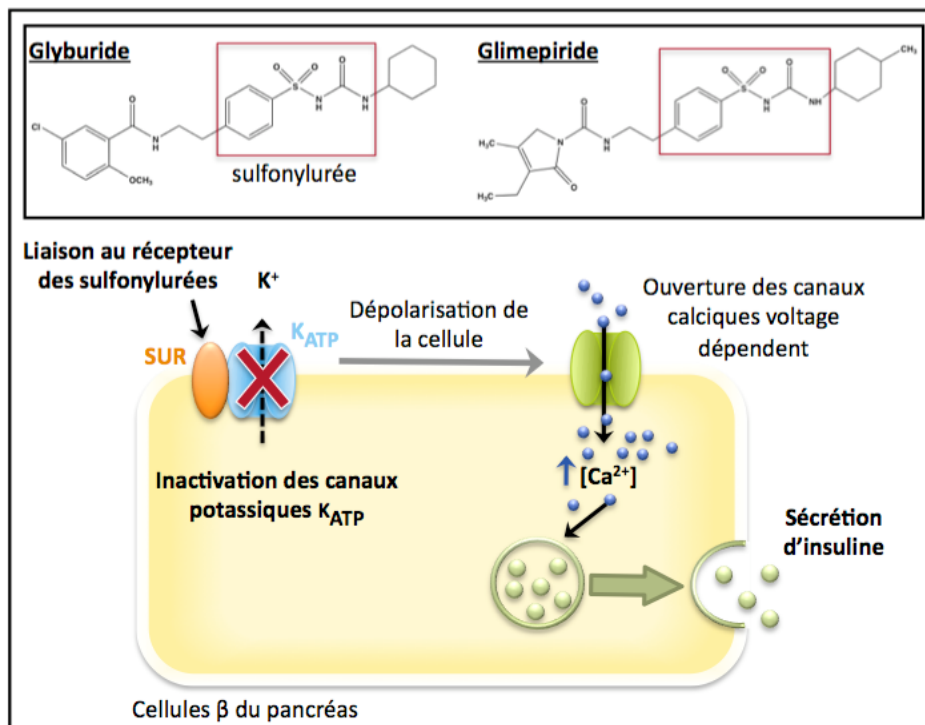
**Figure 10 :** Mécanisme d'action des glitazones (modifiée et adaptée de (80)). Les glitazones diminuent la résistance à l'insuline en exerçant leur effet, via l'activation du récepteur PPAR  $\gamma$ , sur le tissu adipeux, le foie et le muscle squelettique.

### Les sulfonyles

Les sulfonyles, aussi appelés sulfamides hypoglycémisants, sont une des classes principales des antidiabétiques oraux. Ils activent la sécrétion de l'insuline en se liant au récepteur spécifique SUR1 (sulfonyleurea receptor) situé sur la membrane plasmique des cellules  $\beta$  pancréatiques. Cette sous unité qui lie l'ATP et l'ADP fonctionne comme un capteur de glucose pour stimuler la sécrétion d'insuline. La liaison des sulfonyles au récepteur active la fermeture du canal potassique ( $K^+$ -ATP), engendrant la dépolarisation de la membrane des cellules  $\beta$  et l'ouverture du canal calcique voltage dépendant. L'influx de calcium qui s'ensuit provoque l'exocytose des granules d'insuline induisant sa sécrétion (figure 11).

Les sulfonylurées peuvent être utilisées soit en monothérapie lorsque la metformine est contre-indiquée, ou bien en combinaison avec d'autres classes d'antidiabétiques tels que l'acarbose, les glitazones ou l'insuline.

Leurs utilisations nécessitent par contre le bon fonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques, sinon ils ne sont pas efficaces. Leur principale complication est l'hypoglycémie, surtout lors de jeûne ou d'un surdosage médicamenteux (79).

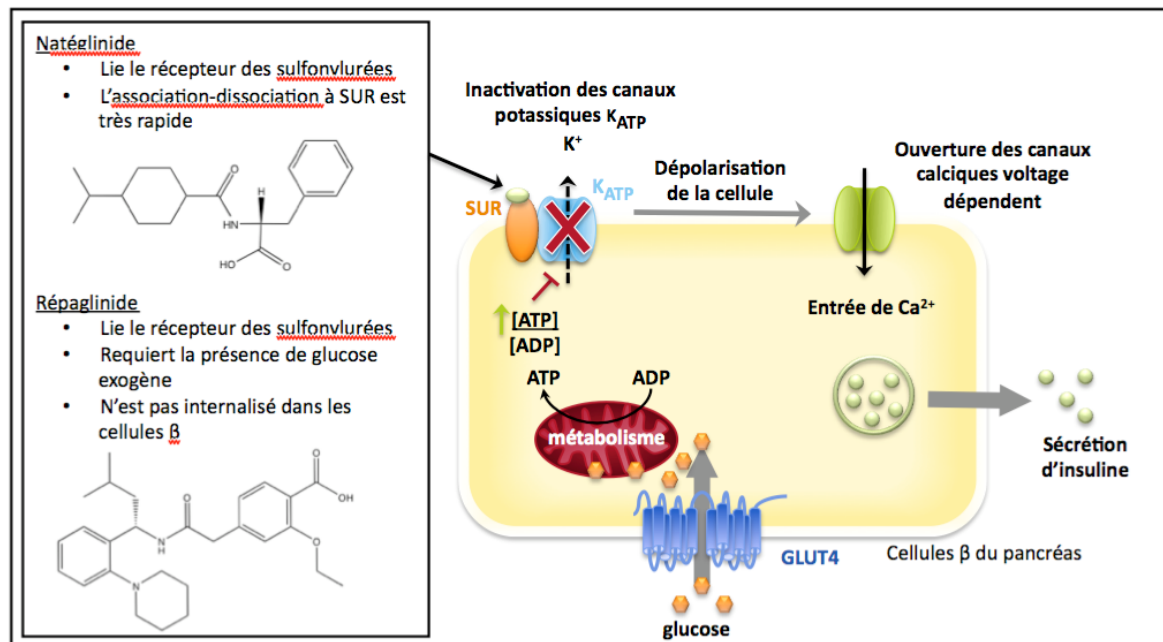


**Figure 11** : Mécanisme d'action des sulfonylurées (modifiée et adaptée de (80)).

### Les glitinides

Parmi les glitinides les plus connus se retrouvent la répaglinide (Novonorm®) et natéglinide (Starlix®). Ce sont des sécrétagogues d'insuline qui agissent par le même mécanisme que les sulfonylurées, c'est-à-dire en agissant directement sur les canaux  $K^+$ -ATP, mais en se liant à un site adjacent (figure 12). Leurs effets sont très rapides et de très courtes durées d'action, ce qui nécessite leur prise 3 fois par jour avant chaque repas pour

éviter l'hyperglycémie postprandiale (91). Leurs avantages et inconvénients à long terme par rapport aux sulfonylurées restent encore à préciser, mais leur efficacité se situe surtout au niveau de la sécrétion rapide de l'insuline et donc une réduction presque instantanée de la glycémie postprandiale.

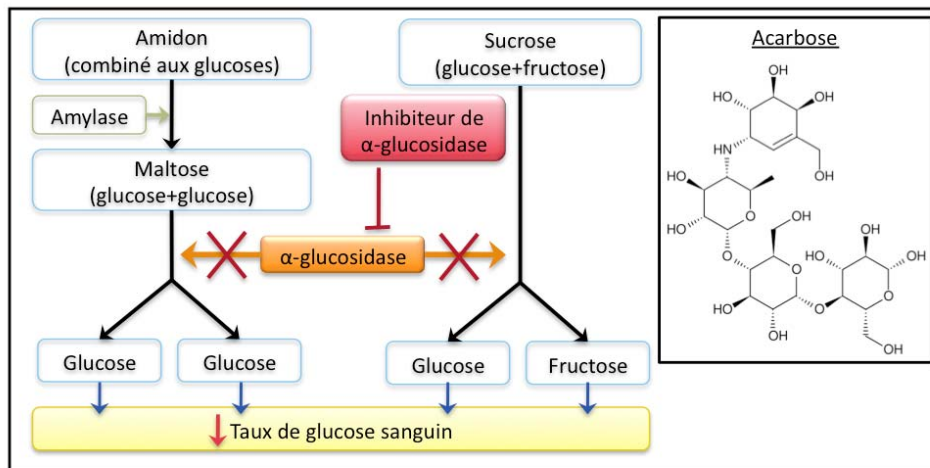


**Figure 12** : Mécanisme d'action des glitinides (modifiée et adaptée de (80)).

### Les inhibiteurs de l'alpha-glucosides

Les  $\alpha$ -glucosidases intestinales, sont des enzymes qui se retrouvent au niveau de la surface des villosités de l'intestin grêle. Ils sont responsables de l'hydrolyse des résidus d'amidon, d'oligosaccharides et des disaccharides afin de libérer du glucose. Cette hydrolyse est nécessaire à l'absorption digestive des glucides, puisque seuls les monosaccharides (glucose ou fructose) peuvent y être absorbés (81). L'inhibition de cette enzyme par l'acarbose (Glucobay®), le miglitol (Diastabol®) ou l'émiglitate réduit ou ralentit l'absorption digestive intestinale du glucose, aboutissant donc à une baisse des glycémies postprandiales (figure 13). Cette classe de médicaments est par contre moins

puissante que les autres antidiabétiques oraux et leur efficacité n'est pas démontrée à long terme. Elles sont utilisées pour les patients ayant une légère hyperglycémie postprandiale. Les principaux effets secondaires des inhibiteurs de l'alpha-glucosidase se manifestent surtout par des troubles digestifs, des douleurs abdominales ou de ballonnement (92).

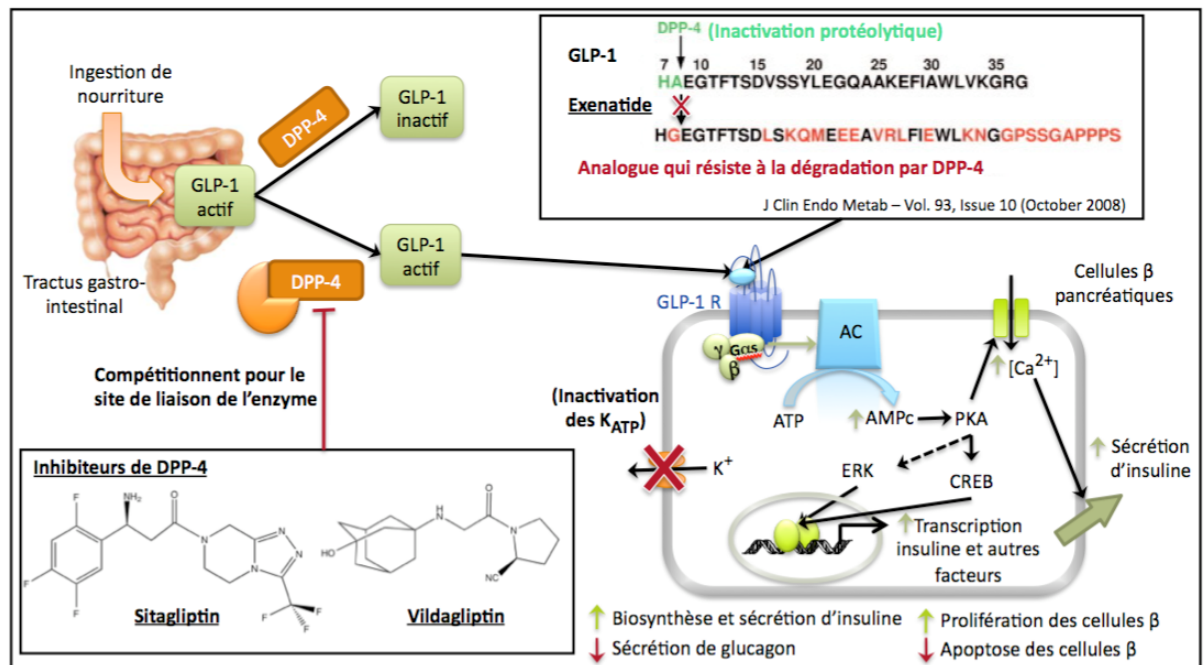


**Figure 13 :** Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'alpha-glucosidase (modifiée et adaptée de (80)). Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase inhibent de façon compétitive les enzymes de type alpha-glucosidases localisés dans la bordure en brosse du petit intestin. Ils diminuent ainsi la dégradation du sucrose et des carbohydrates complexes (amidon), et réduisent l'absorption des carbohydrates de l'intestin.

#### Les incrétines (analogues GLP-1 et inhibiteurs DPP-4)

Les incrétines sont des hormones gastro-intestinales qui stimulent la sécrétion d'insuline lorsque la glycémie est trop élevée. Cette classe de médicaments exploite donc l'effet incrétine qui est caractérisé par une plus grande stimulation de la sécrétion d'insuline suite à l'administration orale de glucose. Deux hormones intestinales stimulent cet effet, le GLP-1 (*Glucagon like-1 peptide*) et le GIP (*Glucose-dependent insulintropic polypeptide*). La sécrétion de GLP-1 par les cellules intestinales est stimulée par la prise de nourriture et vise à abaisser le taux de glucagon (figure 14). L'approche thérapeutique visée par cette

classe d'antidiabétique a pour but de prolonger l'effet du GLP-1 de deux manières possibles; soit par utilisation des analogues synthétiques de GLP-1 (Exenatide, Liraglutide), soit par inhibition de sa dégradation enzymatique par les inhibiteurs de l'enzyme dipeptidylpeptidase-4 (Sitagliptin et Saxagliptin). Les analogues de la GLP-1 et les inhibiteurs de la DPP-4 peuvent être utilisés en association avec la metformine ou une sulfonylurée, en vue d'améliorer le contrôle glycémique chez les diabétiques de type 2. Ils sont cependant contre-indiqués pour les patients ayant des troubles gastro-intestinaux tels que la gastroparésie (93, 94).



**Figure 14** : Effet incrétine réalisé par des analogues de la GLP-1 et les inhibiteurs de la DPP-4 (modifiée et adaptée de (80)).

### 1.5.3 Médecine traditionnelle et utilisation de plantes médicinales

L'utilisation de la médecine traditionnelle ainsi que des plantes médicinales sont une pratique courante dans notre société et dans le monde entier. En effet, dans certains

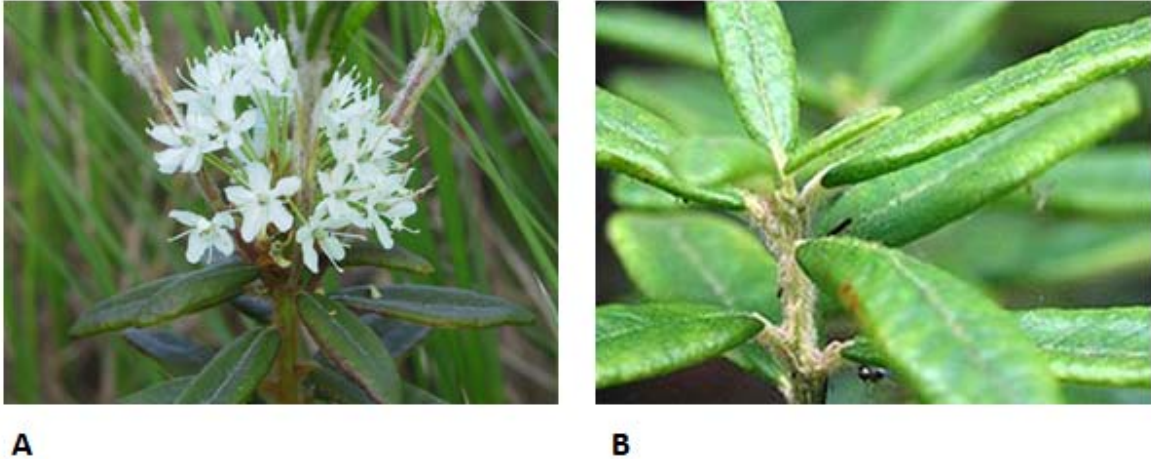


pays d'Asie et d'Afrique, 80% de la population y a recours pour prévenir ou traiter certaines maladies primaires (95). La médecine traditionnelle provient d'un mélange entre la culture, la croyance, le savoir et l'expérience des aînés, mis ensemble afin de traiter les maladies existantes. C'est une approche holistique englobant les éléments physiques, psychiques, émotifs et spirituels.

Dans le cas du diabète, il y a une panoplie de plantes provenant de la médecine traditionnelle ayant des effets antidiabétiques. Au fait, plusieurs médicaments connus sur le marché, proviennent d'extrait de plante. La metformine, un des médicaments les plus utilisés dans le traitement du diabète de type 2, en est un exemple. Il dérive d'une substance naturelle, la guanidine, extraite de la plante appelé *Galega officinalis* (Lilas Français) (96). Les plantes aux propriétés médicinales suscitant un grand intérêt chez les scientifiques. Leur étude est donc importante afin de valider leurs potentiels thérapeutiques.

## **1.6 *Rhododendron groenlandicum***

*Rhododendron groenlandicum* (figure 15), connue sous le nom commun de Thé du Labrador, est une plante indigène retrouvée dans la majeure partie du territoire du Canada et dans le nord des États-Unis. Ce petit arbrisseau de 30 à 120 cm appartient à la famille des Éricacées et possède un feuillage en forme elliptique et allongé. Il pousse surtout dans les tourbières et dans les boisés humides. La population autochtone, surtout les Cri de la Baie James du Nord du Québec, utilise régulièrement ces feuilles pour en faire une boisson sous forme de thé ou de tisane afin de combattre l'asthme, le rhume et les maux de têtes. On lui confère donc plusieurs propriétés médicinales telles qu'une action analgésique, antiparasitaire, anti-tumorale, antioxydant, sédatif, décongestionnant, diurétique et stimulant digestif (97). Dernièrement, une étude ethnobotanique (6), réalisée par notre équipe, a déterminé que *Rhododendron groenlandicum* avait un fort potentiel antidiabétique démontré *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires, notamment les adipocytes (3T3-L1) et les cellules musculaires (C2C12).



**Figure 15** : Présentation de la fleur (A) et des feuilles (B) de *Rhododendron groenlandicum* (98, 99).

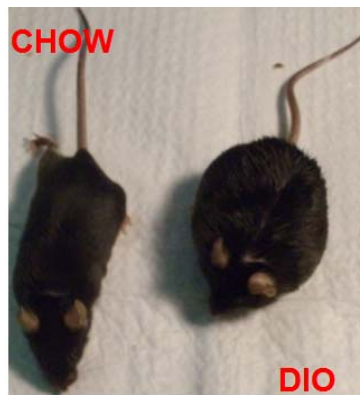
## 1.7 Modèle animal de l'insulino-résistance :

Afin d'étudier l'étiologie du diabète de type 2, l'utilisation de modèles expérimentaux est requis pour faciliter la compréhension de cette maladie complexe et diversifiée. La mise au point des modèles appropriés de diabète de type 2 chez l'animal, durant ces dernières années, a abouti à une panoplie de modèles basés essentiellement chez les rongeurs.

L'établissement du diabète chez les rongeurs peut se faire de différentes manières; soit de façon spontanée (souris ob/ob, souris KK) ou naturelle (régime alimentaire riche en gras), soit par induction chirurgicale (ablation pancréatique), chimique (injection de streptozotocine), immunologique ou par création de mutations transgéniques (des 'knockout' de Glut 4, d'IRS, etc...) (100).

### 1.7.1 Importance du modèle DIO dans l'étude des maladies métaboliques

Les modèles animaux de diabète induit par un régime alimentaire riche en gras ont permis l'étude des effets d'une consommation hypercalorique dans le développement du diabète de type 2. L'obésité, qui représente un facteur de risque majeur de l'apparition du diabète de type 2, est causée par de nombreux facteurs environnementaux et génétiques (101). L'un de ces facteurs environnementaux est l'apport d'une alimentation riche en gras. Un modèle animal de l'obésité et d'insulino-résistance, DIO, provoqué par l'alimentation a été développé pour étudier la forme d'obésité retrouvée chez l'humain. Les souris C57BL/6 qui sont nourries avec un régime riche en lipides, développent l'obésité, l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie, contrairement aux souris nourries avec une diète standard, CHOW (figure 16) (102). Ce modèle DIO s'approche donc du modèle de diabète de type 2 le plus souvent retrouvé chez les humains.



**Figure 16 :** Souris C57BL/6 nourries avec une diète standard (CHOW) à gauche et souris C57BL/6 nourries avec une diète grasse (DIO) à droite.

## **2 OBJECTIFS DU PROJET**

L'objectif de cette maîtrise est de valider les effets antidiabétiques de *Rhododendron groenlandicum in vivo* dans le modèle animal de souris DIO et d'élucider ses mécanismes d'action. De plus, l'identification et la caractérisation des principes actifs responsables de son effet antidiabétique, sera réalisée en utilisant une approche de fractionnement guidée par l'activité biologique d'adipogénèse.

### **3 CHAPITRE B: ARTICLE 1**

**A combination of Catechin, Epicatechin and Quercetin underlies the in vitro adipogenic action of Rhododendron groenlandicum, an antidiabetic medicinal plant of the Eastern James Bay Cree pharmacopeia.**

#### **Authors**

Meriem Ouchfoun<sup>1,3,4</sup>, Jose A. Guerrero-Analco<sup>2,3</sup>, Lina Musallam<sup>1,3,4</sup>, Ammar Saleem<sup>2,3</sup>, John T. Arnason<sup>2,3</sup>, Louis C. Martineau<sup>1,3,4</sup>, Pierre S. Haddad<sup>1,3,4</sup>

#### **Affiliation**

<sup>1</sup> Natural Health Products and Metabolic Diseases Laboratory, Dept. of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup> Medicinal Plant and Ethnopharmacology Laboratory, Dept. of Biology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada

<sup>3</sup> Canadian Institutes of Health Research Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines and Montreal Diabetes Research Center, Montreal, Quebec, Canada

<sup>4</sup> Nutraceutical and Functional Foods Institute, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada.

#### **Address for correspondence**

Pierre S. Haddad, PhD  
Department of Pharmacology  
Université de Montréal  
P.O. Box 6128, Downtown Station  
Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada

**ABSTRACT:**

Rhododendron groenlandicum (Labrador tea) was identified as an antidiabetic plant through an ethnobotanical study carried out with the close collaboration of Cree nations of northern Quebec in Canada. The plant showed glitazone-like activity in a 3T3-L1 adipogenesis bioassay. The current study sought to identify the active compounds responsible for this potential antidiabetic activity. Isolation and identification of the crude extract's active constituents was carried out using bioassay guided fractionation based upon an in vitro assay that measures the increase of triglycerides content in the 3T3-L1 adipocyte model cell lines. *R. groenlandicum* leaves were extracted with 80% ethanol and the extract separated using silica gel chromatography. Nine chemically distinct fractions were obtained and adipogenic activity was found in RGE-Fr 5. Preparative HPLC was then used to isolate the fraction's constituents. Quercetin, catechin and epicatechin were found to be present and their identity was confirmed by UV and mass spectroscopy. While two of the compounds stimulated adipogenesis, none afforded biological activity similar to RGE-Fr5 or the plant's crude extract when given alone. Results thus demonstrate that quercetin, catechin and epicatechin represent the active compounds responsible for the adipogenic activity of Labrador tea. This brings further evidence for the antidiabetic potential of *R. groenlandicum* and provides new opportunities to profile active principles in biological fluids or in traditional preparations.

**Keywords**

Labrador tea, bioassay-guided fractionation, 3T3-L1 adipocytes, aboriginal traditional medicine, natural health products.

## INTRODUCTION:

The incidence of metabolic diseases, such as type 2 diabetes, is increasing at an alarming rate and therefore represents a major worldwide health concern. Over one million Canadians are currently living with diabetes. The prevalence of this disease is three to five times higher among the indigenous people than in the general Canadian population (Health Canada 2006). Our team conducted an ethnobotanical study with the close collaboration of the Cree of Eeyou Istchee (James Bay area of northern Quebec) and identified 17 potential antidiabetic medicinal plants used by Cree healers to treat symptoms of diabetes (1-4). In the course of screening these plants using several cell-based bioassays, a number of extracts were found to stimulate the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into mature adipocytes (adipogenesis), capable of synthesizing and accumulating triglycerides as lipid droplets (2). This bioassay is a surrogate for identifying agonist activity on peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR  $\gamma$ ), a key member of the superfamily of nuclear receptors that function as transcription factors regulating the expression of genes involved in lipid metabolism and glucose control (5).

While obesity is a major risk factor for diabetes, an interesting hypothesis suggests that Type 2 diabetes may result in part from the inability of new adipocytes to be recruited (through differentiation), thus preventing the expansion of adipose tissue to accommodate excess calories. In fact, thiazolidinediones (TZD), a class of oral hypoglycemic drugs, exert their antidiabetic effect in part by inducing adipocyte differentiation through activation of PPAR  $\gamma$ .

*Rhododendron groenlandicum* (known as Labrador Tea) is a shrub of the Ericaceae family that grows in the tundra, bogs and forests of North America (6). It was one of the plants most highly recommended by Cree healers for the treatment of diabetic symptoms (1). In our adipogenesis assay, an 80% ethanol extract of *R. groenlandicum* was able to stimulate adipogenesis to the same extent as rosiglitazone, a representative TZD oral hypoglycemic (2). Such adipogenic activity can lead to a reduction in circulating free fatty acids and hence reduce their accumulation in liver and muscle. Steatosis in these insulin

sensitive tissues is known to be involved in insulin resistance and type 2 diabetes (7). Therefore, we used the adipogenesis assay as a tool to guide the fractionation of the crude ethanol extract of *R. groenlandicum* (RGE-CEE) in order to identify the active compounds responsible for this putative antidiabetic activity. We report here the isolation and identification of three well-known flavonoid compounds: (+) Catechin, (-) Epicatechin and Quercetin. We show that the first two compounds stimulated adipogenesis with high concentration only, while the Quercetin inhibited it.



## **MATERIALS AND METHODS:**

### ***Cell lines, chemicals and biochemicals***

Pre-adipocyte 3T3-L1 cell line was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). Dexamethasone (DMX), Bovine pancreatic Insulin, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Rosiglitazone from was obtained Alexis Biochemicals (Hornby, ON). Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and bovine calf serum (BCS) were from Wisent Inc (St-Bruno, QC). Adipored reagent was purchased from Combrex Bio Science Walkersville Inc (Walkersville, MD). All solvents (Chromsolv Plus grade) used for plant extraction and isolation, as well as reference compounds [(+) catechin, (-) epicatechin and quercetin], silica gel 60 (70–230 mesh) and 60 F254 silica gel thin layer chromatography plates (20.0 x 20.0 cm) were obtained from Sigma-Aldrich.

### ***Plant material***

Fresh leaves of *Rhododendron groenlandicum* (Oeder) Kron & Judd (Ericaceae) were collected during August 2007 in Eeyou Istchee (Eastern James Bay area of northern Quebec, Canada) with the help of Cree elders. Species were identified by a plant taxonomist, Dr. Alain Cuerrier (Montreal Botanical Garden) and a voucher specimen (MIS 03-9) was deposited at Marie Victorin Herbarium of the Montreal Botanical Garden (Quebec, Canada).

### ***Extraction and Isolation***

The dried and shredded leaves (1.6 Kg) were extracted with 15 L ethanol (80 % in MilliQ water) with 24 h continuous shaking at room temperature on an orbital shaker. The pellet was extracted with 7 L of 80 % methanol by 24 h shaking. The supernatants were combined and evaporated to dryness in vacuo using a Yamato rotatory evaporator (Model RE300, Yamato America Inc., Santa Clara, CA) to yield 290 g of a dark green crude extract.

Dried extract (100 g) was chromatographed on an open glass column packed with 1.6 Kg of silica gel. The elutions were carried out sequentially with a hexanes:ethyl acetate gradient (1:0→0:1) and an ethyl acetate:methanol (1:0→0:1) gradient to yield one hundred and ten (110) eluates of 250 ml each. Chemically similar eluates were pooled on the basis of thin layer chromatographic profiles performed on silica gel plates and visualized by 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. This procedure yielded nine primary fractions identified as RGE-1 through RGE-9. Biological activity was assessed using the adipogenesis assay (described below) in order to select the active fraction(s) to be subjected to further fractionation. The crude extract and pooled fractions were tested at 75 µg/mL, the concentration found to be optimal for the crude extract in previous studies (2).

### ***HPLC-DAD-MS Analyses***

The identification of the compounds in the crude extract and in the active fraction, RGE-5 (1.2 g; eluted with hexanes-ethyl acetate (1:9)), was carried out by chromatographic analyses performed on an Agilent 1100 series HPLC-DAD-APCI/MSD system (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA). Co-chromatography and authentication were determined by automated UV library matching and mass spectrometry by a method described in Saleem et al., 2010 (8). Briefly, the compounds were identified at the monitoring wavelengths of 280 nm (band width 4 nm, reference off) for (+) catechin and (-) epicatechin and of 325 nm (band width 4 nm, reference off) for quercetin. The identification of the compounds was corroborated by comparing the fragments of the compounds with the authentic standards using atmospheric pressure chemical ionization-mass selective detector (APCI-MSD) in positive scan mode within a mass range of 100 – 500 amu.

### ***Cell culture***

Pre-adipocyte 3T3-L1 cells were grown to confluency in DMEM containing 10% FBS (proliferative medium). 24 h post-confluence (day 0), cell were induced to differentiate with DMEM supplemented with 10 % FBS, 1  $\mu$ M dexamethasone, 250  $\mu$ M IBMX and 500 nM insulin. After 48 h, the media was replaced with DMEM containing 10 % FBS and 500 nM insulin. Cells were differentiated for a total of 7 days with media change every 2 days. Plant extracts and fractions (75  $\mu$ g/ml), isolates (10 to 150  $\mu$ M), as well as Rosiglitazone (10  $\mu$ M; inducer of differentiation) were dissolved in DMSO and added to the cells, being present continuously since day 0 of differentiation (DMSO set at 0.1 % final concentration throughout).

### ***Adipogenesis***

Once differentiated, adipocytes accumulate triglycerides (TG). We measured intracellular TG content at day 7 of differentiation by using the AdipoRed reagent according to the manufacturer's instructions, as previously described (4). Briefly, after washing each well twice with PBS, 2 ml of PBS containing 60  $\mu$ l of AdipoRed reagent were added to each well, mixed by gentle trituration and incubated for 15 minutes at room temperature. AdipoRed becomes fluorescent when partitioned in a hydrophobic compartment. The fluorescence of each well was measured with a Wallac Victor2 fluorimeter (Perkin-Elmer, St-Laurent, QC) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 572 nm. The results were reported as percentage of the vehicle control (0.1 %DMSO).

### **STATISTICAL ANALYSIS:**

Intracellular TG content results are presented as the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, each performed in triplicate. The SigmaStat software (Jandel Scientific, San Rafael, CA) was used to perform the statistical analysis. Differences between group means were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). The EC50 and IC50 values

were calculated using GraphPad Prism version 4.0c (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA).  
A P value below 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Phytochemical fractionation

Our previous screening studies (2) revealed that *R. groenlandicum* strongly stimulates the differentiation of 3T3-L1 cells (adipogenesis). Therefore, in the present study, a classical bioassay-guided fractionation approach was used to isolate the constituents of *R. groenlandicum* with adipogenic activity (Figure 1).

Dried and shredded leaves (1.6 Kg) were extracted with 80% aqueous ethanol to generate a crude ethanol extract. When tested on the 7th day of differentiation and at the previously determined optimal concentration of 75  $\mu\text{g/ml}$  (2), this extract increased the intracellular TG content of 3T3-L1 cells by  $330 \pm 38\%$  ( $p < 0.001$ ), as compared to the DMSO vehicle control (Figure 1). Next, the crude extract (100 g) was subjected to silica gel column chromatography to yield nine primary fractions (RGE-1 to RGE-9). Fraction RGE-5 was the most active of the nine fractions with respect to adipogenesis; its activity being similar to that of the crude extract ( $313 \pm 14\%$  vs  $330 \pm 38\%$  respectively; NS; Figure 1). We then tested this fraction at different concentrations ranging from 10 to 100  $\mu\text{g/ml}$  (Figure 2A), still in comparison with the crude extract at 75  $\mu\text{g/ml}$ . The adipogenic activity increased concentration dependently and reached a plateau at 50  $\mu\text{g/ml}$ , consistent with standard dose-response relationships. Of note, the highest activity of RGE-5 ( $311\% \pm 53$ ) was reached at 75  $\mu\text{g/ml}$  and this again was not statistically different from the activity of the crude extract tested in parallel at the same concentration ( $329 \pm 42\%$ ; NS) (Figure 2B).

### HPLC characterization

The photochemical characterization of Labrador tea crude ethanolic extract has been reported previously (2, 8). In the latest study, the following compounds were identified by HPLC: Catechin, chologenic acid, epicatechin, procyanidin B2, procyanidin A1, and several quercetin glycosides (Figure 3A).

Preparative reversed-phase HPLC-MS (C18 silica gel column; CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O gradient as a mobile phase) separation of fraction RGE-5 yielded three major compounds: (+) catechin, (-) epicatechin and quercetin (Table I). The identification of these compounds, based on retention times, UV spectra and mass spectral fragments, was achieved by co-chromatography under similar chromatographic and spectrometric conditions (Figure 3). Quantification of the three compounds revealed that they are minor components of the crude extract (8) and of the active fraction RGE-5 (Table I). Together, the three compounds account for no more than 2.26% and 41.94% of the dry weight, respectively.

#### Adipogenic profile of active compounds

Next, the adipogenic activity of each of the three compounds was assessed at concentrations ranging from 10 to 150  $\mu$ M (Figure 4). All three compounds demonstrated standard sigmoidal logarithmic dose-response relationships. However, at low doses, (+) catechin was found to inhibit adipogenesis by 35-45% (Figure 4A;  $p < 0.05$ ). This activity profile shifted steeply toward stimulation of adipogenesis around a concentration of 100  $\mu$ M, yielding a calculated EC<sub>50</sub> of 104  $\mu$ M. In contrast, low doses of (-) Epicatechin did not significantly affect adipogenesis, but again a steep dose-response relationship was observed (Figure 4B). The calculated EC<sub>50</sub> for the adipogenic activity of (-) epicatechin was 127  $\mu$ M. In the case of quercetin, an inverse relationship was found, inhibition of adipogenesis being observed at higher concentrations (50 – 150  $\mu$ M; Figure 4C). Analysis of the dose-response curve yielded an IC<sub>50</sub> value of 47  $\mu$ M. Intriguingly, a single dose of quercetin deviated from the inhibitory profile. Indeed, at 25  $\mu$ M, the compound stimulated adipogenesis by  $173 \pm 23\%$  ( $p < 0.005$ ).

## DISCUSSION:

The Cree of Eeyou Istchee, like many aboriginal populations in Canada and elsewhere, suffer from an alarmingly high incidence of Type 2 diabetes (Health Canada, 2006). Moreover, they suffer greater diabetic complications, partly because of poor compliance to modern pharmaceuticals that are considered culturally inadequate (9). With this in mind, our research team has worked for several years in close collaboration with Cree Elders and healers, as well as local and regional Cree health organizations, to explore the potential of Cree traditional medicine to help mitigate the devastating impact of Type 2 diabetes. The present work contributes to this effort by determining the active principles of one of the most promising antidiabetic medicinal plant to have been identified from the Cree traditional pharmacopeia, in part by virtue of its stimulation of adipogenesis in 3T3-L1 cells.

Indeed, it is well established that stimulators of adipogenesis offer a promising therapeutic approach for Type 2 diabetes treatment (10). For instance, TZDs are widely used oral hypoglycemic drugs that induce PPAR $\gamma$  activity and consequently promote adipogenesis (11). In a previous study from our laboratory (2), the crude ethanol extract of *R. groenlandicum* was found to induce adipocyte differentiation as strongly as rosiglitazone, a reference TZD. A classical bioassay-guided fractionation approach, combined with standard analytical chemistry tools, was thus used in the present study to isolate and identify the active compounds responsible for the adipogenic activity of this plant extract.

Through silica gel chromatography, nine distinct fractions were obtained and only one of these, RGE-5, exhibited the same adipogenic activity as the crude ethanol extract from which it originated. RGE-5 demonstrated a standard dose-response relationship and was further fractionated using preparative HPLC. Three phenolic compounds were found to be part of this active fraction of Labrador tea: (+) catechin, (-) epicatechin and quercetin. These belong to the flavonoid family, which are ubiquitously found in plants, fruits and beverages derived thereof. Flavonoids possess several important and beneficial effects on

human health such as anti-inflammatory, antioxidant (12), antigenotoxic (13) and anti-atherogenic activities, several of these playing favorable roles to mitigate Type 2 diabetes and related complications (13). Furthermore, various flavonoids stimulate the differentiation of several cell lines, including adipocytes, whereas other compounds of the same family inhibit such differentiation (14).

(+) Catechin is one of the major polyphenolic compounds present in green tea that has shown mixed effects on adipogenesis. The results of the present study showed that, when tested alone, (+) catechin inhibited adipogenesis by 35-45% at concentrations equal to or below 100  $\mu\text{M}$ , but significantly stimulated it at higher concentrations ( $\text{EC}_{50} = 104 \mu\text{M}$ ). This corroborates the results of Chien et al whereby catechin inhibited adipogenesis of 3T3-L1 cells by 54%, mainly by inhibiting the activation of PPAR $\gamma$  (14). The highest concentration tested was 100  $\mu\text{M}$ , but the author failed to mention the catechin isomer used in their experiments (14). In a more recent study, Shin et al reported that (-) catechin (the enantiomer of the compound found in RGE-5) and (-) epicatechin (the epimer of (+) catechin) strongly stimulated the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into adipocytes, while (+) catechin did not affect adipogenesis (15). On the other hand, Mochizuki et al (16) showed that 70  $\mu\text{M}$  of (+) catechin stimulated adipogenesis, while the same concentration of (-) catechin significantly inhibited it. Therefore, it seems that the two isomers can have opposing effects at different concentrations, with the two being able to stimulate and inhibit adipogenesis. In our case, *R. groenlandicum* was found to contain only (+) catechin (2, 8), and concentrations of (+) catechin greater than 100  $\mu\text{M}$  were needed to stimulate adipogenesis.

For the second compound, (-) epicatechin, our results showed that it had no significant effect on adipogenesis until concentrations reached 150  $\mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50} = 127 \mu\text{M}$ ). Although there are conflicting data regarding the effect of (-)-epigallocatechin and (-) epicatechin gallate (two closely related flavonoids) on adipogenesis (15, 17), little has been published on the effect of (-) epicatechin alone on adipogenesis. Consistent with our findings at lower concentrations, Furuyashiki et al. (17) failed to see any effect of 5  $\mu\text{M}$  (-) epicatechin on adipogenesis. On the other hand, Shin et al (15) showed that a 10  $\mu\text{M}$  dose



of the compound stimulated adipogenesis of 3T3-L1 cells by 27%. Difference in the differentiation protocols used could account for this apparent discrepancy. Indeed, we measured the accumulation of TG after 7 days of differentiation, while Shin et al assayed it after 12 days. The longer incubation period may have allowed more cells to differentiate at lower (-) epicatechin concentrations.

Finally, the third flavonoid identified in our active fraction, quercetin, has been more consistently shown to inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes and human bone marrow mesenchymal cells in a dose-dependent manner (14). We observed similar dose-dependent inhibition of adipogenesis at quercetin levels of 50-150  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50} = 47\mu\text{M}$ ). Interestingly, 25  $\mu\text{M}$  of quercetin stimulated adipogenesis by 70%. This was unexpected since no previous data support pro-adipogenic activity of quercetin. In fact, Chien et al showed that 25  $\mu\text{M}$  of quercetin inhibited adipogenesis using a different differentiation protocol. Of note, these authors used 0.125 mM indomethacin in their short-term medium. Indomethacin is a non-steroidal anti-inflammatory drug and cyclooxygenase inhibitor that is frequently used as a research tool to study the process of adipocyte differentiation (18). Further studies will be required to understand the observed adipogenic activity of quercetin at 25  $\mu\text{M}$ . Nevertheless, it must be noted that the quercetin concentration in fraction RGE-5, calculated from the HPLC quantification of the compound (Table I), is about 4.82  $\mu\text{M}$ , well below the  $\text{IC}_{50}$  of this compound ( $\text{IC}_{50} = 47 \mu\text{M}$ ).

In summary, we have identified (+) catechin and (-) epicatechin as the active compounds responsible for the adipogenic activity of Labrador Tea crude extract by applying classical bioassay guided isolation approach. Quercetin, a known inhibitor of adipogenesis, was also present in the crude extract and the active fraction of *R. groenlandicum*, but at very low concentrations that do not interfere with adipogenesis. Moreover, it would be important to confirm the antidiabetic activity of this plant extract in an animal model and to further explore the mechanism of action of this plant extract. Overall, the present study provide further validation of the traditional medical knowledge of the Eastern James Bay Cree and suggests that Labrador Tea can represent a valuable, culturally relevant therapeutic approach to help mitigate the devastating effects of Type 2

diabetes and related complications. Moreover, the identification of the plant's active compounds paves the way to their use for pharmacokinetic studies (measurement in biological fluids) and in the development of new therapeutic agents for the treatment of metabolic diseases.

## FIGURE LEGEND:

**Figure 1:** Phytochemical fractionation of the crude ethanol extract of *Rhododendron groenlandicum* (RGE-CEE) guided by an *in vitro* assay measuring the increase of triglycerides content in the 3T3-L1 adipocyte model cell line. The crude extract and the fractions were tested simultaneously at 75 µg/ml. Values in brackets represent activity expressed as percentage change in the rate of basal adipogenesis relative to the vehicle control (0.1% DMSO). Fractionation of the crude extract resulted in the isolation and identification of catechin, epicatechin and quercetin as the respective active principles.

**Figure 2:** Adipogenic profile of *R. groenlandicum*'s crude ethanol extract and fraction RGE-5. **A.** Dose-response analysis of the adipogenic action of fraction RGE-5. **B.** The adipogenic action of *R. groenlandicum* crude ethanolic extract (RGE-CEE) and fraction 5 (RGE-5) at the final concentration of 75 µg/ml was compared to that of Rosiglitazone (10µM), a reference TZD used as the positive control. Data are represented as mean ± SEM and are expressed as % change in the rate of basal adipogenesis relative to the vehicle control (0.1% DMSO). \* indicates a p-value ≤ 0.05 significantly different from control treated with 0.1% DMSO.

**Figure 3:** HPLC chromatograms of *R. groenlandicum* crude ethanol extract (A) and of fraction RGE-5 (B) resulting in three major compounds listed in Table I. Absorbance at 280 nm (catechin and epicatechin) and 325 nm (quercetin) are plotted against retention time (in min). Constituent compounds of crude extract were identified previously (8). 1: (+)-catechin, 2: chlorogenic acid, 3: (-)-epicatechin, 4: quercetin-3-O-galactoside, 5: quercetin-3-O-glucoside, 6: quercetin-glycoside, 7: quercetin-3-O-arabinoside, 8: quercetin.

**Figure 4:** Dose-response analysis of the adipogenic action of active compounds found in fraction RGE-5. (+)-Catechin (**A**), (-)-Epicatechin (**B**) and Quercetin (**C**) were tested at concentrations ranging from 0 to 150  $\mu$ M. Values are represented as means  $\pm$  SEM and are expressed as % change in the rate of basal adipogenesis relative to the vehicle control (0.1% DMSO). \* indicates a p-value  $\leq$  0.05 significantly different from vehicle control treated with 0.1% DMSO.

**Table I:** Yield of *R. groenlandicum* constituents in the crude extract and fraction RGE-5 resulted from bioassay-guided fractionation

Compound	Crude extract (mg/g)	RGE-5 (mg/g)
(+)-Catechin	0.59	22.54
(-)-Epicatechin	1.43	17.22
Quercetin	0.24	2.17
Total	2.26%	41.94%

Figure 1:

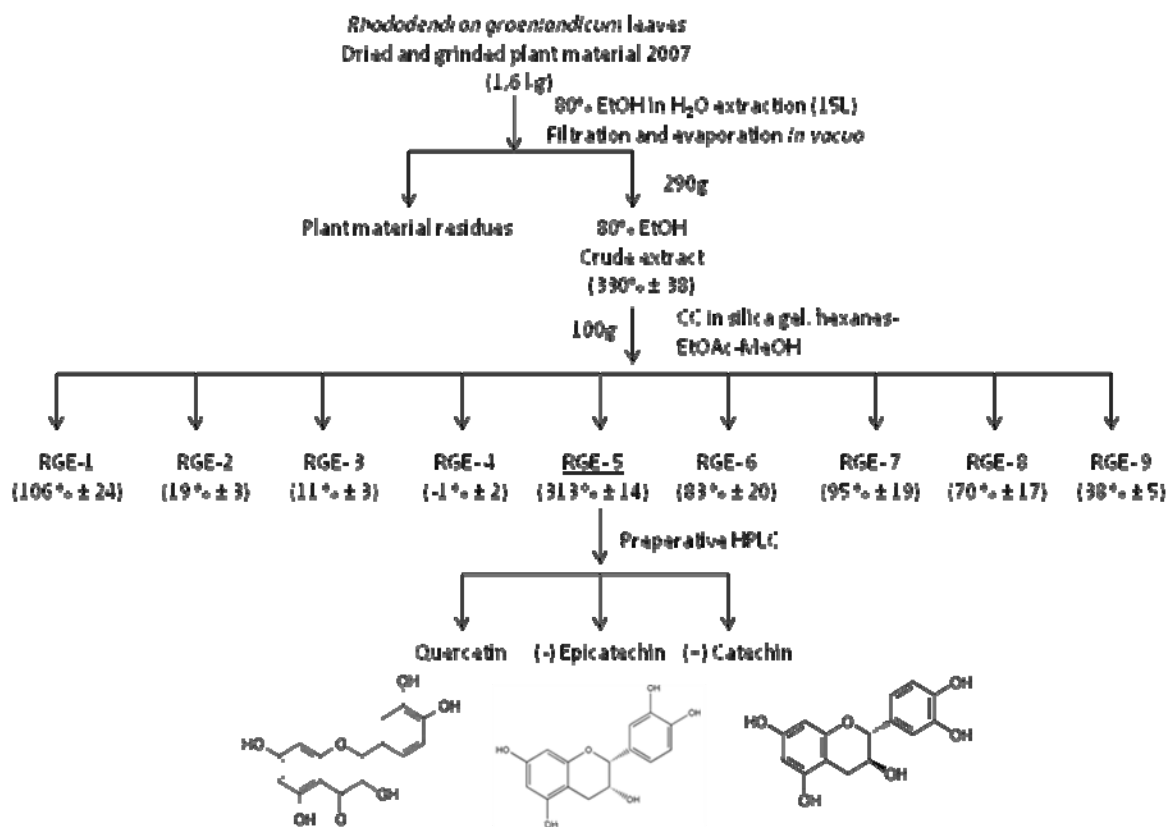
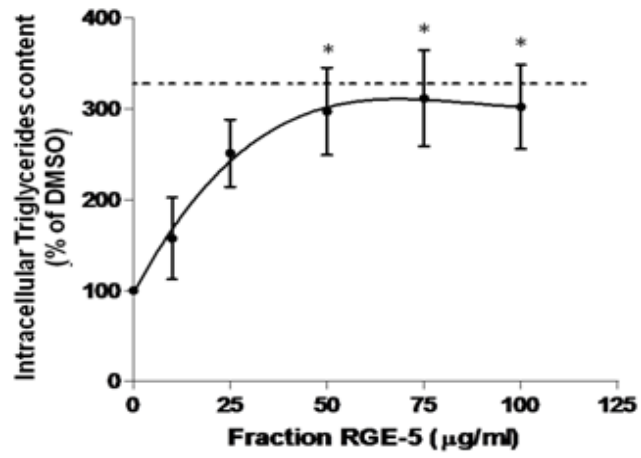


Figure 2:

A



B

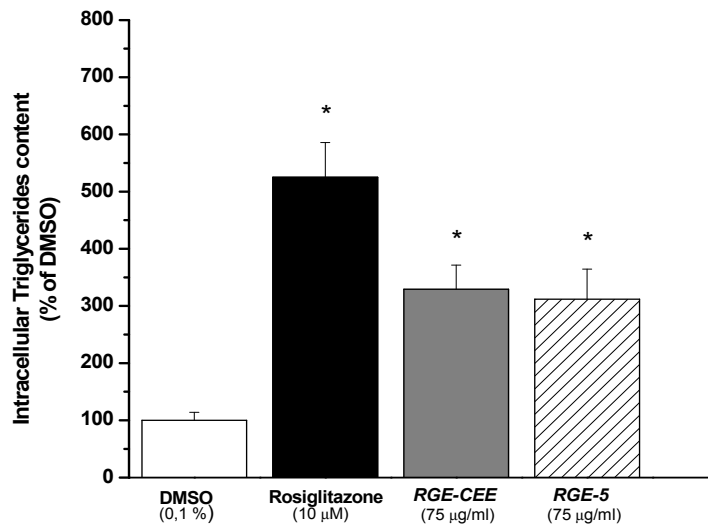
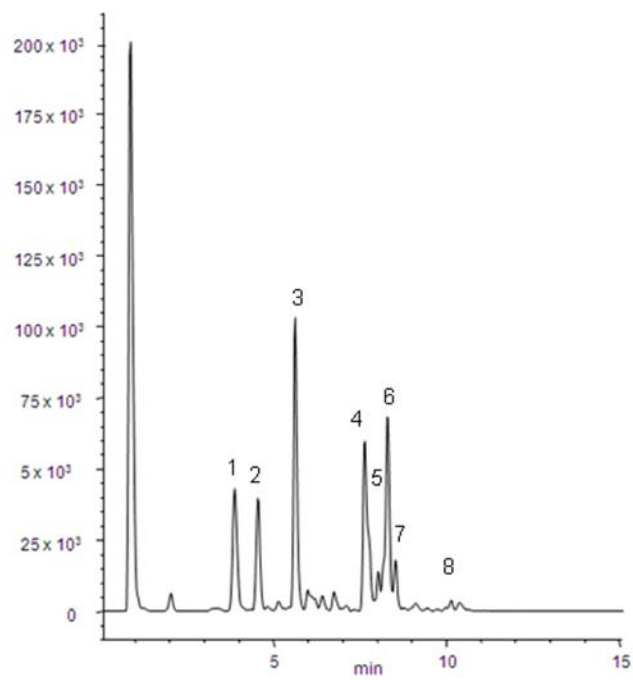


Figure 3:

A



B

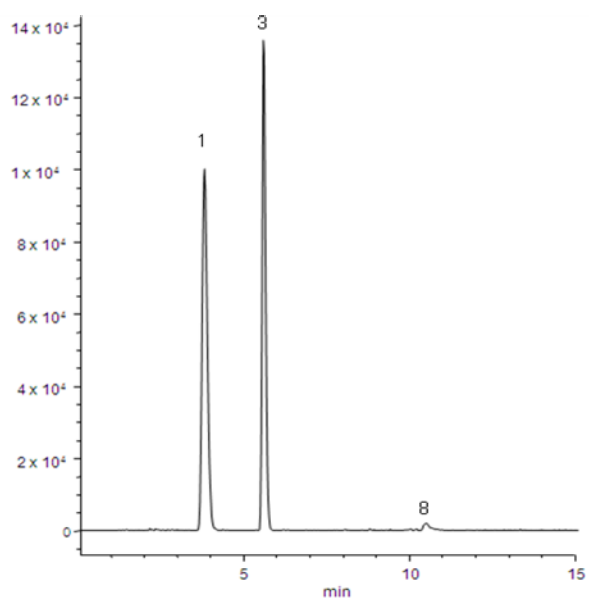
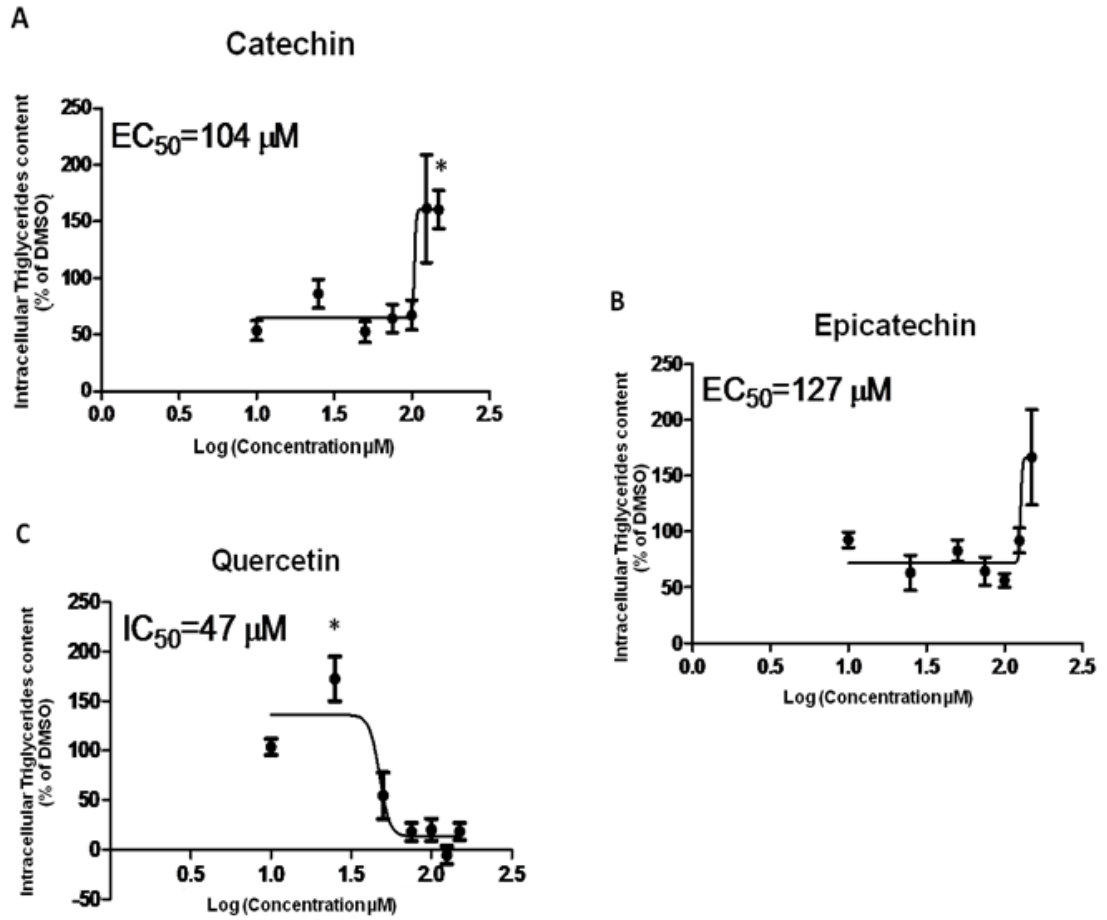




Figure 4:



## REFERENCES:

1. Leduc C, Coonishish J, Haddad P, Cuerrier A. Plants used by the Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany. *J Ethnopharmacol.* 2006 Apr 21;105(1-2):55-63.
2. Spoor DC, Martineau LC, Leduc C, Benhaddou-Andaloussi A, Meddah B, Harris C, et al. Selected plant species from the Cree pharmacopoeia of northern Quebec possess anti-diabetic potential. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006 Aug-Sep;84(8-9):847-58.
3. Fraser MH, Cuerrier A, Haddad PS, Arnason JT, Owen PL, Johns T. Medicinal plants of Cree communities (Quebec, Canada): antioxidant activity of plants used to treat type 2 diabetes symptoms. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007 Nov;85(11):1200-14.
4. Harbilas D, Martineau LC, Harris CS, Adeyiwola-Spoor DC, Saleem A, Lambert J, et al. Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: part II. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009 Jun;87(6):479-92.
5. Gervois P, Fruchart JC. [PPAR gamma: a major nuclear receptor in adipogenesis]. *Med Sci (Paris).* 2003 Jan;19(1):20-2.
6. Ch. Chartier HS, P.Goetz. Monographie médicalisée: Thé du Labrador (lédon du Groenland) (*Ledum groenlandicum* Oeder). *Phytothérapie.* 2005;2:84-7.
7. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002 Apr;23(2):201-29.
8. Saleem A, Harris CS, Asim M, Cuerrier A, Martineau L, Haddad PS, et al. A RP-HPLC-DAD-APCI/MSD method for the characterisation of medicinal Ericaceae used by the Eeyou Istchee Cree First Nations. *Phytochem Anal.* 2010 Jul;21(4):328-39.
9. Hegele RA. Genes and environment in type 2 diabetes and atherosclerosis in aboriginal Canadians. *Curr Atheroscler Rep.* 2001 May;3(3):216-21.
10. Kletzien RF, Clarke SD, Ulrich RG. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol.* 1992 Feb;41(2):393-8.
11. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes.* 1998 Apr;47(4):507-14.
12. Harp. AWHaJB. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *ajpcell.* 2000.
13. Pinent M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L, Hackl H, Quackenbush J, et al. Grape-seed derived procyanidins interfere with adipogenesis of 3T3-L1 cells at the onset of differentiation. *Int J Obes (Lond).* 2005 Aug;29(8):934-41.
14. CHIEN P-J. Dietary Flavonoids Suppress Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. *Journal of Food and Drug Analysis.* 2005;13(2):168-17.
15. Shin DW, Kim SN, Lee SM, Lee W, Song MJ, Park SM, et al. (-)-Catechin promotes adipocyte differentiation in human bone marrow mesenchymal stem cells through PPAR gamma transactivation. *Biochem Pharmacol.* 2009 Jan 1;77(1):125-33.

16. Mochizuki M, Hasegawa N. Stereospecific effects of catechin isomers on insulin induced lipogenesis in 3T3-L1 cells. *Phytother Res.* 2004 Jun;18(6):449-50.
17. Furuyashiki T, Nagayasu H, Aoki Y, Bessho H, Hashimoto T, Kanazawa K, et al. Tea catechin suppresses adipocyte differentiation accompanied by down-regulation of PPARgamma2 and C/EBPalpha in 3T3-L1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004 Nov;68(11):2353-9.
18. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* 1997 Feb 7;272(6):3406-10.



## 4 Chapitre C: Article 2

### **Rhododendron groenlandicum, an antidiabetic plant of the Eastern James Bay Cree, attenuates insulin resistance in a diet-induced obesity mouse model.**

#### **Authors**

Meriem Ouchfoun <sup>1,3</sup>, Antoine Brault <sup>1,3</sup>, Diane Vallerand <sup>1,3</sup>, Lina Musallam <sup>1,3</sup>, John T. Arnason <sup>2,3</sup>, Pierre S. Haddad <sup>1,3</sup>

#### **Affiliation**

<sup>1</sup> Natural Health Products and Metabolic Diseases Laboratory, Dept. of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada

<sup>2</sup> Phytochemistry, Medicinal Plant and Ethnopharmacology Laboratory, Dept. of Biology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada

<sup>3</sup> Canadian Institutes of Health Research Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines and Montreal Diabetes Research Center, Montréal, Quebec, Canada

#### **Address for correspondence**

Pierre S. Haddad, PhD

Department of Pharmacology

Université de Montréal

P.O. Box 6128, Station Centre-Ville

Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, hyperglycemia, hyperinsulinemia fatty liver, Labrador tea, DIO mice, AKT, AMPK, GLUT4, SREBP-1, PPAR  $\gamma$  natural health products, traditional medicine.

**Abstract:**

We investigated the anti-diabetic effect of a medicinal plant used by the Cree nation of northern Quebec, *Rhododendron groenlandicum* (Labrador Tea) in a diet-induced obesity (DIO) mouse model. C57BL6 mice were randomly divided into five groups and given a standard chow diet (~ 4% of energy derived from lipids) or a high fat-diet (~ 35% of energy derived from lipids) during 8 weeks until they became obese and insulin resistant. Treatment then began by adding the plant extract at 3 different doses (125, 250, 500 mg/kg) into the high fat diet for another 8 weeks. At the end of the study, insulin sensitive tissues (liver, skeletal muscle, adipose tissue) were collected to investigate anti-diabetic effects and examine the plant's molecular mechanisms. *R. groenlandicum* prevented weight gain (by 6%) without altering food intake. It also reduced blood glucose (decrease of 13%) and plasma insulin (decrease of 65%) while preventing hepatic steatosis (up to 42% reduction in hepatic triglyceride levels) in DIO mice. Western immunoblot analysis of different tissues, collected at the end of the study, demonstrated that *R. groenlandicum* stimulates the activation of insulin dependent AKT pathway and increased the protein content of Glut 4 in skeletal muscle. In the liver, *R. groenlandicum* stimulated two pathways; the insulin dependent Akt and the insulin independent AMPK ones. The improvement of hepatic steatosis observed in DIO treated mice was associated with a reduction of inflammation (as evidenced by decreased IKK alpha / beta activity) and with a decrease in the hepatic content of SREBP-1, a transcription factor involved in de novo lipogenesis. These data suggest that *R. groenlandicum* exerts potential anti-diabetic action by improving insulin sensitivity and mitigating high-fat diet-induced obesity and hyperglycemia. They also validate the safety and efficacy of this plant from traditional Cree medicine. *Rhododendron groenlandicum* thus represents a promising candidate for culturally relevant complementary treatment in Cree diabetics.

## **Introduction:**

Nearly 300 million people are affected and/or have a risk of developing type 2 diabetes worldwide (International Diabetes Federation). According to World Health Organization (WHO), diabetes has become the fourth or fifth cause of death in most developed countries. Only in Canada, the prevalence of people living with diabetes has reached approximately 5.5% of the population (Health Canada 2006). This rate is much higher among some Canadian Aboriginal population where diabetes prevalence is almost 3 to 5 times higher due to their sedentary lifestyle and genetic predisposition (1). Diabetic complications are also much more pronounced in this population, in part due to the low adherence to drug treatment caused by the cultural disconnect of modern pharmaceutical therapeutics (2). Our Team has thus been working with the Cree of Eeyou Istchii (Eastern James Bay area of Quebec, Canada) to document the potential of their traditional pharmacopeia stemming from the Boreal forest to mitigate type 2 diabetes and its precursor, obesity.

Obesity is indeed a major risk factor for insulin resistance and type 2 diabetes. Insulin resistance is characterized by a decrease in the ability of target tissues, especially muscle, liver and adipose tissue, to respond to insulin effects. Therefore, at normal concentrations, insulin is unable to produce an adequate biological response. To compensate, insulin secreting  $\beta$  pancreatic cells increase their release of the hormone, thus resulting in a state of hyperinsulinemia. Eventually,  $\beta$  cell dysfunction leads to impaired insulin secretion which accentuates deregulation of glucose and lipid metabolism in insulin sensitive tissues such as skeletal muscle, adipose tissue and liver.

The muscle is the main site of glucose disposal in human, and approximately 80% of total body glucose uptake occurs in skeletal muscle (3) through insulin- and exercise-sensitive glucose transporters, Glut4. Following exercise or insulin stimulation, Glut4 transporters translocate from intracellular vesicles (basal state) to the cell surface of muscle cells (and, to a lesser extent, of adipose cells) to mediate glucose uptake from the bloodstream, without necessarily altering expression levels of the transport protein. Both

the insulin-dependent Akt pathway (4) and insulin-independent exercise pathway implicating AMPK (5) can modulate Glut4 translocation. In addition, manipulation of Glut4 levels in transgenic mice revealed that glucose homeostasis is also highly sensitive to Glut4 expression levels. In fact, specific elevation in the level of Glut4 expression in the muscle prevents insulin resistance (6). Finally, AMPK activation also upregulates skeletal muscle Glut4 expression thus leading to increased insulin sensitivity glucose uptake by this tissue (5). We therefore assessed these three key components of muscle glucose homeostasis, Akt, AMPK and Glut4, in skeletal tissues of obese and insulin-resistant mice treated with *R. groenlandicum*, a promising antidiabetic Cree medicinal plant ((1), see further below).

Adipose tissue is a major site of fatty acid synthesis and storage. PPAR  $\gamma$  and CCAAT/enhancer binding protein (C/EBPs) are the two key factors affecting the proliferation and differentiation of adipose cells (7) and are responsible for lipid accumulation into white adipose tissue (WAT). Adipogenesis is the process of cell differentiation by which preadipocytes become adipocytes with the characteristic intracellular accumulation triglycerides (TG). Thiazolidinediones, a class of oral hypoglycemic drugs that act through PPAR  $\gamma$  agonism, can improve insulin sensitivity and glucose tolerance by promoting the storage of blood lipids (free fatty acids) into the WAT (8), thereby preventing ectopic fat storage in muscle and liver. On the other hand, the physiological role of WAT does not only relate to simple energy storage (9).

WAT also plays an important role in regulating systemic insulin sensitivity by secreting adipokines such as adiponectin and leptin which influence whole body metabolism (10). Adiponectin is a protein hormone that modulates a number of metabolic processes, including glucose regulation and fatty acid catabolism (11). It plays a role in the suppression of the metabolic derangements that may result in type 2 diabetes (12), obesity, atherosclerosis (11), non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and metabolic syndrome. Leptin is also a protein hormone that plays a key role in regulating energy intake and energy expenditure, including appetite and metabolism (13). Obesity is often associated with an elevated leptin-to-adiponectin ratio and leptin resistance is frequent in obese



individuals, thereby deregulating satiety signals (14). In the present study, we therefore paid attention to PPAR  $\gamma$ , C/EBP, adiponectin and leptin parameters.

The liver plays a crucial role in the homeostasis of glucose by its ability to control blood sugar level through glucose production or storage, notably in the form of glycogen. This organ also regulates lipid homeostasis through a process implicating key lipogenic enzymes such as acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FAS), as well as the transcription factor sterol response element-binding protein-1 (SREBP-1) (15). The latter controls the synthesis of cholesterol, fatty acids and triglycerides (16) and may be involved in the pathogenesis of hepatic insulin resistance (17) through the enhancement of lipogenic enzymes. This leads to the intracellular accumulation of triglycerides and hence hepatosteatosis (15). The increase of SREBP-1 expression is usually caused by hyperinsulinemia and inflammatory cytokine such as IKK (18, 19). Hence, ACC, AMPK, SREBP-1 and IKK have been assessed in this study to determine the effects of *R. groenlandicum* on liver in vivo.

*Rhododendron groenlandicum*, commonly known as Labrador Tea, is a medicinal plant used a lot by the Cree nation of the Eastern James Bay, in Quebec. This endemic North American plant is widely distributed in the Canadian Boreal forest and grows mostly in bogs and wet woodlands (20). It is a low shrub of 30 to 120 cm with evergreen leaves belonging to the Heath family (Ericaceae). Leaf infusions are used as a beverage in Aboriginal traditional medicine to treat several diseases such as asthma, diabetes, liver and kidney infections (21). Other pharmacological activities include antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic properties (22). The chemical constituents of *R. groenlandicum* consist mainly of flavonoids and phenolic compounds that participate in the plant's medicinal proprieties (23). Our previous studies demonstrated that *R. groenlandicum* exerts promising antidiabetic effects on several insulin sensitive cell lines, notably skeletal muscle C2C12 and adipocytic 3T3-L1 cells (24), in part through a metformin-like mechanism (25). We therefore sought to confirm the plant's antidiabetic potential in vivo and to further investigate the mechanisms by which this plant can improve systemic glucose and lipid homeostasis. For this purpose, we chose the diet-induced obesity

(DIO) mouse model. Indeed, mice fed chronically with a high fat diet develop obesity, hyperglycemia and hyperlipidemia (26). The DIO model thus adequately reflects the fact that a high-fat diet is the major environmental factor causing overweight and participating in the metabolic syndrome to type 2 diabetes continuum in humans (27).

## **Materials and methods:**

### ***Plant materials:***

The leaves of *Rhododendron groenlandicum* were harvested in the Eeyou Istchii territory, QC, Canada, dried and kept in dry cool conditions until use. The plant was identified by taxonomist Dr A. Cuerrier and voucher specimens were deposited at the Marie-Victorin Herbarium of the Montreal Botanic Garden. The 80% ethanol extract was prepared as described previously (23, 24).

### ***Animals and diets:***

Four-week-old male C57BL/6 mice were purchased from Charles River (St-Constant, QC), housed in separate cages and kept in a temperature and humidity controlled room with a 12h light-dark cycle. They were fed with commercial chow diet for 2 days to stabilize their metabolic condition and allow them to adjust to the new environment. Then, the mice were randomly divided into 5 groups (n=12/group); one group received standard chow diet (Charles River) throughout the 16-week study (CHOW control group), one group received a high fat diet (HFD; Bio-Serv, Frenchtown, NJ, USA) throughout the 16-week study (DIO-control group). This diet provides 35% of the energy in the form of lipids (Table I). The other 3 groups received HFD for 8 weeks until they became obese and insulin resistant. The treatment protocol was then initiated by adding the *R. groenlandicum* extract into the HFD at 3 different doses (125, 250, 500 mg/kg) for another 8 weeks. Diets were prepared freshly every week and stored at 4°C. The food and the water were provided ad libitum and replenished every 3-4 days. During the study, body weight, food intake, water intake and blood glucose level were measured 2 or 3 times a week, at the same time in the morning. Glycemia was measured in blood from the tail vein using a commercial glucometer (Accu-Check Roche, Montreal, QC). At the end of the treatment study, the mice were anaesthetized (intraperitoneal sodium pentobarbital, 45 mg/kg), sacrificed by exsanguination, and organs such as liver, skeletal muscle, WAT (epididymal and

retroperitoneal fat pads) and kidney were immediately collected, weighted and stored at -80°C for further analysis.

All animal experiments were conducted in respect of the guidelines from the Canadian Council for the Care and Protection of Animals and were approved by the Université de Montréal Animal Experimentation Ethics Committee.

### ***Biochemical assays:***

On the last day of study, a complete blood sample was collected from the abdominal aorta after deep anesthesia and the plasma was isolated by centrifugation at 2500 rpm for 5 min at 4°C. Plasma insulin (Linco; St-Charles, MO) adiponectin and leptin (Millipore; St-Charles, MO) were determined using radioimmunoassay kits according to manufacturer specifications. Circulating lipids (triglycerides, total cholesterol, LDL, HDL) as well as liver and kidney functional parameters (ALT, AST, creatinine, alkaline phosphatase) were assessed by standard Clinical Biochemistry protocols at Sainte-Justine's Children Hospital (Montreal, Quebec).

### ***Histological Evaluation:***

Livers from each mouse were harvested and dissected sections were fixed in 10% formalin solution and embedded in paraffin. The sections were cut, mounted on glass slides and stained with hematoxylin phloxine saffron (HPS) by the Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC), Department of Histology, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada. Liver steatosis was scored by at least two individuals in a blinded fashion for each animal by assessing the severity of lipid accumulation in hepatocytes. The percentage of macrovesicular fat accumulation was segregated into 4 grades as previously described (28, 29): grade 0 representing 0 to 5% of fat-laden hepatocytes; grade 1, 5 to 33%; grade 2, 33 to 66%; and grade 3, 66-100%.

***Measurement of tissue triglyceride content:***

Liver samples (about 100 mg each) were powdered under liquid nitrogen and extracted with chloroform/methanol (2:1) following the method of Folch et al. (30). Samples were incubated for 48 h at room temperature, then 0.2 vol of NaCl was added and centrifuged at 2000 rpm for 3 min. After removal of the upper phase and conversion of the infranatant to a uniform phase with methanol, total TG content were determined by using a commercial kit (Triglycerides standard, Randox Laboratories Ltd., United Kingdom).

***Western Blot analysis:***

Frozen tissue (muscle, liver and WAT) samples were homogenized in RIPA lysis buffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% glycerol, 1% Triton-X 100, 0.1% SDS, pH 7.4) containing protease and phosphatase inhibitors (2 mM PMSF, 10 mM NaF, 100  $\mu$ M Na-orthovanadate, 1mM Na-pyrophosphate). To determine Glut4 protein levels, muscles were lysed in sucrose buffer instead (Tris buffer pH 7.4, 20 mM Tris-HCl, 255 mM sucrose, 1 mM EDTA) containing the same cocktail of protease and phosphatase inhibitors. After homogenization, samples were centrifuged at 12000 g for 12 min at 4°C and supernatant was then removed and stored at -80°C until analysis. Total protein content of each sample was quantified using the Bradford method (31). Equal amounts of protein (50  $\mu$ g) were subjected to electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membrane (Millipore, Bedford, MA). Membranes were first blocked for 2 hours at room temperature in 5% nonfat dry milk in TBST (20 mM Tris; pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20), then incubated with primary antibodies overnight at 4°C. The membranes were washed three times with TBST and then incubated with the secondary antibody for 1 hour at room temperature. The signal was revealed by ECL Plus Western blotting detection system (Perkin Elmer, Woodbridge, Canada). Membranes were probed with the following antibodies; p-AKT (Ser 473), AKT, p-ACC (Ser 79), ACC, p-AMPK $\alpha$  (Thr 172), AMPK, p-IKK  $\alpha\beta$  (Ser176/180),  $\beta$ -actin (1:1000 dilution, 5% BSA, Cell Signaling Technology, Danvers, MA); GLUT 4 (1:1000 dilution, 5% milk, Cell Signaling Technology, Danvers, MA); PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , SREBP-1, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$

(1:200 dilution; 5% milk, Santa Cruz Biotechnology,inc. Santa Cruz, CA). The anti-rabbit IgG HRP-conjugated secondary antibodies or anti-mouse IgG HRP-conjugated secondary antibodies were used at 1:4000 dilutions in 5% milk in TBST (Cell Signaling Technology).

### ***PPAR $\gamma$ Activation Experiments:***

Using a nuclear receptor reporter assay, *R. groenlandicum* extract was tested for agonist and antagonist activity against PPAR $\gamma$  by the Contract Research Organization Indigo Biosciences (State College, PA, USA). Briefly, HEK 293-T cells were transfected with Gal4-human PPAR $\gamma$ , Gal 4-luciferase and pRL as previously described (32). Cells were incubated with different concentrations of *R. groenlandicum* (100, 25, 6.25, 1.56 and 0.39  $\mu\text{g/ml}$ ), of the PPAR $\gamma$  agonist Rosiglitazone (20, 2, 0.2, 0.02 and 0.002  $\mu\text{M}$ ) or of the PPAR $\gamma$  antagonist GW9662 (10, 1, 0.1, and 0.01  $\mu\text{M}$ ) for 14h. Luciferase activity was then determined and the EC50 and IC50 values were calculated by Prism 4.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

### ***Statistical analysis:***

Results are presented as means  $\pm$  SEM. Data analyses were performed using SigmaStat 3.1 software (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Statistically significant differences between group means were assessed by one-way ANOVA, with appropriate post-hoc tests. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

## Results:

### Diet-induced-obesity (DIO) model

To induce obesity and a pre-diabetic state, DIO group were fed with high fat diet (HFD; composition in Table I) for a period of 16 weeks. This resulted in a significant weight gain as compared to standard CHOW fed group ( $47.8 \pm 0.6$  g vs  $36.5 \pm 0.9$  g respectively;  $p < 0.05$ ; Table II and Figure 1A). This was associated with a significant increase in liver, WAT (retroperitoneal fat pad) and brown adipose tissue weights ( $p < 0.05$ ; Table II). This occurred without any change in food intake between the DIO and CHOW groups (data not shown). In addition, blood lipid profile reflected the high fat intake since LDL, HDL as well as total cholesterol were doubled in DIO animals when compared to CHOW congeners (Table III).

In parallel, a state of insulin resistance was established as evidenced by mild hyperglycemia and major hyperinsulinemia in DIO mice (33% and 8-fold increases, respectively, vs CHOW;  $p < 0.05$ ; Table III). This was corroborated by the high level of grade 3 liver steatosis (83% for DIO vs 0% for CHOW,  $p < 0.05$ ) and associated hepatic accumulation of triglycerides ( $20.3 \pm 1.8$  for DIO vs  $4.71 \pm 0.57$  for CHOW mg/g Liver;  $p < 0.05$ ; Table IV). Finally, circulating Leptin/Adiponectin ratio, also indicative of insulin resistance, significantly increased from  $1.48 \pm 0.08$  in CHOW to  $2.63 \pm 0.18$  in DIO ( $p < 0.05$ ; Table III).

### ***R. groenlandicum* significantly decreases glycemia, hepatic steatosis and insulin resistance of DIO mice after 8 weeks of treatment**

When administered for the last half of a 16-week HFD protocol, *R. groenlandicum* exhibited a significant effect on glycemia. Indeed, when the area under the glycemia-versus-time curve was assessed for the last 4 weeks of treatment, the two highest doses of *R. groenlandicum* diminished nonfasting blood glucose levels by about 12.4% and 12.7% respectively as compared to DIO control levels ( $p < 0.05$ ; Fig 1B). This effect was more pronounced for glycemia measured at the end of treatments. In fact, those levels ( $8.33 \pm$

0.38,  $7.68 \pm 0.39$  and  $8.37 \pm 0.34$  mM, for the 125, 250 and 500 mg/kg/d groups, respectively) were between 25 to 30% lower than those of the DIO-control group ( $10.99 \pm 0.67$  mM;  $p < 0.05$ ; Table III), without being significantly different from the CHOW group ( $7.40 \pm 0.17$ ). *R. groenlandicum* treatment also had a major impact on insulin serum levels, reducing them by 62-66% when compared to DIO-control levels ( $p < 0.05$  for 250 mg/kg/d group; Table III); however, they were still significantly higher than those of the CHOW group ( $p < 0.05$ ).

Liver steatosis was significantly improved when the animals ingested *R. groenlandicum* alongside the HFD ( $p < 0.05$ ; Chi-square test; Table IV and Figure 2). From a proportion of 92% of control DIO animals exhibiting more severe steatosis (Grades 2 or 3), only 50 to 67% of plant-treated animals had the same. Conversely, healthy grade 0 livers, absent in the control DIO group, were present in 16 to 33% of DIO animals consuming *R. groenlandicum*. The group receiving the 250 mg/kg/d dose had the best histological profile. In a similar trend, liver TG levels decreased significantly under the influence of plant extract. Again, the 250 mg/kg/d group showed the best outcome. These results were fully compatible with the changes observed at the level of liver weight, where mice treated with 250 mg/kg/d of *R. groenlandicum* had significantly smaller livers than DIO-control animals ( $1.9 \pm 0.7$  g vs.  $2.4 \pm 0.1$  g respectively;  $p < 0.05$ ; Table II).

In contrast, *R. groenlandicum* treatment was only associated with a mild tendency to decrease weight gain; by 6% when considering the AUC of the body weight-versus-time curve (Fig. 1A; N.S.). This trend was slightly more pronounced when considering body weight at the end of treatments (11% difference between the 250 mg/kg/d group and DIO-Control; Table II, N.S.). Moreover, *R. groenlandicum* did not significantly affect food intake (data not shown). Similarly, lipid profile (TG, LDL, HDL and total cholesterol) was not significantly modified by the administration of the plant extract (Table III). This also held true for serum leptin and adiponectin concentrations, as well as their ratio (Table III). Finally, *R. groenlandicum* treatment did not alter liver (ALT, AST) or renal (creatinine and alkaline phosphatase) functional parameters in the blood, thereby attesting to the lack of toxicity of the plant extract in DIO mice (Table III).



To begin elucidating the mechanisms of action of *R. groenlandicum* responsible for the observed systemic metabolic effects in the DIO mouse model, we analyzed the signaling pathways involved in glucose uptake in the muscle, lipid metabolism in the liver and adipogenesis in the adipose tissue.

### ***R. groenlandicum* enhances glucose transporter Glut4 expression through an Akt-dependent pathway in the muscle.**

Figure 3 demonstrates that *R. groenlandicum* treatment increases Akt phosphorylation levels when compared with DIO control mice, the effect being most marked in the 250 mg/kg/d group ( $0.45 \pm 0.09$  vs  $0.20 \pm 0.04$  arbitrary units [a.u.] for DIO control mice;  $p < 0.05$ ; Fig 3A). Similarly, muscle Glut4 protein levels increased in mice fed *R. groenlandicum*, the 250 mg/kg/d group reaching values double that of DIO-control ( $0.78 \pm 0.10$  vs.  $0.37 \pm 0.07$  a.u.;  $p < 0.05$ ; Fig 3B). This occurred without any significant effect on AMPK or its substrate ACC (N.S.; Fig 3, panels C & D).

### ***R. groenlandicum* stimulates AKT and AMPK pathways in the liver.**

The results presented above relating to liver weight and steatosis were indicative of insulin resistance in DIO animals and improved insulin sensitivity after *R. groenlandicum* treatment. Both insulin-dependent Akt and insulin-independent AMPK pathways, known to be involved in hepatic glucose and lipid homeostasis, were thus assessed. As illustrated in Figure 4, *R. groenlandicum* treatment was found to activate both pathways. Again, when compared to control DIO mice, the 250 mg/kg/d group yielded the largest increase in the phosphorylation level of Akt ( $0.99 \pm 0.17$  vs  $0.42 \pm 0.06$  a.u.;  $p < 0.05$ ; Fig. 4A) and AMPK ( $0.41 \pm 0.10$  vs  $0.17 \pm 0.02$  a.u.;  $p < 0.05$ ; Fig. 4B). Interestingly, the phosphorylation of ACC was not significantly affected by *R. groenlandicum* treatment (Fig. 4C).

PPAR $\alpha$  and SREBP-1 were also probed since they represent two important regulators of the genes involved in hepatic lipid metabolism (fatty acid oxidation (33, 34) and de novo lipogenesis (35), respectively). Liver PPAR $\alpha$  content was significantly

increased in DIO control animals as compared to CHOW fed mice ( $0.55 \pm 0.12$  vs  $0.32 \pm 0.10$  a.u., respectively;  $p < 0.05$ ; Fig 4D), suggesting compensatory mechanisms in the face of enhanced fatty acid intake. *R. groenlandicum* treatment had a slight, albeit not statistically significant, tendency to increase hepatic PPAR $\alpha$  levels beyond those of control DIO animals (especially the 125 mg/kg/d group). Nevertheless, hepatic PPAR $\alpha$  protein content in plant extract treated mice remained significantly higher than those of the CHOW group ( $p < 0.05$ ). In the case of SREBP-1, the levels of the 68 KDa active fragments tended to increase in DIO control animals, albeit without reaching statistical significance (Fig 4E). Interestingly, the 250 mg/kg/d *R. groenlandicum* treatment decreased p68 SREBP-1 levels by 39 % as compared to the DIO-control group ( $p = 0.08$ ).

Finally, liver IKK $\alpha\beta$  phosphorylation was assessed in view of its role in mediating inflammation through the NF $\kappa$ B pathway, which is known to participate in hepatic pathogenesis related to metabolic diseases (notably non alcoholic fatty liver disease, NAFLD (18, 19). Consistent with this concept, DIO animals exhibited levels of phosphorylated IKK that were double those observed in CHOW fed mice ( $p < 0.05$ ; Fig. 4F). Conversely, *R. groenlandicum* treatment tended ( $p = 0.07$ ) to diminish phosphorylated IKK levels with increasing doses of the plant, as compared to DIO control mice. Indeed, the 250 and 500 mg/kg/d groups reached values that were no longer statistically different from CHOW fed controls (Fig. 4 F).

### ***R. groenlandicum* has weak effects on adipogenesis in white adipose tissue.**

In a previous study from our team (24), the crude ethanol extract of *R. groenlandicum* showed strong in vitro glitazone like adipogenic activity, suggestive of PPAR $\gamma$  agonism. Studies on PPAR $\gamma$  ligand binding activity were thus conducted using a gene reporter assay in the HEK 293T cell line. Crude *R. groenlandicum* extract was tested over a wide range of concentrations and was found to exhibit weak partial agonistic activity ( $EC_{50} = 2678 \mu\text{g/ml}$ ; Figure 5), as compared to Rosiglitazone, a well-known PPAR $\gamma$  agonist ( $EC_{50} = 0.2896 \mu\text{g/ml}$ ; Fig. 5 inset). Conversely, when antagonistic studies were carried out against Rosiglitazone (800nM) in the same assay, *R. groenlandicum* extract

showed much weaker antagonist activity than GW9662, a typical PPAR $\gamma$  antagonist (IC<sub>50</sub> of 11285 vs 0.2896  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively; data not illustrated).

The expression levels of transcription factors PPAR $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$  and  $\beta$ , and SREBP-1, involved in adipocyte differentiation and lipid homeostasis, were then evaluated in the white adipose tissue (WAT) of all mice and results are presented in Figure 6. Neither the DIO protocol alone nor with *R. groenlandicum* intake had a significant impact on PPAR $\gamma$  levels. Only the 500 mg/kg/d group exhibited a tendency to increase PPAR $\gamma$  levels as compared to DIO control animals ( $1.25 \pm 0.28$  vs  $0.85 \pm 0.11$  a.u. respectively; N.S.; Fig 6 A).

Similarly, the levels of C/EBP  $\alpha$  and C/EBP  $\beta$  in WAT were not significantly affected by the DIO protocol whether in the absence or presence of *R. groenlandicum* treatment (Figure 6, panels C and D). Nevertheless, the ingestion of 500 mg/kg/d of the plant again yielded values of both transcription factors that tended to be higher than DIO control animals ( $0.41 \pm 0.09$  vs  $0.32 \pm 0.04$  a.u. for C/EBP  $\alpha$ ; N.S.; Fig 6 C; and  $0.91 \pm 0.06$  vs  $0.76 \pm 0.06$  a.u. for C/EBP  $\beta$ ; N.S.; Fig. 6 D). Finally, SREBP-1 levels in WAT were not significantly altered by any of the treatment conditions (Fig. 6 B).

## Discussion:

In the contemporary human lifestyle, especially in developed countries but increasingly so in emerging and developing ones, the consumption of a diet that is high in fat contributes directly to visceral obesity, now a leading cause of metabolic disorders such as Type 2 diabetes. The diet-induced-obesity (DIO) mouse model, which is based on the feeding of a high fat diet, therefore represents a valuable tool to investigate and validate new therapeutic avenues in the treatment of obesity and diabetes, including medicinal plants. Indeed, the findings of the present study confirmed the previously reported obesity, hyperglycemia, insulin resistance and fatty liver that are normally associated with the DIO mouse model (26). These are reminiscent of the pathophysiological characteristics of the so-called metabolic syndrome continuum that spans from obesity to non-insulin dependent diabetes mellitus (36).

Aboriginal populations in Canada, as in several other countries, have responded to the sudden lifestyle changes of recent decades (reduced physical activity and increased intake of non-traditional, more western, diets) by a prevalence of obesity and diabetes that reaches levels 3 to 5 times that of non-aboriginal Canadians (1). This situation is confounded by poor compliance to western pharmaceutical therapeutics, in part due to the cultural disconnect of these approaches. Our team has worked for several years with Cree nations of Eeyou Istchii (Eastern James Bay region in Quebec, Canada) to study Boreal forest plants stemming from their traditional pharmacopeia that could represent reliable, culturally better-adapted, complementary and alternative antidiabetic therapeutic approaches.

*Rhododendron groenlandicum*, commonly known as Labrador tea or katchichepukh, is one of the highest ranking plants used by the Cree to treat symptoms of diabetes (21). In our previous in vitro studies, the crude ethanol extract of the plant demonstrated strong antidiabetic potential by stimulating glucose uptake in C2C12 muscle cells and by inducing differentiation in the 3T3-L1 adipocyte cell line (24). In the present study, this antidiabetic activity was investigated in the DIO mouse model. Treatment with *R. groenlandicum* was

administered for 8 weeks, after obesity and mild hyperglycemia were established by an initial 8 weeks of HFD feeding. The results clearly demonstrate that such treatment improves glucose homeostasis in the face of continued HFD feeding and strongly suggest that this is achieved by an attenuation of insulin resistance. Indeed, *R. groenlandicum* treatment significantly countered hyperglycemia, hyperinsulinemia as well as hepatic steatosis; the latter being evident from an improved histological grade as well as from reductions in hepatic TG accumulation and liver weight. Conversely, the elevated leptin/adiponectin ratio observed in DIO animals, which is also indicative of insulin resistance, was not ameliorated by *R. groenlandicum* treatment. Similarly, the plant extract did not influence the weight of WAT. This suggests that Labrador tea extract may act preferentially on the liver while having more modest effects on WAT (discussed further below). Moreover, *R. groenlandicum* administration was not associated with any change in food intake and had only a mild tendency to attenuate obesity. Finally, *R. groenlandicum* was not associated with any toxicity, notably assessed through liver and kidney functional parameters, even with the highest dose of 500 mg/kg/d. This is consistent with the common and long-standing consumption of Labrador tea by Cree populations and confirms GRAS status.

The major organs involved in the regulation of blood glucose levels are the muscle, the liver and the adipose tissue. Therefore, the activation and the expression of key proteins involved in glucose and lipid homeostasis were assessed in these insulin sensitive tissues in order to begin elucidating the molecular mechanisms underlying the apparent systemic antidiabetic activity of *R. groenlandicum*.

Firstly, in the muscle, the expression of Glut4 glucose transporters increased up to two-fold with *R. groenlandicum* treatment as compared to DIO control mice. This is consistent with the literature where a specific elevation of Glut4 expression in the muscle prevents insulin resistance and enhances its sensitivity in normal mice (6). In addition, this increase in muscle Glut4 levels was associated with the activation of the insulin-dependent Akt pathway rather than the insulin-independent AMPK pathway, since neither AMPK nor its substrate ACC were activated. This supports our previous in vitro findings, where *R.*

*groenlandicum* stimulated glucose uptake in C2C12 cells without any synergistic effect with insulin (24).

In contrast, ingestion of this plant extract resulted in the activation of both the Akt and AMPK pathways in the liver. These pathways have been demonstrated to regulate hepatic glucose output, which plays a major role in glucose homeostasis and the pathogenesis of Type 2 diabetes (37, 38). For instance, it is known that the activation of these phosphorylation cascades can reduce hepatic glucose output by stimulating glucose storage as glycogen and by inhibiting gluconeogenesis (39, 40). Indeed, we have observed that *R. groenlandicum* administered in vitro to hepatic cell lines can significantly decrease glucose-6-phosphatase activity while increasing that of glycogen synthase, two key enzymes of gluconeogenesis and glycogen synthesis, respectively (A. Nachar and P.S. Haddad, unpublished observations). Hence, the significant reduction of hyperglycemia afforded in vivo by *R. groenlandicum* can likely be related to a combination of reduced hepatic glucose output and enhanced muscle glucose uptake.

In parallel, it is well documented that ectopic fat accumulation in the liver is a major contributor to the development of insulin resistance in this organ and that this is a crucial component in diabetes pathogenesis (41). Conversely, liver insulin sensitivity is enhanced by stimulating hepatic fatty acid oxidation through AMPK/ACC (42-44) and/or PPAR $\alpha$  (45, 46) activities, on one hand, and by inhibiting cholesterol and triglyceride synthesis through regulation of SREBP-1, on the other (47, 48). Results obtained in the control DIO mice were consistent with these concepts since the liver steatosis and increased hepatic TG levels were associated with increased SREBP-1 and IKK levels; these probably being related to hyperinsulinemia and enhanced circulating cytokines acting through the NF $\kappa$ B inflammatory pathway, respectively (18, 19). On the other hand, the enhanced PPAR $\alpha$  levels observed in DIO control animals suggest that compensatory mechanisms may have been induced in the face of sustained high intake in lipids.

The results obtained in *R. groenlandicum* treated mice indicate that the plant extract can also improve hepatic lipid homeostasis. Firstly, as mentioned, *R. groenlandicum* treatment significantly attenuated liver steatosis and reduced hepatic intracellular TG.

Secondly, elevated levels of PPAR $\alpha$  were maintained and SREBP-1 levels tended to be reduced in *R. groenlandicum* treated mice as compared to DIO control congeners. Finally, the DIO-associated increase in IKK phosphorylation appeared to be diminished as the dose of *R. groenlandicum* administered increased, suggesting a tendency for the plant to decrease hepatic inflammation through NF $\kappa$ B signaling. Taken altogether, these data suggest that *R. groenlandicum* treatment could tip the balance towards increased oxidation of fatty acids and less lipid storage in the liver, thus improving hepatic steatosis and hence insulin sensitivity.

It is well documented that thiazolidinediones (PPAR  $\gamma$  agonists) improve insulin sensitivity and glucose tolerance by favoring the storage of lipids (free fatty acids) in the adipose tissues as opposed to ectopic sites such as muscle and liver (49, 50). As mentioned, previous studies demonstrated that *R. groenlandicum* strongly stimulates differentiation of 3T3 L1 adipocytes in culture (24), suggesting PPAR  $\gamma$  agonism. Further in vitro work in the present study determined that the plant acts as a weak partial PPAR  $\gamma$  agonist at lower doses and can be mildly antagonistic at higher doses in a HEK293T cell based reporter gene assay. The results of the current studies further demonstrated that *R. groenlandicum* has weak effects on WAT in vivo. Indeed, the weight of retroperitoneal fat pad (WAT), which is a key site of fatty acid synthesis and storage, was not altered by *R. groenlandicum* treatment. Similarly, the levels of key transcription factors involved in adipogenesis (including C/EBPs and PPAR  $\gamma$ ) and lipogenesis (such as SREBP-1) were not altered in WAT by treatment with the plant extract; save perhaps some pro-adipogenic tendencies observed at the highest dose of 500 mg/kg/d that could be related to its mixed effects on PPAR  $\gamma$ . These results therefore support our interpretation that *R. groenlandicum* probably exerts its antidiabetic activity by acting mainly on the liver and muscle.

In conclusion, the current studies provide solid evidence that treatment with *R. groenlandicum*, a medicinal plant from the Cree pharmacopeia, exerts significant antidiabetic activity by improving systemic glucose and tissue lipid homeostasis. Mechanisms point to the attenuation of insulin resistance caused by a high fat diet. This is apparently affected, on the one hand, by increasing muscle Glut4 protein levels with

expected greater muscle glucose uptake, and, on the other, by reducing hepatic TG accumulation and steatosis, likely through concomitantly increased lipid  $\beta$  oxidation and decreased lipogenesis in the liver. These effects seem to be mediated only by the insulin-dependent pathway in muscle, whereas both insulin-dependent and -independent (AMPK) pathways are involved in the liver. Together with our previous *in vitro* data, the present studies lend credible, evidence-based support for the use of Labrador tea as a promising GRAS medicinal plant and culturally adapted therapeutic avenue for Cree diabetics. In fact, clinical studies are currently underway whereby Cree diabetics are taking traditional medicine alongside conventional diabetes drug therapy, and are being followed by both Cree healers and health professionals. It is hoped that the inclusion of Cree traditional medicine in diabetes care will contribute to reduce the dramatic burden of type 2 diabetes in this population.

### **Acknowledgements:**

This work was supported by a Team Grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines) to P.S.H., J.T.A., and L.M. and was conducted with the consent and support of the Cree Nation of Mistissini, of the Whapmagoostui First Nation, of the Cree Nation of Nemaska, of the Waskaganish First Nation and of the Cree Board of Health and Social Services of James Bay (Quebec, Canada). Very special thanks are due to E. Coon Come, M. Gunner, C. Husky Swallow, J. Husky Swallow, R. Loon, and G. Loon from the Cree Nation of Mistissini as well as 27 other elders and healers, who kindly agreed to be interviewed. They made this article possible by allowing us to use, for the purposes of this research, their knowledge relating to medicinal plants, transmitted to them by their elders. Their trust has also enabled a useful exchange between indigenous knowledge and Western science.



**Table I: General composition of the high-fat<sup>1</sup> and CHOW<sup>2</sup> diet used in this study**

<b>Formula</b>	<b>Concentration (%) DIO</b>	<b>Concentration (%) CHOW</b>
<b>Protein</b>	<b>20.0</b>	<b>18.1</b>
<b>Fiber</b>	<b>0.0</b>	<b>6.7</b>
<b>Carbohydrates</b>	<b>36.3</b>	<b>57</b>
<b>Fat</b>	<b>35.5</b>	<b>3.4</b>
<b>Ash</b>	<b>3.2</b>	<b>6.7</b>
<b>Moisture</b>	<b>&lt; 5.0</b>	<b>--</b>

<sup>1</sup> Mouse diet, high fat diet from Bio-Serv (F3282, Canada)

<sup>2</sup> Mouse diet, 18% autoclavable Rodent CHOW from Charles River (5075, Canada)

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

	CHOW	DIO control	<i>R. groenlandicum</i>		
			125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg
<b>Body weight (g)</b>	36.5 ± 0.9	47.8 ± 0.6*	46.5 ± 0.6*	42.9 ± 1.7*	46.5 ± 0.9*
<b>Liver weight (g)</b>	1.61 ± 0.07	2.45 ± 0.11*	2.15 ± 0.15*	1.92 ± 0.17†	2.18 ± 0.12*
<b>Kidney weight (g)</b>	0.38 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.37 ± 0.01
<b>Retroperitoneal fat pad (g)</b>	0.83 ± 0.04	1.66 ± 0.08*	1.76 ± 0.13*	1.42 ± 0.15*	1.79 ± 0.01*
<b>Epididymal fat pad (g)</b>	1.89 ± 0.12	1.48 ± 0.08	1.61 ± 0.18	1.53 ± 0.13	1.44 ± 0.07
<b>Brown fat pad (g)</b>	0.29 ± 0.02	0.46 ± 0.03*	0.48 ± 0.02*	0.43 ± 0.04*	0.51 ± 0.02*

Data were analyzed using one-way ANOVA. Values (means ± S.E.M; n=12) were taken at the end of the treatment day. \* indicates a p-value < 0.05 significantly different from CHOW group, and † indicates a p-value < 0.05 significantly different from DIO control group

**Table III: Blood parameters in DIO mice at the end of the treatment**

	CHOW	<i>R. groenlandicum</i>			
		DIO control	125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg
<b>Glucose (mmol/L )</b>	7.40 ± 0.17	10.99 ± 0.67 *	8.33 ± 0.38 †	7.68 ± 0.39 †	8.37 ± 0.34 †
<b>Insulin (ng/mL)</b>	4.59 ± 0.75	41.17 ± 17.26 *	15.49 ± 3.81 *	14.32 ± 2.97 *†	14.00 ± 1.99 *
<b>T.G. (mmol/L)</b>	0.80 ± 0.08	0.76 ± 0.04	0.73 ± 0.05	0.66 ± 0.03	0.63 ± 0.03
<b>LDL (mmol/L)</b>	0.70 ± 0.05	1.72 ± 0.09 *	1.53 ± 0.14 *	1.47 ± 0.11 *	1.34 ± 0.09 *
<b>HDL (mmol/L)</b>	0.69 ± 0.09	1.29 ± 0.04 *	1.26 ± 0.06 *	1.15 ± 0.10 *	1.34 ± 0.03 *
<b>Tot Cholesterol (mmol/L)</b>	1.76 ± 0.02	3.35 ± 0.12 *	3.12 ± 0.18 *	2.93 ± 0.20 *	2.96 ± 0.10 *
<b>Leptin (ng/mL)</b>	25.7 ± 1.4	34.4 ± 1.5 *	36.3 ± 1.3 *	32.4 ± 2.5 *	37.2 ± 0.9 *
<b>Adiponectin (ug/ml)</b>	17.4 ± 0.5	13.6 ± 0.9 *	15.4 ± 1.5	13.6 ± 0.8 *	15.6 ± 0.8
<b>Leptin/Adiponectin</b>	1.48 ± 0.08	2.63 ± 0.18 *	2.55 ± 0.23	2.38 ± 0.15	2.45 ± 0.14
<b>ALT (U/L )</b>	25.7 ± 2.5	37.8 ± 3.3 *	35.5 ± 6.6	26.5 ± 2.9	31.3 ± 4.7
<b>AST (U/L)</b>	127.7 ± 21.8	109.8 ± 7.9	100.7 ± 13.8	107.0 ± 9.2	90.9 ± 11.4
<b>Creatinine (U/L)</b>	67.5 ± 14.8	53.7 ± 4.7	56.4 ± 6.2	62.7 ± 6.0	52.8 ± 7.2
<b>A.phosphatase (U/L)</b>	35.2 ± 2.4	63.5 ± 18.3 *	39.6 ± 1.8	35.5 ± 3.5 †	39.5 ± 2.2

Data were analyzed using one-way ANOVA. Values (means ± S.E.M; n=12) were taken at the end of the treatment day. \* indicates a p-value < 0.05 significantly different from CHOW group, and † indicates a p-value < 0.05 significantly different from DIO control group

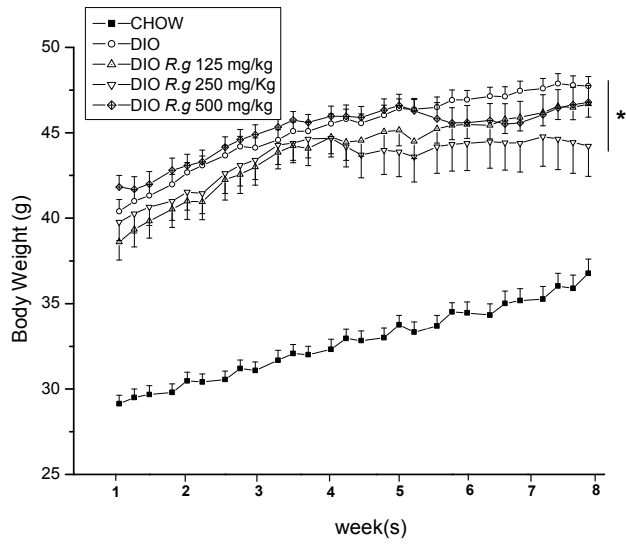
**Table IV: Histological grade of liver steatosis and hepatic triglyceride (TG) levels.**

Histology	CHOW	DIO control	<i>R. groenlandicum</i>		
			125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg
<b>Grade 0</b>	12	0	2	4	2
<b>Grade 1</b>	0	1	2	2	2
<b>Grade 2</b>	0	1	2	3	2
<b>Grade 3</b>	0	10	6	3	6
<b>TG levels</b> (mg/g Liver * Liver index)	4.71 ± 0.57	20.33 ± 1.84 *	14.44 ± 2.37 *	11.84 ± 2.44 *†	15.30 ± 2.06 *

Hematoxylin phloxine saffron stained liver sections (n= 12 / group) were scored for overall amount of macrovesicular fat and score with different degrees ranging from grade 0 (0-5%) to grade 3 (66-100%). The colorimetric dosage of TG levels was determined using a commercial kit (Randox) and data are presented as the mean ± S.E of 12 mice. \*indicates a p-value < 0.05 significantly different from CHOW group, and † indicates a p-value < 0.05 significantly different from DIO control group

Figure 1:

A



B

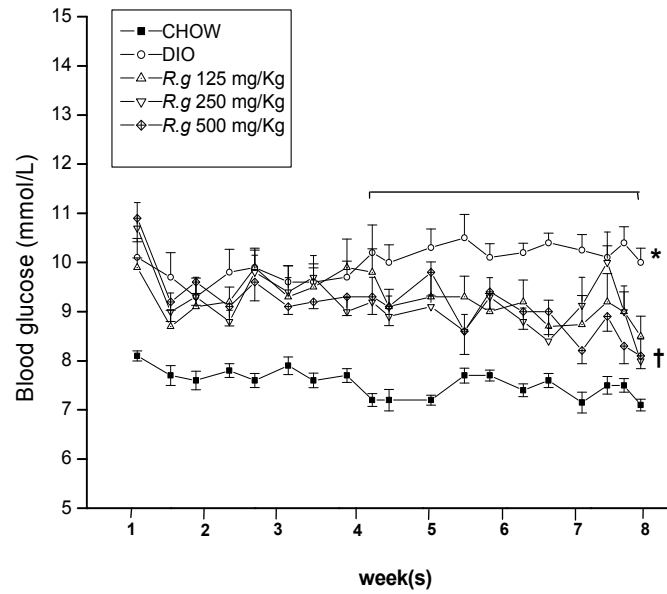


Figure 2:

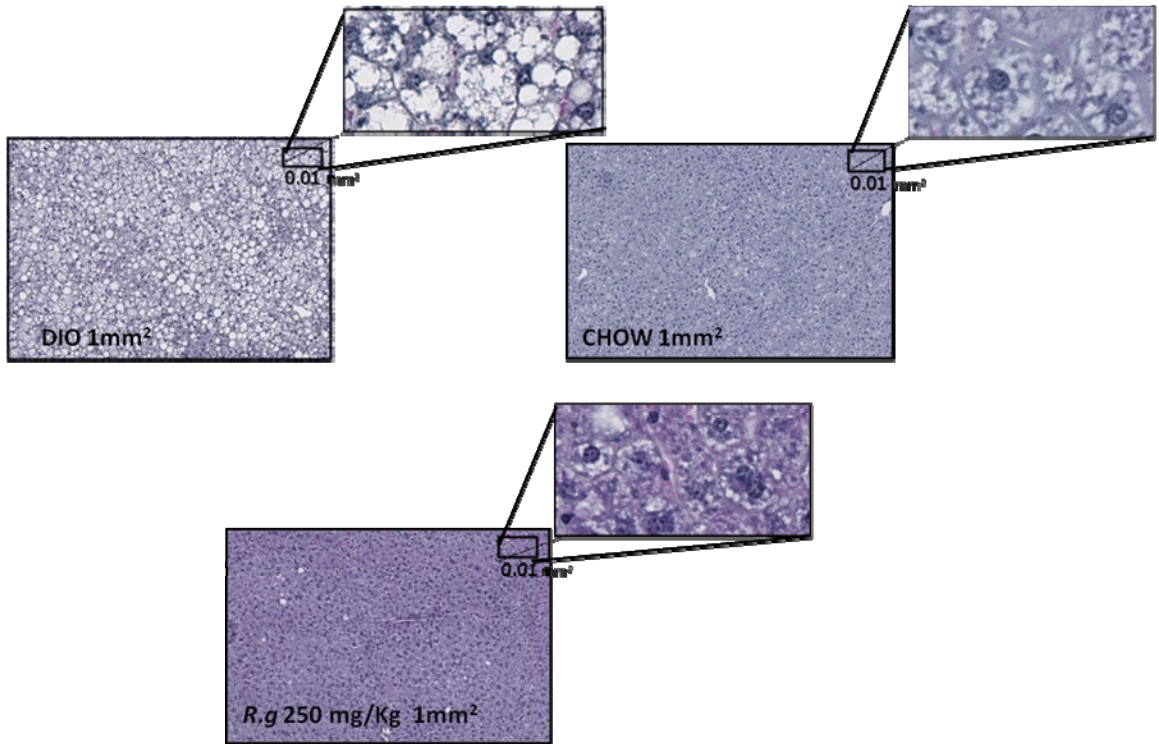


Figure 3:

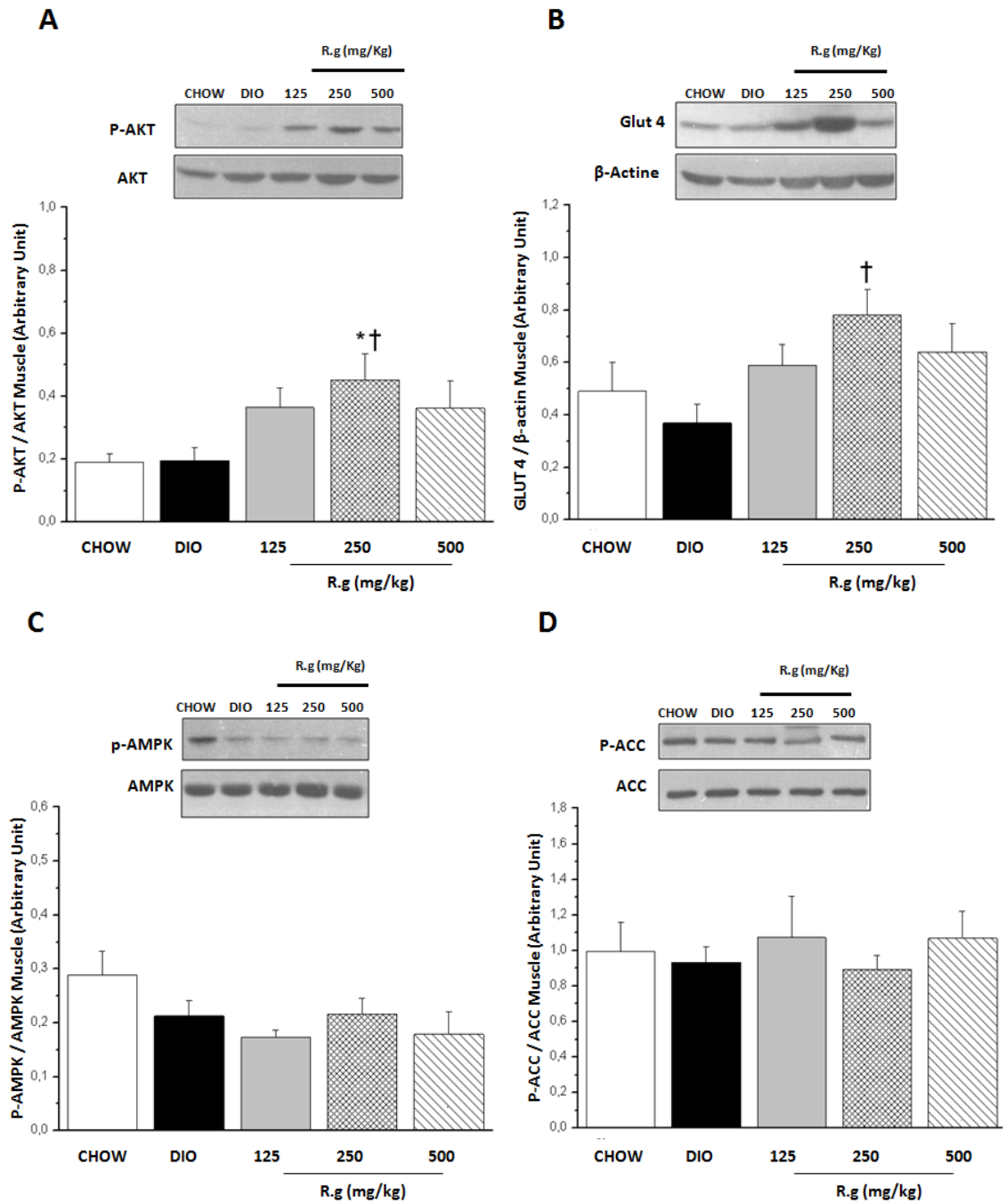
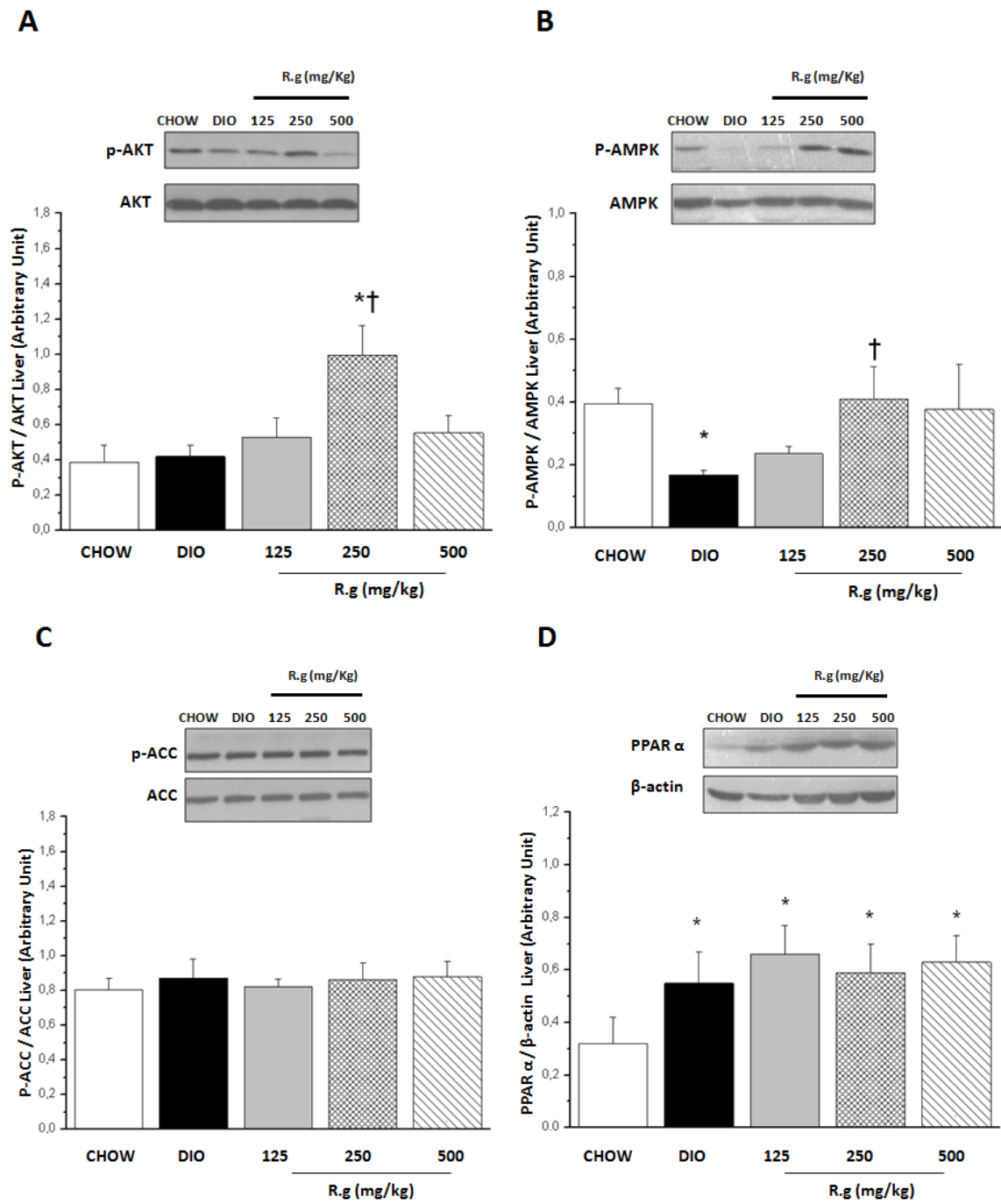


Figure 4:





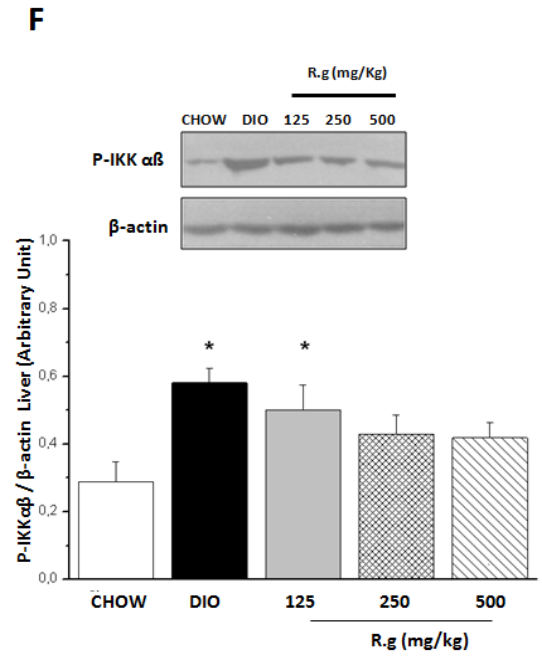
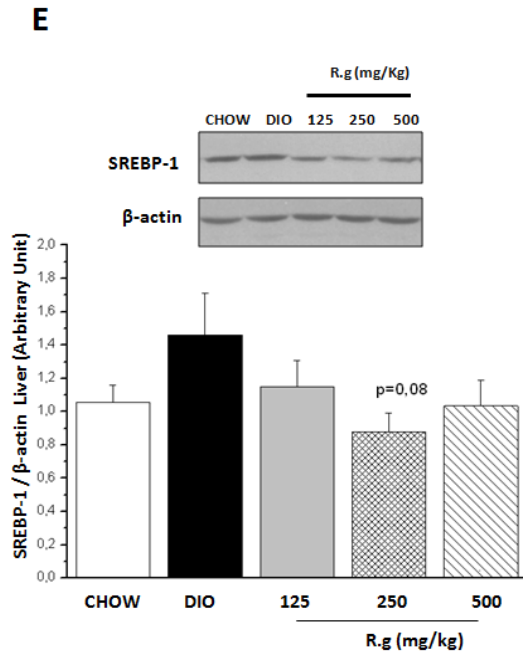


Figure 5:

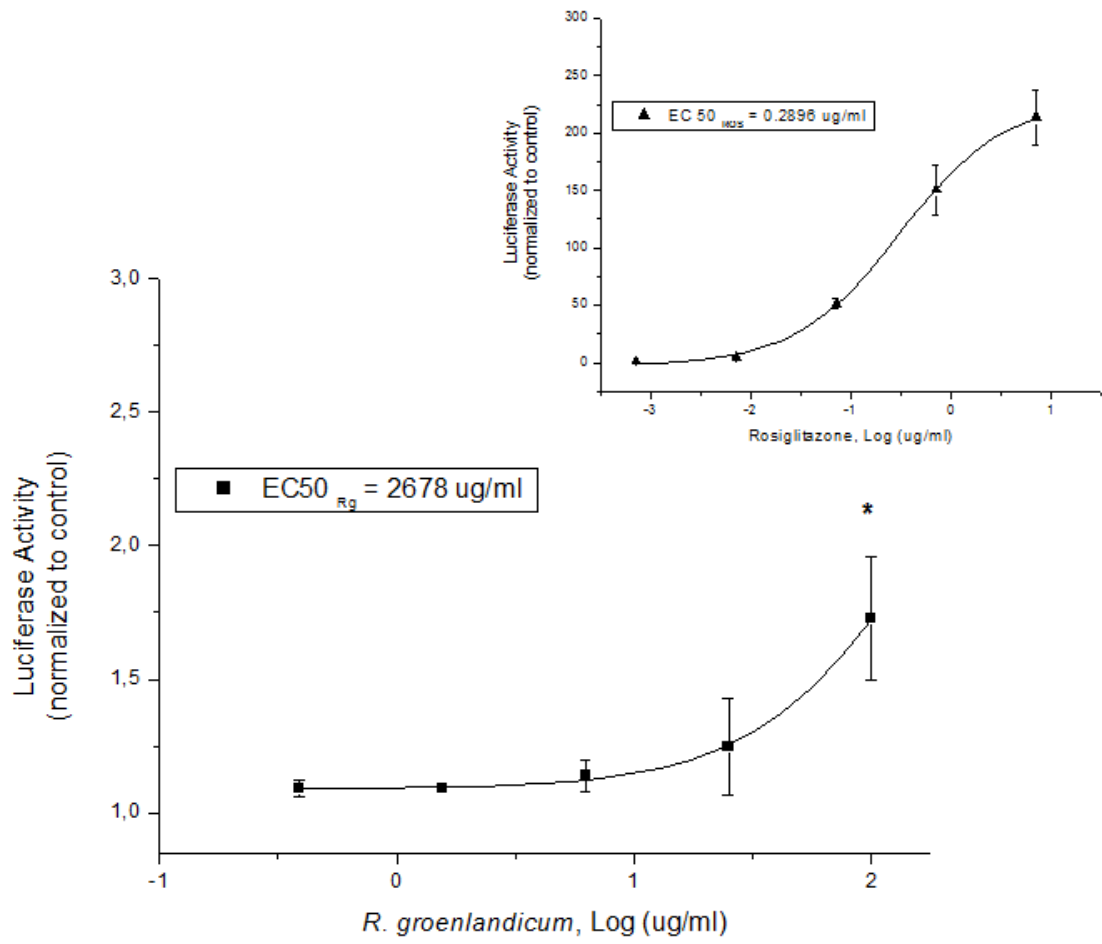
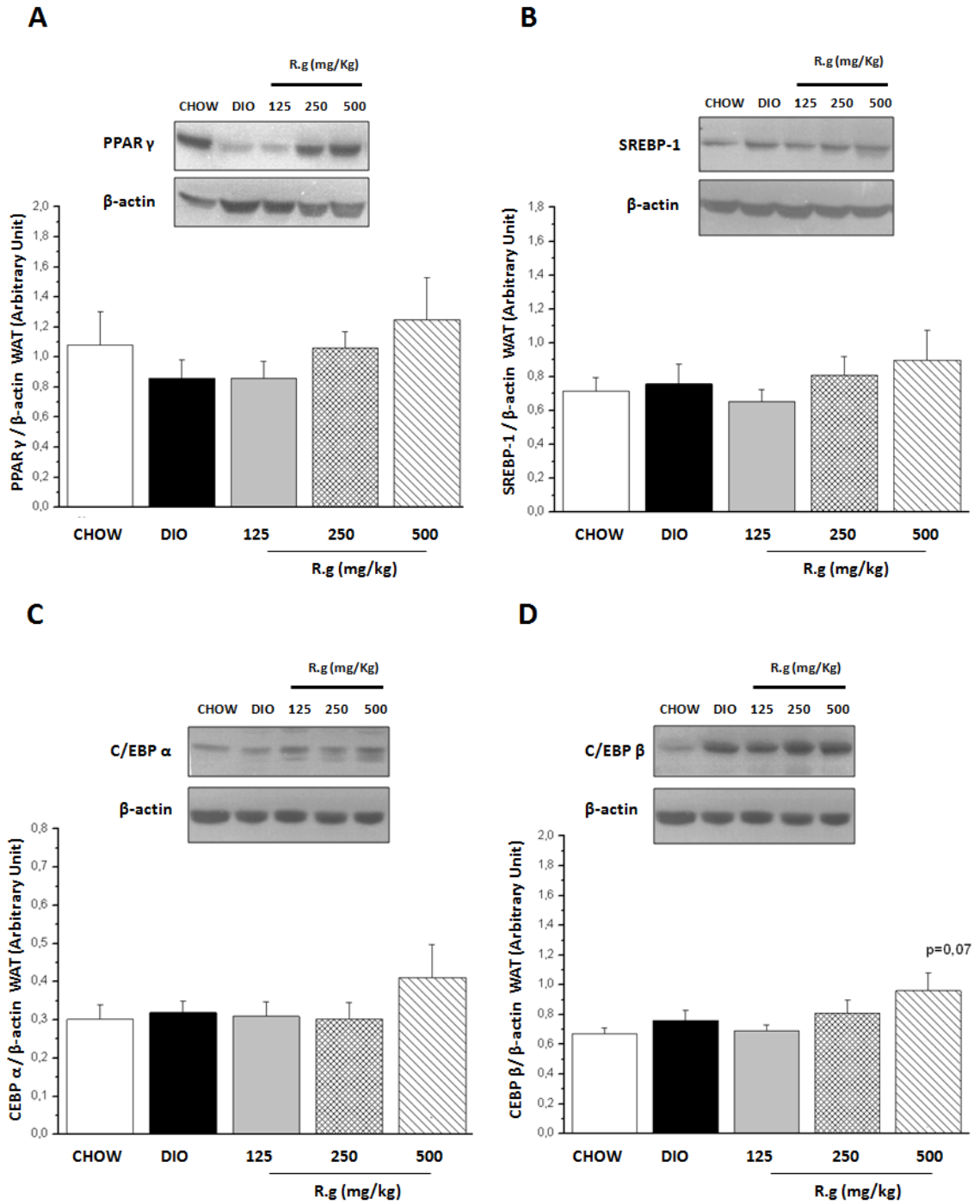


Figure 6:



## Figure Legend:

**Figure 1: *R. groenlandicum* treatment for 8 weeks decreased blood glucose levels and tended to lower body weight of DIO mice.** The area under the weight-versus-time (**A**) and the glycemia-versus-time (**B**) curves were assessed for the first and second 4 weeks of treatment. These parameters were monitored three times a week. \* indicates a p-value  $\leq 0.05$  significantly different from CHOW group, and † indicates a p-value  $\leq 0.05$  significantly different from DIO control group (n = 12 for each group).

**Figure 2: Treatment with *R. groenlandicum* improves hepatic steatosis induced by HFD in DIO mouse model.** Liver sections were prepared and stained with HSP. Liver steatosis was scored (range 0 – 3) by determining the approximate percentage of macrovascular fat. Grade 0: 0-5% fat laden hepatocytes; grade 1: 5-33%; grade 2: 33-66%; grade 3: 66-100%. A representative photo is shown of liver section from mice fed CHOW (panel A; grade 0; n=12), DIO (panel B; grade 3; n=12) or DIO + *R. groenlandicum* at 250 mg/ kg dose (panel C; grade 0; n=12).

**Figure 3: *R. groenlandicum* increased GLUT4 protein content by stimulating the Akt pathway but not the AMPK pathway in skeletal muscle of treated mice.** Samples of skeletal muscle (50  $\mu$ g protein) from mice fed CHOW, DIO and DIO + *R. groenlandicum* (125, 250, 500 mg/Kg) were homogenized and analyzed by immunoblotting. Blots were quantified by densitometry and data are expressed as mean  $\pm$  SEM from 12 animals in each group. Representative immunoblots and their quantification are shown for samples probed with (**A**) p-AKT (Ser 473)/AKT, (**B**) GLUT 4/ $\beta$ -actin, (**C**) p-AMPK $\alpha$  (Thr 172)/AMPK, (**D**) p-ACC (Ser 79)/ACC. \*indicates a p-value  $\leq 0.05$  significantly different from CHOW group, and † indicates a p-value  $< 0.05$  significantly different from DIO control group.

**Figure 4: *R. groenlandicum* activated the AKT and AMPK pathways and tended to decrease SREBP-1 levels in the liver of DIO mice.** Samples of liver tissue (50 µg protein) from mice fed CHOW, DIO and DIO + *R. groenlandicum* (125, 250, 500 mg/Kg) were homogenized and analyzed by immunoblotting. Blots were quantified by densitometry and data are expressed as mean ± SEM from 12 animals in each group. Representative immunoblots and their quantification are shown for samples probed with (A) p-AKT (Ser 473)/AKT, (B) p-AMPKα (Thr 172)/AMPK, (C) p-ACC (Ser 79)/ACC, (D) PPARα/β-actin, (E) SREBP-1 and (F) p-IKKαβ (Ser173/180). \*indicates a p-value ≤ 0.05 significantly different from CHOW group, and † indicates a p-value ≤ 0.05 significantly different from DIO control group.

**Figure 5: *R. groenlandicum* is a weak activator of PPARγ.** HEK 293-T cells were transfected with Gal4-human PPARγ, Gal 4-luciferase and pRL then cells were incubated with different concentrations of *R. groenlandicum* or PPARγ agonist Rosiglitazone. Luciferase activity was then determined and the EC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> values were calculated. \* indicates significantly different (p ≤ 0.05) from vehicle control.

**Figure 6: *R. groenlandicum* has weak effects on adipogenesis in WAT of DIO mice.** Samples of adipose tissue (50 µg protein) from mice fed CHOW, DIO and DIO + *R. groenlandicum* (125, 250, 500 mg/Kg) were homogenized and analyzed by immunoblotting. Blots were quantified by densitometry and data are expressed as mean ± SEM from 12 animals in each group. Representative immunoblots and their quantification are shown for samples probed with (A) PPAR γ, (B) SREBP-1, (C) C/EBPα and (D) C/EBPβ. \*indicates a p-value ≤ 0.05 significantly different from CHOW group, and † indicates a p-value ≤ 0.05 significantly different from DIO control group.

## References

1. Hegele RA. Genes and environment in type 2 diabetes and atherosclerosis in aboriginal Canadians. *Curr Atheroscler Rep.* 2001 May;3(3):216-21.
2. Brassard P, Robinson E, Lavallee C. Prevalence of diabetes mellitus among the James Bay Cree of northern Quebec. *CMAJ.* 1993 Aug 1;149(3):303-7.
3. Wallberg-Henriksson H ZJ. GLUT4: a key player regulating glucose homeostasis? Insights from transgenic and knockout mice (review). *Mol Membr Biol.* 2001;18(3):205-11.
4. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):799-806.
5. Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes.* 1999 Aug;48(8):1667-71.
6. Gibbs EM, Stock JL, McCoid SC, Stukenbrok HA, Pessin JE, Stevenson RW, et al. Glycemic improvement in diabetic db/db mice by overexpression of the human insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4). *J Clin Invest.* 1995 Apr;95(4):1512-8.
7. Farmer SR. Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis. *Int J Obes (Lond).* 2005 Mar;29 Suppl 1:S13-6.
8. Chehade JM, Mooradian AD. A rational approach to drug therapy of type 2 diabetes mellitus. *Drugs.* 2000 Jul;60(1):95-113.
9. Karam JH NM. Chapter 41: Pancreatic hormones and antidiabetic drugs. New York, USA: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2007.
10. Rasouli N KP. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:S64-S73.
11. Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol.* 2003 Mar;148(3):293-300.
12. Ukkola O SM. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities. *J Mol Med.* 2002;80(11):696-702.
13. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995 Jul 28;269(5223):546-9.
14. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* 1996 Feb 1;334(5):292-5.
15. Postic C, Dentin R, Girard J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab.* 2004 Nov;30(5):398-408.
16. Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res.* 2001 Nov;40(6):439-52.
17. Tobe K, Suzuki R, Aoyama M, Yamauchi T, Kamon J, Kubota N, et al. Increased expression of the sterol regulatory element-binding protein-1 gene in insulin receptor substrate-2(-/-) mouse liver. *J Biol Chem.* 2001 Oct 19;276(42):38337-40.

18. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2001 Aug;50(8):1844-50.
19. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005 Feb;11(2):191-8.
20. Ch. Chartier HS, P.Goetz. Monographie médicalisée: Thé du Labrador (lédon du Groenland) (*Ledum groenlandicum* Oeder). *Phytothérapie*. 2005;2:84-7.
21. Leduc C, Coonishish J, Haddad P, Cuerrier A. Plants used by the Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany. *J Ethnopharmacol*. 2006 Apr 21;105(1-2):55-63.
22. Dufour D, Pichette A, Mshvildadze V, Bradette-Hebert ME, Lavoie S, Longtin A, et al. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *J Ethnopharmacol*. 2007 Apr 20;111(1):22-8.
23. Saleem A, Harris CS, Asim M, Cuerrier A, Martineau L, Haddad PS, et al. A RP-HPLC-DAD-APCI/MSD method for the characterisation of medicinal Ericaceae used by the Eeyou Istchee Cree First Nations. *Phytochem Anal*. 2010 Jul;21(4):328-39.
24. Spoor DC, Martineau LC, Leduc C, Benhaddou-Andaloussi A, Meddah B, Harris C, et al. Selected plant species from the Cree pharmacopoeia of northern Quebec possess anti-diabetic potential. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006 Aug-Sep;84(8-9):847-58.
25. Martineau LC, Adeyiwola-Spoor DC, Vallerand D, Afshar A, Arnason JT, Haddad PS. Enhancement of muscle cell glucose uptake by medicinal plant species of Canada's native populations is mediated by a common, metformin-like mechanism. *J Ethnopharmacol*. 2010 Feb 3;127(2):396-406.
26. Jiang T, Wang Z, Proctor G, Moskowitz S, Liebman SE, Rogers T, et al. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2005 Sep 16;280(37):32317-25.
27. Bray GA, Lovejoy JC, Smith SR, DeLany JP, Lefevre M, Hwang D, et al. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. *J Nutr*. 2002 Sep;132(9):2488-91.
28. Elizabeth M Brunt CGJ, Adrian M Di Bisceglie, Brent A Neuschwander-Tetri and Bruce R Bacon. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging histologic lesions. *American Journal of Gastroenterology* 1999;94:2467-74.
29. Haddad Y, Vallerand D, Brault A, Haddad PS. Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Silibinin in a Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2009 Nov 1.
30. FOLCH J LM, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226(1):497-509.
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
32. Benhaddou-Andaloussi A, Martineau LC, Vallerand D, Haddad Y, Afshar A, Settaf A, et al. Multiple molecular targets underlie the antidiabetic effect of *Nigella sativa* seed

- extract in skeletal muscle, adipocyte and liver cells. *Diabetes Obes Metab.* 2010 Feb;12(2):148-57.
33. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res.* 1996 May;37(5):907-25.
34. Lee CH, Olson P, Evans RM. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology.* 2003 Jun;144(6):2201-7.
35. Sakakura Y, Shimano H, Sone H, Takahashi A, Inoue N, Toyoshima H, et al. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Aug 10;286(1):176-83.
36. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes.* 1988 Sep;37(9):1163-7.
37. Karlsson HK, Zierath JR, Kane S, Krook A, Lienhard GE, Wallberg-Henriksson H. Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes.* 2005 Jun;54(6):1692-7.
38. Sanz P. AMP-activated protein kinase: structure and regulation. *Curr Protein Pept Sci.* 2008 Oct;9(5):478-92.
39. Haber BA, Chin S, Chuang E, Buikhuisen W, Najj A, Taub R. High levels of glucose-6-phosphatase gene and protein expression reflect an adaptive response in proliferating liver and diabetes. *J Clin Invest.* 1995 Feb;95(2):832-41.
40. Clore JN, Stillman J, Sugerma H. Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2000 Jun;49(6):969-74.
41. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem.* 2004 Jul 30;279(31):32345-53.
42. Foretz M, Taleux N, Guigas B, Horman S, Beauloye C, Andreelli F, et al. [Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]. *Med Sci (Paris).* 2006 Apr;22(4):381-8.
43. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* 2003 Jul 3;546(1):113-20.
44. Winder WW, Hardie DG. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol.* 1999 Jul;277(1 Pt 1):E1-10.
45. Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB. Transcriptional regulation of lipid metabolism by fatty acids: a key determinant of pancreatic beta-cell function. *Nutr Metab (Lond).* 2005 Jan 5;2(1):1.
46. Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem.* 1998 Dec 4;273(49):32833-41.
47. Kohjima M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, et al. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med.* 2008 Apr;21(4):507-11.



48. Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, et al. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *J Biol Chem.* 2002 May 31;277(22):19353-7.
49. Lowell BB. PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell.* 1999 Oct 29;99(3):239-42.
50. Christopher J. de Souza ME, Karen Gagen, Mei Dong, Wei Chen, Didier Laurent and Bryan F. Burkey. Effects of Pioglitazone on Adipose Tissue Remodeling Within the Setting of Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes.* 2001; vol. 50 no. 8:1863-71



## Chapitre D : Discussion générale

Depuis les dernières décennies, les maladies métaboliques comme le diabète de type 2 sont devenus des fléaux mondiaux. Leurs incidences ne cessent d'augmenter et affectent plus de 200 millions d'adultes, d'adolescents et même d'enfants (IDF, 2010). Le diabète de type 2 est l'une des principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde (WHO). De plus, les complications engendrées par cette maladie coûtent une fortune en soin et en prise en charge par l'état.

Les autochtones du nord du Québec est la population la plus atteinte du diabète de type 2. Avec une incidence de 4 à 5 fois supérieur à celle du reste du Canada (2), cette population a subi de récents changements socioculturels qui ont nuit à leurs habitudes de vie. L'abandon d'un mode de vie nomade au détriment d'une sédentarité et l'adoption d'une alimentation riche en calorie ont favorisé une croissance fulgurante de la maladie. Pour traiter le diabète de type 2, les autochtones ont préférentiellement recours à la médecine traditionnelle à cause de leur faible adhérence aux traitements pharmacologiques conventionnels (4).

La médecine traditionnelle Cri possède une très large connaissance de l'utilisation des plantes médicinales. Elle est transmise et enseignée d'une génération à l'autre. Notre équipe a travaillé pendant plusieurs années avec les nations Cri d'Eeyou Istchii (Baie James, Québec, Canada) pour étudier leurs plantes. À la suite d'une étude ethnobotanique, nous avons pu établir une liste de 17 plantes ayant un potentiel antidiabétique. Leurs activités ont été criblées sur différentes lignées cellulaires afin de vérifier leur pouvoir de captation de glucose musculaire (C2C12), leur capacité d'induire l'adipogenèse (3T3-L1) et de sécréter l'insuline (INS 832/13) (6). Le *Rhododendron groenlandicum* (Thé du Labrador) est une des plantes les mieux considérées par les guérisseurs Cris et qui s'est avérée l'une des plus efficaces lors de ce criblage, d'où l'objet de la présente étude. L'objectif premier de cette étude consiste à identifier les principes actifs responsables de

son activité antidiabétique et de comprendre ses principaux mécanismes d'actions dans le modèle animal de souris DIO.

La première étude (chapitre B) a permis d'identifier trois composés actifs. La (+) catéchine, l'(-) épicatechine et la quercétine ont été isolés à partir de l'extrait éthanolique du *R. groenlandicum*. Ces trois principes actifs sont des composés phénoliques de la famille des flavonoïdes retrouvés dans les plantes, les fruits et les boissons. L'(-)épicatechine est l'isomère de la (+) catéchine et les deux font partie du sous-groupe de flavan-3-ols. Elles se distinguent de la quercétine, qui à son tour, fait partie du sous-groupe appelé flavonols. Les flavonoïdes ont été largement étudiés en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine. Ils sont surtout connus pour leurs activités anti-inflammatoires et antioxydantes (103), mais également pour leurs propriétés antigénotoxiques et antidiabétiques (104). Les effets des flavonoïdes sur la prolifération et la différenciation ont été étudiés dans différentes lignées cellulaires. Malheureusement, les résultats de ces études sont contradictoires, en particulier pour le modèle de cellules adipocytaires. Certaines études montrent une inhibition de la différenciation adipocytaire (105) tandis que d'autres montrent l'inverse (106). Les résultats de la présente étude ont montré que la (+) catéchine inhibe l'adipogenèse de 35 à 45 % à des concentrations égales ou inférieures à 100  $\mu\text{M}$ , mais la stimule de façon significative à des concentrations plus élevées avec un  $\text{EC}_{50} = 104 \mu\text{M}$ . L'(-) épicatechine stimule l'adipogenèse à la dose de 150  $\mu\text{M}$ . Par contre, en dessous de cette concentration, il n'y a eu aucun effet significatif ( $\text{EC}_{50} = 127 \mu\text{M}$ ). La quercétine quant à elle, inhibe l'adipogenèse de façon dose dépendante avec un  $\text{IC}_{50}$  de 47  $\mu\text{M}$ . Ce pouvoir inhibiteur de la quercétine a été prouvé et confirmé dans plusieurs études (105, 107). Ce composé inhibe, entre autre, le PPAR  $\gamma$  et stimule l'AMPK, ce qui lui confère un potentiel antidiabétique intéressant. Malgré tout, aucun composé seul n'a réussi à reproduire l'effet de l'extrait brut de la plante. Ceci laisse présager que des effets additifs ou synergiques puissent exister. Les études futures devront se pencher sur ces questions.

L'activité antidiabétique de l'extrait brut du *R. groenlandicum* a été confirmé et démontré *in vivo* (chapitre C) dans le modèle de souris DIO rendus obèses et insulino-résistants par la prise quotidienne d'une diète riche en gras (35% de lipides). Ce modèle de

souris représente un outil précieux pour étudier et valider de nouvelles avenues thérapeutiques pour le traitement de l'obésité et du diabète (108). Les conclusions de la présente étude ont permis non seulement de valider les effets antidiabétiques de notre plante, mais aussi, confirment tous les effets connus du modèle. En effet, ces souris développent l'obésité, l'hyperglycémie, l'insulino-résistance et des foies gras (102). Ces caractéristiques physiopathologiques de la souris DIO ressemblent le plus à celles retrouvées dans la plupart des populations souffrant de diabète de type 2 (109).

Un traitement de 8 semaines avec l'extrait du *R. groenlandicum* introduit dans la diète grasse des souris obèses et insulino-résistantes a permis d'atténuer la résistance à l'insuline. En effet, des baisses de 13 et 65% ont été observées chez les souris traitées pour la glycémie et l'insulinémie respectivement. La plante prévient aussi légèrement la prise de poids corporel (de 6%, NS) et améliore les stéatoses hépatiques induites par le modèle DIO. En effet, une diminution de 42% des taux de triglycérides hépatiques a été observée avec le traitement de la plante.

Les mécanismes d'action du *R. groenlandicum* ont été examinés en étudiant l'expression et l'état d'activation des protéines impliqués dans l'homéostasie glucidique et lipidique des tissus cibles de l'insuline tels que le muscle, le foie et le tissu adipeux blanc des souris DIO.

Des analyses d'immunobuvardages de type western ont montré que *R. groenlandicum* module la signalisation de l'insuline et améliore l'utilisation du glucose dans le muscle squelettique des souris traitées. En fait, avec la dose de 250 mg/kg, *R. groenlandicum* stimule l'activation de l'Akt et augmente la teneur protéique en Glut 4 par rapport aux souris DIO non traitées. L'Akt est une protéine clé de la voie de signalisation de l'insuline qui module le métabolisme du glucose et la translocation de Glut 4 (figure 3 de l'introduction). En effet, une augmentation de l'expression de ce transporteur dans le muscle squelettique prévient la résistance à l'insuline et améliore sa sensibilité (110). Ainsi, ces résultats suggèrent que *R. groenlandicum* favorise la captation du glucose par le muscle en stimulant la voie insulino-dépendante.

Dans le foie des souris traitées, *R. groenlandicum* stimule la phosphorylation de l'Akt et de l'AMPK, ce qui suggère que ces deux voies (insulinodépendante et indépendante) sont impliquées. La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) est une enzyme qui joue un rôle clé dans l'homéostasie énergétique cellulaire. Elle stimule l'absorption du glucose par les muscles squelettiques (111) et augmente l'oxydation des AG hépatiques. En effet, la sensibilité à l'insuline est renforcée par la stimulation de l'oxydation des AG à travers le complexe AMPK / ACC (45, 112, 113) et / ou à travers le récepteur nucléaire PPAR  $\alpha$  (33, 114). De plus, l'AMPK inhibe l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse tels que le SREBP-1 (113, 115). L'inhibition de ce facteur de transcription dans le foie permet de réduire la synthèse du cholestérol et des triglycérides, ce qui contribue à augmenter la sensibilité à l'insuline (115, 116). Par contre, sa surexpression, causée par une hyperinsulinémie et par des cytokines inflammatoires (impliquant l'IKK (117, 118) et la voie des NF- $\kappa$ B) peut causer des stéatoses hépatiques (115, 116).

Le traitement avec l'extrait de *R. groenlandicum* a réduit l'accumulation de triglycérides de 42% dans le foie des souris traitées par rapport au groupe DIO témoin. Cette diminution a été observée autant au niveau histologique des foies prélevés et dans le dosage des triglycérides hépatiques. Il est prouvé qu'une accumulation de gras dans le foie est une contribution majeure au développement de la résistance à l'insuline et un élément crucial dans la pathogenèse du diabète (119). On remarque cependant une augmentation significative du contenu protéique en PPAR  $\alpha$  présente chez tous les groupes de souris DIO comparativement aux souris nourries avec une diète standard CHOW. Cette augmentation nous suggère que des mécanismes compensatoires sont déjà induit par l'apport lipidique ingéré quotidiennement sur une longue période de temps (8 semaines) et la plante n'a pas d'influence additionnelle. Le traitement avec l'extrait de *R. groenlandicum* a diminué les taux de SREBP-1 de près de 39% par rapport aux souris non traitées. De plus une baisse de l'inflammation hépatique est suggérée par la diminution de la phosphorylation de l'IKK $\alpha/\beta$  qui a été observée avec la prise d'une plus forte dose de l'extrait. Notre plante semble donc

améliorer l'état des foies des souris traitées et diminuer par conséquent, l'inflammation hépatique retrouvée chez le modèle DIO.

Finalement, le tissu adipeux blanc est un organe dit endocrinien, qui contrôle la synthèse et le stockage des acides gras, mais participe également à la sécrétion de certaines hormones dont les adipokines. Les études réalisées précédemment ont démontré une forte stimulation de la différenciation des cellules adipocytaires, 3T3-L1, par l'extrait de *R. groenlandicum* (6). Dans cette étude, il a été démontré que *R. groenlandicum* est un agoniste partiel du récepteur nucléaire PPAR  $\gamma$  lors d'essais sur gène rapporteur réalisés *in vitro* sur les cellules HEK293T. Il est à noter que la stimulation de ce récepteur nucléaire est beaucoup plus faible comparativement au contrôle positif, la rosiglitazone qui est un agoniste complet. Ceci explique qu'aucun effet significatif n'est observé sur le gras rétro-péritonéal *in vivo*. En effet, *R. groenlandicum* possède un faible effet sur l'adipogenèse dans le tissu adipeux blanc. La stimulation de la différenciation adipocytaire est favorisée par plusieurs facteurs de transcription, dont le PPAR  $\gamma$  et les protéines C/EBPs. Le traitement avec l'extrait de *R. groenlandicum* n'a pas affecté les taux protéiques de PPAR  $\gamma$ , C/EBPs et SREBP-1 dans le tissu adipeux des souris traitées, à l'exception de quelques tendances pro-adipogéniques observées avec une plus forte dose de 500 mg/kg. Cette tendance peut être liée aux effets mitigés de la plante sur le récepteur nucléaire PPAR  $\gamma$ . De plus, une stimulation partielle et faible de ce récepteur évite sans doute tous les effets indésirables retrouvés avec des agonistes complets tels que les glitazones.

Ces résultats soutiennent le fait que le *R. groenlandicum* exerce probablement son activité antidiabétique en agissant principalement sur le foie et le muscle, plutôt que sur le tissu adipeux.

## Chapitre E : Conclusion et perspective

Les résultats obtenus dans la présente étude valide pour la première fois l'effet antidiabétique de *Rhododendron groenlandicum*, une plante provenant de la médecine traditionnelle Cri de la Baie James du nord de Québec, chez le modèle animal DIO. Cette étude démontre que le traitement avec cet extrait dans le modèle *in vivo* atténue la résistance à l'insuline provoquée par un régime riche en lipide. Plusieurs effets bénéfiques de l'extrait ont été démasqués : la diminution de la glycémie et de l'insulinémie plasmatique, la tendance à la diminution du gain corporel, la réduction de l'accumulation des triglycérides dans le foie, ainsi que l'amélioration des fonctions hépatiques. Ces effets semblent être contrôlés par la voie insulino-dépendante dans le muscle et le foie via l'Akt, mais aussi par la voie insulino-indépendante (AMPK) dans le foie. Aussi, le fractionnement guidé par la stimulation de l'adipogenèse dans les 3T3-L1 avec l'extrait de *R. groenlandicum*, nous a permis de séparer les composés phytochimiques retrouvés dans la plante et d'identifier trois composés actifs qui sont des flavonoïdes bien connus; la catéchine, l'épicatéchine et la quercétine.

Le traitement du diabète de type 2 implique le contrôle adéquat des taux de glucose plasmatiques et de son utilisation par les tissus périphériques. Les effets de *R. groenlandicum* observés *in vivo* sont la prise de plusieurs traitements médicamenteux existants sur le marché. Cette plante a réussi à stabiliser et à baisser la glycémie de 13% par rapport au groupe témoin non traité. Cette baisse a été validée par une augmentation du contenu protéique en Glut 4 dans les muscles des souris traitées, ce qui suggère une meilleure absorption et utilisation du glucose par ce tissu. Cependant, cette augmentation en Glut 4 ne veut pas forcément dire que *R. groenlandicum* favorise sa translocation basale. Des études plus poussées et plus approfondies devraient être réalisées afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle l'extrait de *R. groenlandicum* participerait à la translocation du



transporteur de glucose Glut 4 du cytoplasme vers la surface de la membrane dans les cellules musculaires.

Nous avons également identifié que la voie de l'insuline était impliquée dans les muscles et les foies des souris traitées via l'activation de l'Akt. Par contre, il faudrait étudier la phosphorylation du récepteur à l'insuline (IR) ainsi que de son substrat (IRS) pour confirmer l'action exacte de l'extrait sur cette voie. Ceci nous confirmerait que *R. groenlandicum* active l'Akt et stimule le récepteur à l'insuline comme un insulino-mimétique.

L'extrait de *R. groenlandicum* a réussi à activer la voie de l'AMPK dans les foies de souris traitées. Cette kinase active la translocation et augmente le contenu protéique en Glut 4. Par ailleurs, la stimulation du récepteur nucléaire PPAR  $\gamma$  peut aussi activer l'AMPK (120). Ceci dit, l'activation de la translocation et de l'expression de Glut 4 peut se faire de deux façons, soit via la voie de l'insuline (activation de l'Akt) soit via l'AMPK. En effet, une des protéines communes à ces deux voies est l'AS160. Sa phosphorylation sur la thréonine (Thr 642) par l'insuline ou par l'AMPK permet la translocation du Glut 4 du cytoplasme vers la surface membranaire (121). Ainsi, il serait intéressant d'étudier cette protéine dans le foie de nos souris DIO traitées, afin de vérifier ou de confirmer le lien existant entre ces deux voies.

Étant donné que le foie joue un rôle majeur dans l'homéostasie du glucose, il serait intéressant de voir si l'extrait de *R. groenlandicum* peut avoir un effet sur la production hépatique du glucose dans notre modèle animal. Des études préliminaires réalisées dans notre laboratoire (A. Nachar et P.S.H, données non publiées) sur des lignées cellulaires hépatiques *in vitro* montrent que *R. groenlandicum* inhibe significativement l'activité de la glucose-6-phosphatase et augmente celle de la glycogène synthase (GS), deux enzymes clés de la néoglucogénèse et de la glycogénogénèse respectivement. Il serait néanmoins intéressant de confirmer l'implication de ces voies dans les foies des souris DIO en

regardant l'expression hépatique de la phosphorylation de la GSK-3 et du contenu protéique de la glucose-6-phosphatase.

Au niveau des adipocytes, l'extrait de *R. groenlandicum* stimule significativement l'adipogénèse *in vitro*. Cette stimulation passe via l'activation partielle du récepteur nucléaire PPAR  $\gamma$ . Par contre, les données *in vivo* nous montrent que *R. groenlandicum* possède de faibles effets dans les tissus adipeux, nous suggérant que son activité agit principalement sur le foie et le muscle. De plus, l'analyse des principes actifs de l'extrait engendrés par le fractionnement ne montre pas d'effets plus importants que ceux observés avec l'extrait brut. En effet, la catéchine et l'épicatéchine stimulent faiblement la différenciation adipogénique, tandis que la quercétine l'inhibe complètement, à plus fortes concentrations. Les données présentées dans divers articles sont peu concluantes et contradictoires quant aux effets des flavonoïdes sur différentes lignées cellulaires. Une étude complète sur les effets de notre fraction active regroupant la catéchine, l'épicatéchine et la quercétine est recommandée *in vitro*, afin de cribler davantage ses effets sur différentes lignées cellulaires. Par la suite, il serait intéressant de la tester *in vivo* dans le modèle de souris DIO. Cette comparaison de l'extrait brut versus la fraction active nous permettrait d'utiliser une concentration moindre et ainsi favoriser l'un ou l'autre pour de futures études cliniques.

Finalement, les travaux effectués dans ce mémoire ont permis d'identifier les composants actifs de *Rhododendron groenlandicum*, d'élucider ses mécanismes d'action dans un modèle animal d'insulinorésistance et d'obésité, ainsi que de valider son innocuité. Ce travail apporte une certaine crédibilité et une notoriété quant à l'utilisation des plantes médicinales issues de la médecine traditionnelle autochtone dans le traitement des maladies métaboliques comme le diabète de type 2.

## Bibliographie

1. G. Delluc BD, M. Roques. *la nutrition préhistorique*. ellipses. 2003.
2. Hegele RA. *Genes and environment in type 2 diabetes and atherosclerosis in aboriginal Canadians*. *Curr Atheroscler Rep*. 2001 May;3(3):216-21.
3. Pan XR, Li GW, Hu YH, Wang JX, Yang WY, An ZX, et al. *Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study*. *Diabetes Care*. 1997 Apr;20(4):537-44.
4. Brassard P, Robinson E, Lavallee C. *Prevalence of diabetes mellitus among the James Bay Cree of northern Quebec*. *CMAJ*. 1993 Aug 1;149(3):303-7.
5. Leduc C, Coonishish J, Haddad P, Cuerrier A. *Plants used by the Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany*. *J Ethnopharmacol*. 2006 Apr 21;105(1-2):55-63.
6. Spoor DC, Martineau LC, Leduc C, Benhaddou-Andaloussi A, Meddah B, Harris C, et al. *Selected plant species from the Cree pharmacopoeia of northern Quebec possess anti-diabetic potential*. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006 Aug-Sep;84(8-9):847-58.
7. Harbilas D, Martineau LC, Harris CS, Adeyiwola-Spoor DC, Saleem A, Lambert J, et al. *Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: part II*. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009 Jun;87(6):479-92.
8. Liang B. *General Anatomy and Physiology* Available from: <http://www.wisc-online.com/objects/ViewObject.aspx?ID=AP15004>.
9. Jiang G ZB. *Glucagon and regulation of glucose metabolism*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284(4):E671-8.
10. Aronoff SL. *Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon*. *Diabetes Spectrum*. 2004;17:183-90.
11. Baynes J. DM. *Glucose homeostasis and fuel metabolism*. *Medical Biochemistry*; 2 ed. 2004:243-66.
12. Postic C, Dentin R, Girard J. *Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis*. *Diabetes Metab*. 2004 Nov;30(5):398-408.

13. Mourad Naïmi EVO. *Facteur de transcription FoxO1. Une passerelle nucléaire entre métabolisme et mitogenèse.* MEDECINE/SCIENCES. 2008;24:635-9.
14. Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW. *Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters.* J Biol Chem. 1993 Sep 15;268(26):19161-4.
15. Wallberg-Henriksson H ZJ. *GLUT4: a key player regulating glucose homeostasis? Insights from transgenic and knockout mice (review).* Mol Membr Biol. 2001;18(3):205-11.
16. Aledo J, Lavoie, L, Volchuk, A, Keller, SR, Klip, A, and Hundal, HS. *Identification and characterization of two distinct intracellular GLUT4 pools in rat skeletal muscle: evidence for an endosomal and an insulin- sensitive GLUT4 compartment.* Biochem J 1997;325:727-32.
17. Karlsson HK, Zierath JR, Kane S, Krook A, Lienhard GE, Wallberg-Henriksson H. *Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects.* Diabetes. 2005 Jun;54(6):1692-7.
18. Neshler R, Karl IE, Kipnis DM. *Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle.* Am J Physiol. 1985 Sep;249(3 Pt 1):C226-32.
19. Ploug T, Galbo H, Richter EA. *Increased muscle glucose uptake during contractions: no need for insulin.* Am J Physiol. 1984 Dec;247(6 Pt 1):E726-31.
20. Richter EA, Cleland PJ, Rattigan S, Clark MG. *Contraction-associated translocation of protein kinase C in rat skeletal muscle.* FEBS Lett. 1987 Jun 15;217(2):232-6.
21. Lauralee Sherwood AL. *Physiologie humaine.* Université ÉDB, editor2006.
22. Saltiel AR, Kahn CR. *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.* Nature. 2001 Dec 13;414(6865):799-806.
23. Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, Thurmond DC, Mora S, Shigematsu S, et al. *CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport.* Nature. 2000 Sep 14;407(6801):202-7.
24. Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, et al. *Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10.* Nature. 2001 Apr 19;410(6831):944-8.
25. Litherland GJ HE, Hundal HS. *Intracellular signalling mechanisms regulating glucose transport in insulin-sensitive tissues.* Mol Membr Biol. 2001;18(3):195-204.

26. Cano NB, D.; Schneider, S.M.; Vasson, M.-P.; Hasselmann, M.; Leverve, X. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. ed i, editor2007.
27. Kersten S. *Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis*. EMBO Rep. 2001 Apr;2(4):282-6.
28. Sakakura Y, Shimano H, Sone H, Takahashi A, Inoue N, Toyoshima H, et al. *Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis*. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Aug 10;286(1):176-83.
29. Yu YH, Ginsberg HN. *Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue*. Circ Res. 2005 May 27;96(10):1042-52.
30. kolanowski J. *Rôle du tissu adipeux dans la physiopathologie de l'obésité et du diabète de type 2*. Louvain Med. 2003;122:S223-S31.
31. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. *ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism*. Trends Endocrinol Metab. 2002 Mar;13(2):84-9.
32. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity*. Nat Med. 2001 Aug;7(8):941-6.
33. Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB. *Transcriptional regulation of lipid metabolism by fatty acids: a key determinant of pancreatic beta-cell function*. Nutr Metab (Lond). 2005 Jan 5;2(1):1.
34. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, et al. *Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids*. J Clin Invest. 1997 May 15;99(10):2416-22.
35. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, et al. *Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism*. Mol Cell Biol. 1999 Aug;19(8):5495-503.
36. Spiegelman BM. *PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor*. Diabetes. 1998 Apr;47(4):507-14.
37. Bishop-Bailey D. *Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system*. British Journal of Pharmacology. 2000;129:823-34.

38. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, et al. *LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade*. *Curr Biol*. 2003 Nov 11;13(22):2004-8.
39. Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, et al. *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells*. *Cell Metab*. 2005 Jul;2(1):21-33.
40. Marc Foretz NT, Bruno Guigas, Sandrine Horman, Christophe Beauvoys, Fabrizio Andreelli, Luc Bertrand, Benoît Viollet. *Régulation du métabolisme énergétique par l'AMPK. Une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement des maladies métaboliques et cardiaques*. *MEDECINE/SCIENCES*. 2006;22:381-8.
41. Trebak JT, Glund S, Deshmukh A, Klein DK, Long YC, Jensen TE, et al. *AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits*. *Diabetes*. 2006 Jul;55(7):2051-8.
42. Jorgensen SB, Viollet B, Andreelli F, Frosig C, Birk JB, Schjerling P, et al. *Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranosidebut not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle*. *J Biol Chem*. 2004 Jan 9;279(2):1070-9.
43. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action*. *J Clin Invest*. 2001 Oct;108(8):1167-74.
44. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. *The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways*. *J Biol Chem*. 2002 Jul 12;277(28):25226-32.
45. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. *Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system*. *FEBS Lett*. 2003 Jul 3;546(1):113-20.
46. Ouchi N, Shibata R, Walsh K. *AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle*. *Circ Res*. 2005 Apr 29;96(8):838-46.
47. Guillausseau PJ, Laloi-Michelin M. *[Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus]*. *Rev Med Interne*. 2003 Nov;24(11):730-7.
48. Capeau J. *Voies de signalisation de l'insuline: mécanismes affectés dans l'insulino-résistance*. *medecine / sciences* 2003;19:834-9.
49. J G. *Fondements physiopathologiques du diabète de type II*. *La Revue du Praticien*. 1999;49:22-9.

50. White MF. *The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action*. Mol Cell Biochem. 1998 May;182(1-2):3-11.
51. Dorrestijn J, van Bussel FJ, Maassen JA, Gomes de Mesquita DS. *Early steps in insulin action*. Arch Physiol Biochem. 1998 Oct;106(4):269-89.
52. Stump CS, Short KR, Bigelow ML, Schimke JM, Nair KS. *Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 24;100(13):7996-8001.
53. Shimano H. *Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes*. Prog Lipid Res. 2001 Nov;40(6):439-52.
54. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. *Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice*. Mol Cell. 2000 Jul;6(1):77-86.
55. Mendez R, Welsh G, Kleijn M, Myers MG, White MF, Proud CG, et al. *Regulation of protein synthesis by insulin through IRS-1*. Prog Mol Subcell Biol. 2001;26:49-93.
56. Proud CG. *Regulation of protein synthesis by insulin*. Biochem Soc Trans. 2006 Apr;34(Pt 2):213-6.
57. Farnier M, editor. *Dyslipidémies du diabétique*2002.
58. Ruan H, Lodish HF. *Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha*. Cytokine Growth Factor Rev. 2003 Oct;14(5):447-55.
59. Alberti KG ZP, Shaw J. *IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome – a new worldwide definition*. Lancet. 2005;366:1059-62.
60. Doelle GC. *The clinical picture of metabolic syndrome. An update on this complex of conditions and risk factors*. Postgrad Med. 2004 Jul;116(1):30-2, 5-8.
61. G. A. Spinass RL. *Diabète sucré: Diagnostic, classification et pathogénèse*. CURRICULUM Forum Med Suisse. 2001;No 20:519-25.
62. *Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care. 1997 Jul;20(7):1183-97.
63. Kaplan RSPJL. *The Merck Manual* 18th ed2006.
64. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. Lancet. 2005 Apr 9-15;365(9467):1333-46.

65. Diabetes & You, What is diabetes? - Gestational diabetes: Preventing complications in pregnancy, Canadian Diabetes Association. [www.diabetes.ca](http://www.diabetes.ca); 2010.
66. Landon MB SC, et al. *Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network*. N Engl J Med. 2009;1;361(14):1339-48.
67. Stumvoll M, Haring HU, Matthaei S. *Metformin*. Endocr Res. 2007;32(1-2):39-57.
68. Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA. *Glucose toxicity*. Diabetes Care. 1990 Jun;13(6):610-30.
69. Unger RH. *Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications*. Diabetes. 1995 Aug;44(8):863-70.
70. Hoppener JW, Ahren B, Lips CJ. *Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus*. N Engl J Med. 2000 Aug 10;343(6):411-9.
71. Guillausseau PJ. [*Anomalies of insulin secretion and type 2 diabetes: recent information*]. Diabete Metab. 1994 Nov;20(3 Pt 2):325-9.
72. Les complications du diabète. 2010; Available from: [www.sante-medecine.commentcamarche.net](http://www.sante-medecine.commentcamarche.net).
73. Complications chroniques et dégénératives des diabètes Available from: <http://grippe.space-blogs.com/>.
74. *Preventing Chronic Diseases: a vital investment*. WHO. 2005.
75. Latest diabetes figures paint grim global picture. wwwidforg [serial on the Internet]. 2009.
76. Kuzmina E LP, Dannenbaum D, Torrie J. *Cree Diabetes Information System (CDIS)—2009, Annual Report*. Cree Board of Health and Social Services of James Bay. 2010.
77. Ekoe JM, Thouez JP, Petitclerc C, Foggin PM, Ghadirian P. *Epidemiology of obesity in relationship to some chronic medical conditions among Inuit and Cree Indian populations in New Quebec, Canada*. Diabetes Res Clin Pract. 1990;10 Suppl 1:S17-27.
78. Garriguet D. *Obesity and the eating habits of the Aboriginal population*. Health Rep. 2008 Mar;19(1):21-35.
79. Ducobu J. [*Oral antidiabetic drugs in 2003*]. Rev Med Brux. 2003 Sep;24(4):A361-8.



80. Karam JH NM. Chapter 41: Pancreatic hormones and antidiabetic drugs. New York, USA: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2007.
81. Médicaments, glycémie et régulation du comportement alimentaire. Available from: [www.pharmacorama.com](http://www.pharmacorama.com).
82. Chehade JM, Mooradian AD. *A rational approach to drug therapy of type 2 diabetes mellitus*. *Drugs*. 2000 Jul;60(1):95-113.
83. Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, et al. *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination*. *Diabetes*. 2005 Dec;54(12):3358-70.
84. Kendall C, Woollorton E. *Rosiglitazone (Avandia) and macular edema*. *CMAJ*. 2006 Feb 28;174(5):623.
85. Lincoff AM, Wolski K, Nicholls SJ, Nissen SE. *Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials*. *JAMA*. 2007 Sep 12;298(10):1180-8.
86. Graham DJ, Ouellet-Hellstrom R, MaCurdy TE, Ali F, Sholley C, Worrall C, et al. *Risk of acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and death in elderly Medicare patients treated with rosiglitazone or pioglitazone*. *JAMA*. 2010 Jul 28;304(4):411-8.
87. Nissen SE, Wolski K. *Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes*. *N Engl J Med*. 2007 Jun 14;356(24):2457-71.
88. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé Available from: [www.afssaps.fr](http://www.afssaps.fr).
89. Renseignements approuvés par Santé Canada concernant de nouvelles restrictions importantes à l'emploi de la rosiglitazone (PrAVANDIA®, PrAVANDAMET® et PrAVANDARYL®) [database on the Internet]. GlaxoSmithKline. 2010. Available from: [http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt\\_formats/pdf/medeff/advisories-avis/prof/2010/avandia\\_6\\_hpc-cps-fra.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/pdf/medeff/advisories-avis/prof/2010/avandia_6_hpc-cps-fra.pdf).
90. Rosiglitazone maleate (marketed as Avandia, Avandamet, and Avandaryl) Information. 2011 [updated 02/03/2011 ]; Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm143349.htm>.
91. Guay DR. *Repaglinide, a novel, short-acting hypoglycemic agent for type 2 diabetes mellitus*. *Pharmacotherapy*. 1998 Nov-Dec;18(6):1195-204.

92. Heine RJ, Diamant M, Mbanya JC, Nathan DM. *Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: the end of recurrent failure?* BMJ. 2006 Dec 9;333(7580):1200-4.
93. Campbell RK. *Rationale for dipeptidyl peptidase 4 inhibitors: a new class of oral agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus.* Ann Pharmacother. 2007 Jan;41(1):51-60.
94. Amori RE, Lau J, Pittas AG. *Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis.* JAMA. 2007 Jul 11;298(2):194-206.
95. Organisation Mondiale de la Santé. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/fr/>.
96. P. Goetz RLJ. *Galega officinalis.* Phytothérapie. 2008;6:39-41.
97. Ch. Chartier HS, P.Goetz. *Monographie médicalisée: Thé du Labrador (lédon du Groenland) (Ledum groenlandicum Oeder).* Phytothérapie. 2005;2:84-7.
98. Thé du Labrador. Available from: <http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/1623999>.
99. Labrador Tea. *Ledum groenlandicum (Rhododendron groenlandicum)* 2005; Available from: <http://www.ct-botanical-society.org/galleries/ledumgroe.html>.
100. al. ANe. *Mouse model of insulin resistance.* The American Physiological society 2004;84:623-47.
101. Bray GA, Lovejoy JC, Smith SR, DeLany JP, Lefevre M, Hwang D, et al. *The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation.* J Nutr. 2002 Sep;132(9):2488-91.
102. Jiang T, Wang Z, Proctor G, Moskowitz S, Liebman SE, Rogers T, et al. *Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway.* J Biol Chem. 2005 Sep 16;280(37):32317-25.
103. Harp. AWHaJB. *Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis.* ajpcell. 2000.
104. Pinent M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L, Hackl H, Quackenbush J, et al. *Grape-seed derived procyanidins interfere with adipogenesis of 3T3-L1 cells at the onset of differentiation.* Int J Obes (Lond). 2005 Aug;29(8):934-41.
105. CHIEN P-J. *Dietary Flavonoids Suppress Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes.* Journal of Food and Drug Analysis. 2005;13(2):168-17.

106. Shin DW, Kim SN, Lee SM, Lee W, Song MJ, Park SM, et al. *(-)-Catechin promotes adipocyte differentiation in human bone marrow mesenchymal stem cells through PPAR gamma transactivation*. *Biochem Pharmacol*. 2009 Jan 1;77(1):125-33.
107. Ahn J, Lee H, Kim S, Park J, Ha T. *The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Sep 5;373(4):545-9.
108. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. *Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice*. *Diabetes*. 1988 Sep;37(9):1163-7.
109. Koya-Miyata S, Arai N, Mizote A, Taniguchi Y, Ushio S, Iwaki K, et al. *Propolis prevents diet-induced hyperlipidemia and mitigates weight gain in diet-induced obesity in mice*. *Biol Pharm Bull*. 2009 Dec;32(12):2022-8.
110. Gibbs EM, Stock JL, McCoid SC, Stukenbrok HA, Pessin JE, Stevenson RW, et al. *Glycemic improvement in diabetic db/db mice by overexpression of the human insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4)*. *J Clin Invest*. 1995 Apr;95(4):1512-8.
111. Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW. *5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle*. *Diabetes*. 1999 Aug;48(8):1667-71.
112. Foretz M, Taleux N, Guigas B, Horman S, Beauloye C, Andreelli F, et al. *[Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]*. *Med Sci (Paris)*. 2006 Apr;22(4):381-8.
113. Winder WW, Hardie DG. *AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes*. *Am J Physiol*. 1999 Jul;277(1 Pt 1):E1-10.
114. Poynter ME, Daynes RA. *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging*. *J Biol Chem*. 1998 Dec 4;273(49):32833-41.
115. Kohjima M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, et al. *SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease*. *Int J Mol Med*. 2008 Apr;21(4):507-11.
116. Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, et al. *Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep(ob)/Lep(ob) mice*. *J Biol Chem*. 2002 May 31;277(22):19353-7.

117. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. *Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome*. Diabetes. 2001 Aug;50(8):1844-50.
118. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, et al. *IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance*. Nat Med. 2005 Feb;11(2):191-8.
119. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. *Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease*. J Biol Chem. 2004 Jul 30;279(31):32345-53.
120. Lee WH, Kim SG. *AMPK-Dependent Metabolic Regulation by PPAR Agonists*. PPAR Res. 2010;2010.
121. Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, et al. *Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation*. J Biol Chem. 2003 Apr 25;278(17):14599-602.